

Anwendbarkeit von Pathoproof PCR Screening zur Erhebung des Eutergesundheitsstatus und epidemiologischen Analyse in Melkroboterbetrieben



Dr. med. vet. Beatrix Stessl
Institut für Milchhygiene





Melkroboter- Effekt auf die Rohmilch

➔ Innocente and Biasutti (2013)

- Montasio cheese: a typical Italian semi-hard, semi-cooked cheese
- 14 farms were compared with an average herd size of 60 (Simmental, Holstein-Friesian, and Brown Swiss breeds)-conventional/AMS
- the control and experimental milks did not reveal a statistically significant difference in fat, protein, and lactose contents;

➔ Interprofession Gruyere (IPG): Melkroboterverbot (2012)

- Übergangsfrist: zehn Jahre
- Die AMS-Betriebe: stärker mit unerwünschten Bakterien (Reduktase) belastet als Melkstände; oft auch Rohrmelkanlagen als ungenügend einzustufen.
- Zwischenmelkzeit unter 8 Stunden führt zu einer stärkeren Fettsplaltung. Folge: ein ranziger Geschmack



Melkroboter- Infektionsrisiko

→ Devries et al. (2011)

- coagulase-negative staphylococci (CNS) IMI were the only ones associated with post-milking standing time; cows that spend long periods of time (>2.5h) standing following milking;

→ Dohmen et al. (2010)

- The annual average herd SCC was positively related to the proportion of cows with dirty teats before milking
- The annual incidence rate of clinical mastitis was positively related to the frequency of replacing the milking filters.

→ Kamphuis et al., (2010)

- 64% percent of the severe CM cases were detected and only 12.5% of the CM that were scored as watery milk.
- This indicates the inability to detect all CM cases based on sensor data alone.



Melkroboter- Infektionsrisiko

→ Hovinen and Pyörälä (2011)

- to maintain good udder health in AM, it is imperative that the barn is properly designed to keep the cows clean and the cow traffic flowing. Milking frequency must be maintained for every cow according to its stage of lactation and milk production

→ Edmondson (2012)

- Raised herd somatic cell count due to *Staphylococcus aureus* following the failure of an automatic teat spraying system
- 91,000/ml to 554,000/ml over a nine-month period

→ Spohr et al. (2011)

- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany.
- nasal swabs were collected from people working on the farms and from cattle-spa-type t011



Melkroboter- Infektionsrisiko



Vanderhaeghen et al. (2010)

- a MRSA clone, CC398, has been reported colonizing pigs, veal calves and broiler chickens and infecting dairy cows



Schmid et al. (2009)

- Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products.



Mørk et al. (2012)

Persistence of staphylococcal species and genotypes in the bovine udder

- *Staphylococcus chromogenes* (32%) and *Staphylococcus simulans* (25%) predominated
- Six staphylococcal species were found to cause persistent IMI; *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri*



Melkroboter-Diagnostik

→ Spittel S, Hoedemaker M. (2012)

- Mastitis diagnosis identifying 11 mastitis pathogens and the staphylococcal beta-lactamase gene PathoProof real-time polymerase chain reaction assay in comparison with conventional bacterial culture in a Northern German field study.
- The frequency of positive pathogen signals was markedly higher with PCR compared with culture (70.6% vs. 32.2%).
- most frequently detected mastitis pathogens were coryneform bacteria (PCR: *Corynebacterium bovis*), coagulase-negative staphylococci (CNS) and *S. aureus*, followed by *Arcanobacterium pyogenes*/*Peptoniphilus indolicus* with PCR, and then with both methods, *Streptococcus uberis*. The staphylococcal beta-lactamase gene was found in 27.7% of the *S. aureus* and in 37.0% of the CNS identifications

ZIEL DER STUDIE

- Evaluierung von PathoProof™ Mastitis PCR Assay für 11 euterpathogene Keime und BL-gen



Möglichkeit zum Screeningeinsatz und Kostenreduzierung

- Einsatz in gepoolten Viertelgemelksproben
- Einsatz in der Tankmilch

ZIEL DER STUDIE

- **HYGIENESTATUS** von 8 Melkroboterbetrieben mit besonderem Augenmerk auf den potentiellen Eintrag von *S. aureus* in die Lebensmittelkette



- **EPIDEMIOLOGISCHE ABKLÄRUNG** möglicher Eintragsquellen



MATERIAL UND METHODE

PROBENNAHME-11.01.-11.07.2012

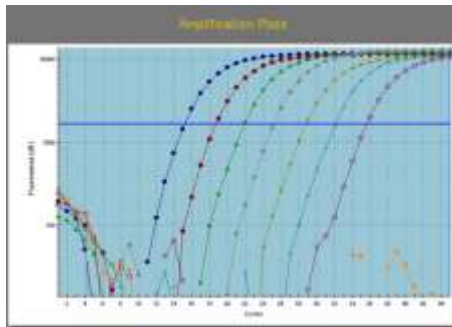
8 milchverarbeitende Betriebe

- 185 laktierende Milchkühe: FV teilweise Rotbunte eingekreuzt, SB, BV
- Laufstall; 2 tägige Abholung

int.Nr.	Melkanlage	Anlagenreinigung	Zitzenreinigung	Melkzeug-ZW-Reinigung	Dippmitte	Tanktemperatur	Milchfilterwechsel	
	Zellzahl	e	g		g	l	r	l
A	65.000	DeLaval	2xtgl.	Wasser+Luft	nein	ja	3,6 °C	2xtgl.
B	342.000	DeLaval	2xtgl.	Wasser+Luft	nein	ja	5,5 °C	1xtgl.
C	461.000	DeLaval	2xtgl.	Wasser+Luft	Peressigsäure	ja	4,8 °C	1xtgl.
D				Bürsten				
	134.000	Lely	3xtgl.	(Wasser+Peressigsäure)	nein	ja	4,7°C	1xtgl.
E				Bürsten				
	337.000	Lely	3xtgl.	(Wasser+Peressigsäure)	Peressigsäure	ja	5,1°C	1xtgl.
F	169.000	DeLaval	2xtgl.	Wasser+Luft	Peressigsäure	ja	4,0°C	2xtgl.
G	97.000	DeLaval	2xtgl.	?	nein	ja	4,0°C	2xtgl.
H	97.000	DeLaval	3xtgl.	Wasser+Luft	nein	ja	5,0°C	2xtgl.

METHODEN-PATHOPROOF

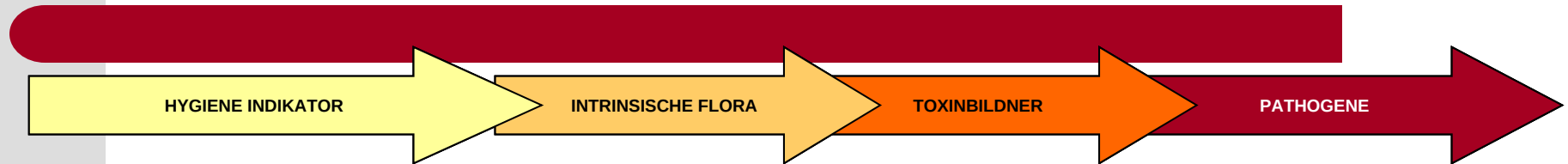
PathoProof™ Mastitis PCR Assay



DNA Extraktion +PCR in 4 Stunden möglich

- *Staphylococcus aureus*
- *Enterococcus sp.* (including *E. faecalis* and *E. faecium*)
- *Corynebacterium bovis*
- *Staphylococcal β -lactamase gene* (the gene responsible for penicillin resistance in staphylococci)
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus dysgalactiae*
- *Staphylococcus sp.* (including *Staphylococcus aureus* and all major coagulase-negative staphylococci)
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus uberis*
- *Klebsiella sp.* (including *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*)
- *Serratia marcescens*
- *Arcanobacterium pyogenes* and/or *Peptoniphilus indolicus*

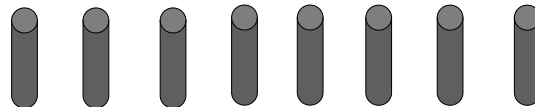
METHODEN-TANKMILCH



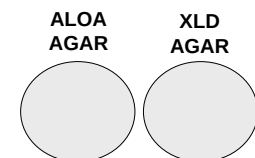
GKZ (mesophile)	Coliforme	Hefen und Schimmel	<i>Pseudomonas</i> spp.	Enterokokken	Laktobazillen Milchsäure- Streptokokken	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
--------------------	-----------	-----------------------	----------------------------	--------------	---	--	----------------------------------	---	---------------------------

QUANTITATIV ISO 4833/4832/6611	QUANTITATIV ISO 6888/7932	QUANTITATIV ISO 6888/7932	QUALITATIV ISO 11290/6579
-----------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------

DEZIMALE VERDÜNNUNGSREIHEN	SELEKTIVE ANREICHERUNG
----------------------------	------------------------



PLATTENGUSS / SPATELVERFAHREN	FRAKTIONIERTER ÖSENAUSSTRICH
-------------------------------	---------------------------------



METHODEN-TANKMILCH

HYGIENE INDIKATOR

INTRINSISCHE FLORA

TOXINBILDNER

PATHOGENE

GKZ
(mesophile)

Coliforme

Hefen und
Schimmel

Pseudomonas
spp.

Enterokokken

Laktobazillen
Milchsäure-
Streptokokken

Staphylococcus
aureus

Bacillus
cereus

Listeria
monocytogenes

Salmonella
spp.

PC
AGAR

VRG
AGAR

BCA
AGAR

MRS
AGAR

M17
AGAR

GSP
AGAR

KÄ
AGAR

BP
AGAR

MYP
AGAR

ALO
AGAR

XLD
AGAR

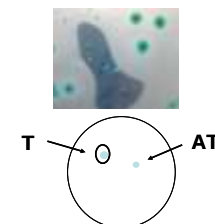
AUSZÄHLUNG ALLER / TYPISCHER KOLONIEN

BESTÄTIGUNG VERDÄCHTIGER KOLONIEN (ISO/PCR)

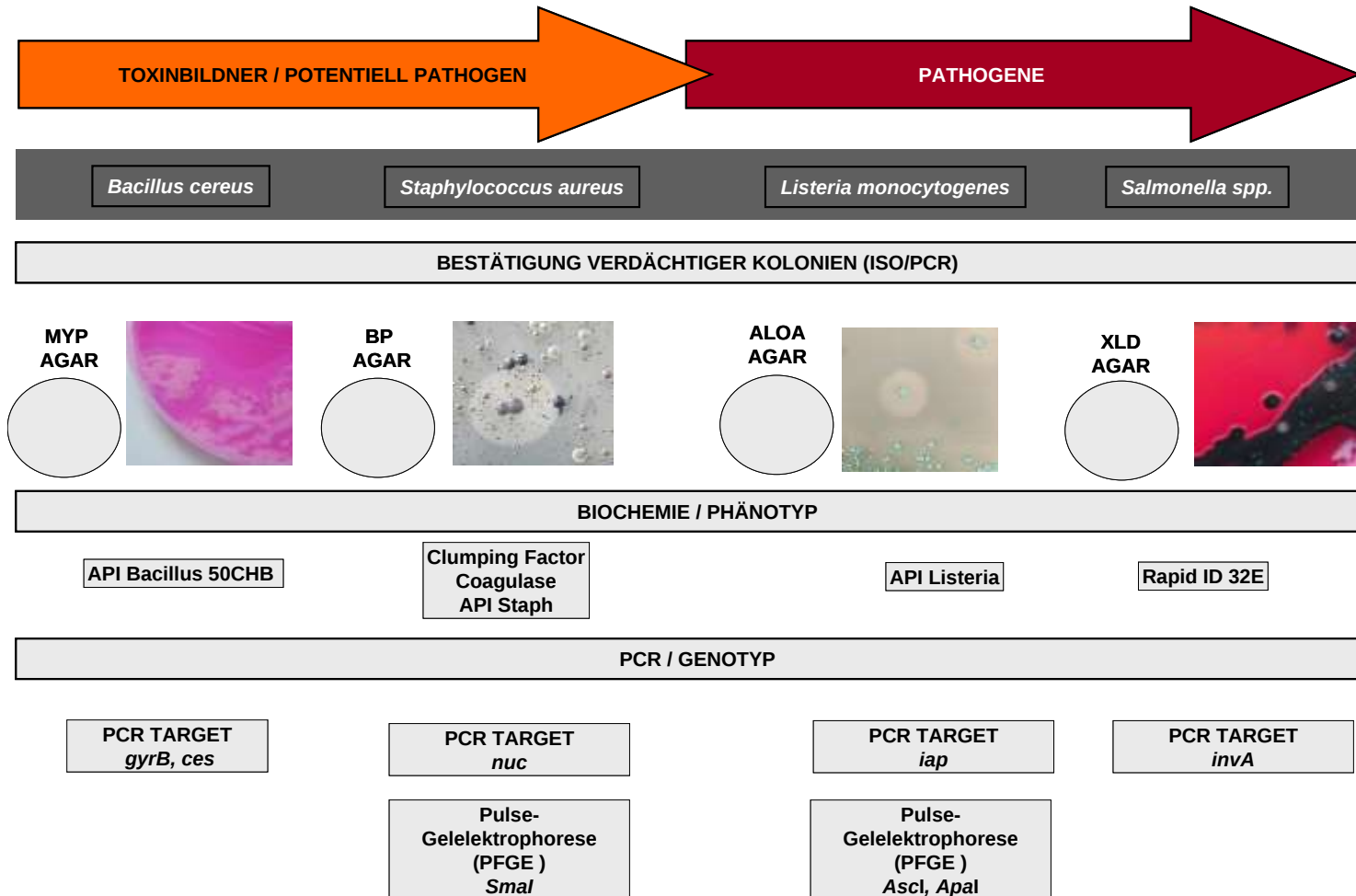
BERECHNUNG DER KBE/ml

$$\text{Gewichtetes Mittel} = \frac{\sum n}{1f_a + 0,1f_b}$$

KLASSIFIZIERUNG
Typische (T) und atypische (AT)
Koloniemorphologie



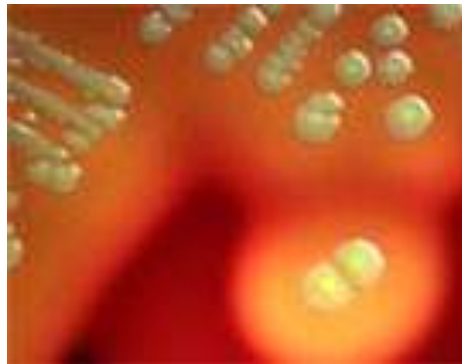
METHODEN-TANKMILCH



METHODEN-ISOLATEBENE

MIKROBIOLOGISCHER STATUS

Blutagar + Baird Parker Agar



Phänotypische Charakterisierung

- Typisch: Hämolyse, Eigelb, Tellurit
- Atypisch: keine/schwache Hämolyse, Eigelb negativ

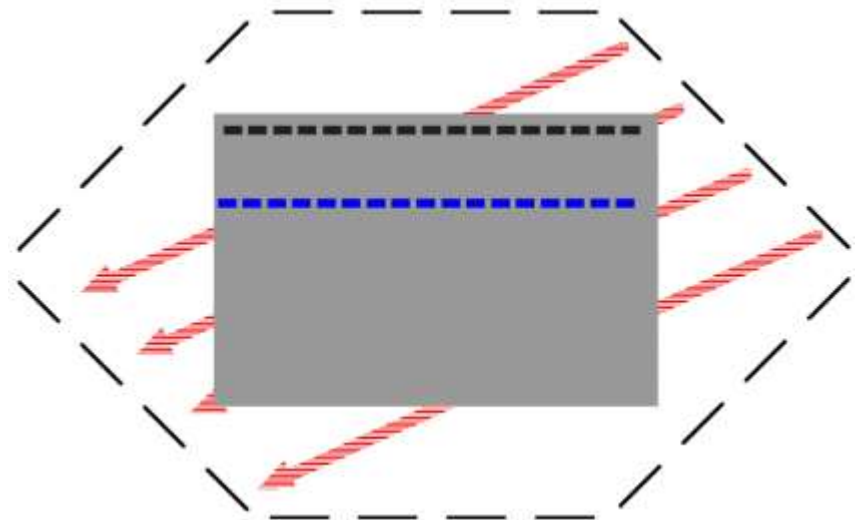
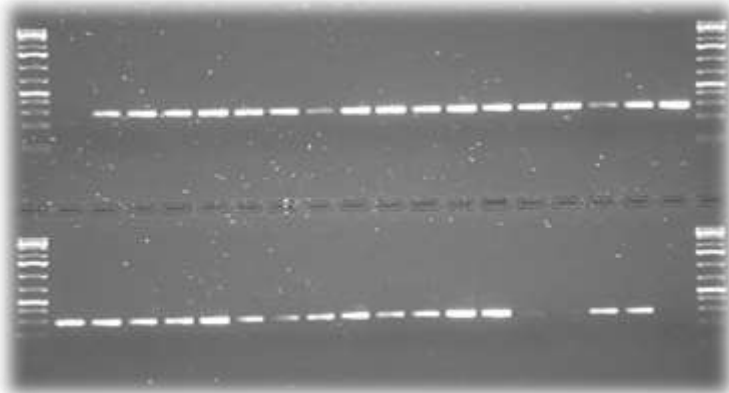
Bestätigung

- Coagulase Test
- Clumping Factor
- Lecithinase
- API ID 32 Staph
- Micronaut Mastitis AB

METHODEN

GENOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG

- **nuc PCR:** Gen für Theronuclease (Brakstadt,1989)
- **Multiplex Toxin PCR:** *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei* and *sej*, (Gonano et al., 2009)
- **Subtypisierung:** Makrorestriktionsverdau *SMAI* +Pulsgelelektrophorese



RESULTATE



PROBEN n=193:

Eutergesundheit

■ 2 Betriebe *S. aureus positive Tiere*

Ø Individuelle Zellzahl/ml

<100.000 52.3 %

ohne Auffälligkeiten 28.1%

100.000- 500.000 39.5%

>500.000 8.2 %

Ø Herdenzellzahl

301.193 Zellen/ml

Tankmilchproben

GKZ $8,45 \times 10^3$ und $1,47 \times 10^5$
Keimen/ml

innerhalb der gesetzlichen Norm der
EU Verordnung 853/2004.

Betrieb	Coliforme/ml	Hefen/ml	Schimmel/ml	Staphylokokken T	Staphylokokken AT
A	2,77E+02	1,81E+02	1	5,00E+00	2,70E+01
B	2,76E+04	4,64E+03	3,24E+01	2,7E+01	4,33E+02
C	4,6E+03	3,0E+01	2,0E+00	5,3E+03	1,1E+02
D	1,60E+02	1,40E+01	2,0E+00	4,0E+00	6,40E+01
E	2,4E+04	2,5E+02	6,00E+00	1,0E+01	1,55E+04
F	2,44E+04	4,45E+03	1,1E+01	6,3E+01	3,00E+04
G	7,5E+02	2,2E+01	2,7E+00	9,8E+01	5,60E+03
H	1,4E+03	2,1E+01	5,0E+00	6,0E+01	n.a.

RESULTATE



PROBEN n=193:

Eutergesundheit

- 2 Betriebe *S. aureus* mehrere positive Tiere
- KNS in 6 Betrieben
- *S. uberis* in 5 Betrieben
- *E. coli* sporadisch: 3 Betriebe

Tankmilchproben

GKZ $8,45 \times 10^3$ und $1,47 \times 10^5$

Keimen/ml

innerhalb der gesetzlichen Norm der EU Verordnung 853/2004.

Ø Individuelle Zellzahl/ml

<100.000 52.3 %

ohne Auffälligkeiten 28.1%

100.000- 500.000 39.5%

>500.000 8.2 %

Betrieb	Coliforme/ml	Hefen/ml	Schimmel/ml	Staphylokokken T	Staphylokokken AT
A	2,77E+02	1,81E+02	1	5,00E+00	2,70E+01
B	2,76E+04	4,64E+03	3,24E+01	2,7E+01	4,33E+02
C	4,6E+03	3,0E+01	2,0E+00	5,3E+03	1,1E+02
D	1,60E+02	1,40E+01	2,0E+00	4,0E+00	6,40E+01
E	2,4E+04	2,5E+02	6,00E+00	1,0E+01	1,55E+04
F	2,44E+04	4,45E+03	1,1E+01	6,3E+01	3,00E+04
G	7,5E+02	2,2E+01	2,7E+00	9,8E+01	5,60E+03
H	1,4E+03	2,1E+01	5,0E+00	6,0E+01	n.a.

RESULTATE



Melkhygiene

- nur in 2 der 8 untersuchten Betriebe eine signifikante Reduktion von Indikatorbakterien durch die Melkanlagenreinigung KNS und Coliforme waren jene Keim, die bei unzureichender Reinigung am häufigsten nachgewiesen wurden.



Milchfilter

wurden sowohl die bei der Untersuchung der Viertelgemelksproben bereits nachgewiesenen Mastitiserreger als auch Keime, die auf eine Kontamination im Laufe der Milchgewinnung zurückzuführen sind (*S. chromogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* und *E.coli*), gefunden.

RESULTATE



PATHOPROOF PCR SCREENING

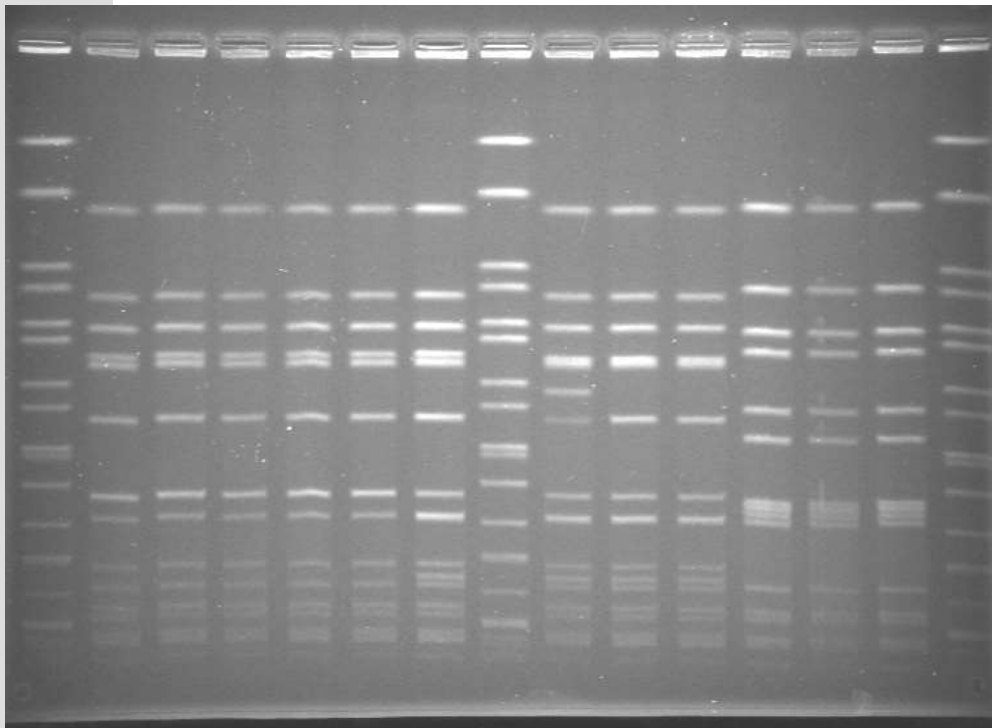
n=129 Sammelgemelke/Viertelgemelke

n=8 Tankmilchproben im Duplikat

- Leitkeime wurden alle detektiert; semiquantitativ bewertbar
- Bei negativer BU-Hinweis auf *Corynebacterium bovis*
Staphylococcus spp, *Arcanobacterium pyogenes* and/or
Peptoniphilus indolicus
- erhöhte Zellzahl in Kombination mit Pathoproof. gutes
Hilfsmittel für Bakteriologische Nachuntersuchung

Subtypisierung-RESULTATE

GENOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG



S. aureus Isolate

3 Betriebe: *S. aureus* (n=32)

*Viertelgemelksproben

*Tankmilch

*Betrieb 3, 6: *S. aureus* PFGE Typ 1

häufig vorkommend bei
subklinischen Mastitiden

menschlichen Nasenschleimhaut

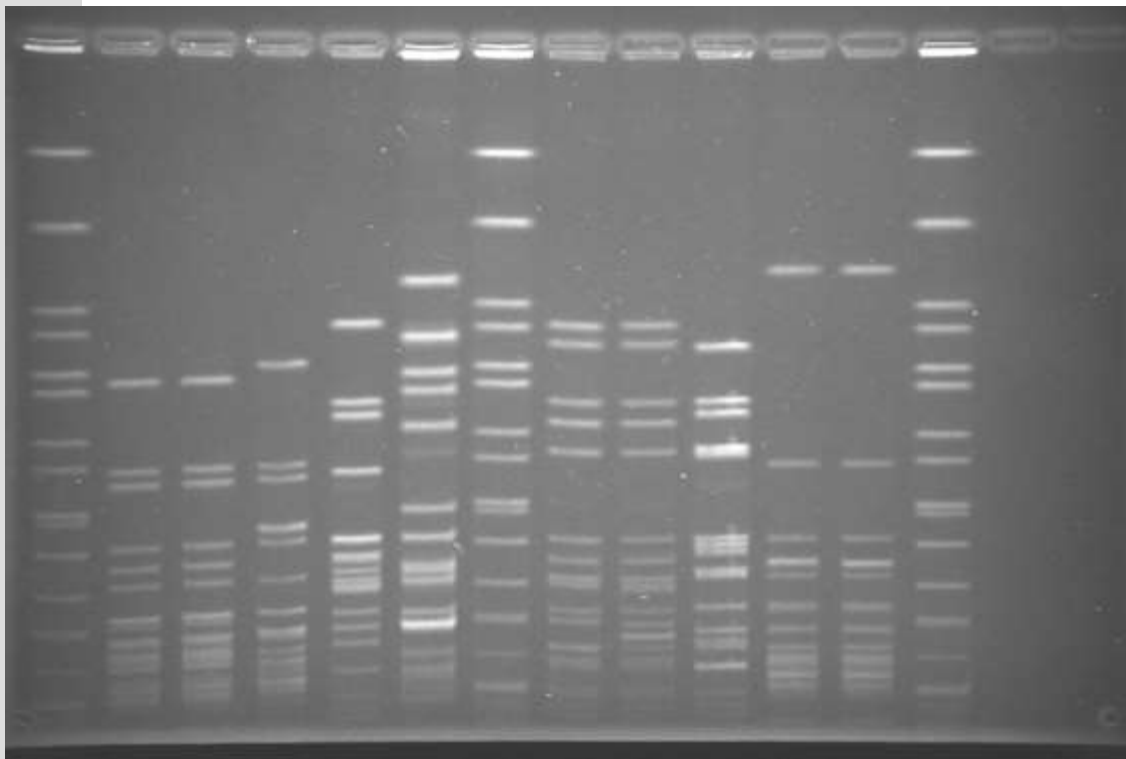
spa-Typ t2953

*In Betrieb 8 :1 Kuh und Tankmilch
PFGE Typ 2

Abb. 8: PFGE Bild des dominanten *S. aureus* PFGE Typs 1 mit zwei Varianten (ST 1, ST2) und des PFGE Typs 2.

Subtypisierung-RESULTATE

GENOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG



KNS Isolate

In zwei Betriebe (1 und 2)
27 Staphylococcus spp.

ET+TM

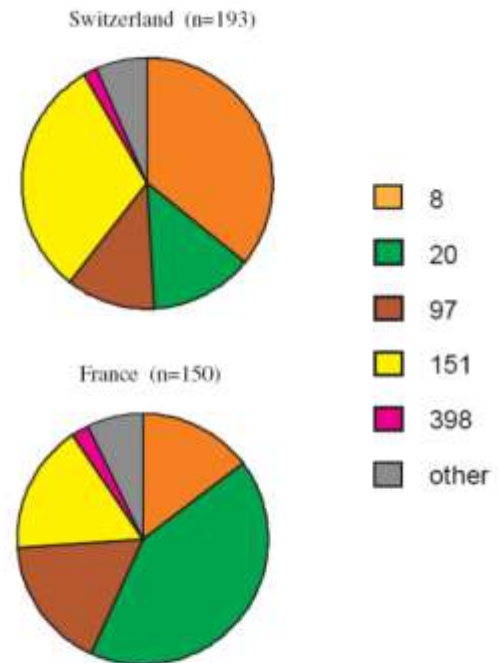
S. chromogenes, S.
epidemicus, S. hyicus, S.
intermedius und S. xylosus.

Smal: heterogene Profile

Abb. 9: PFGE Bild verschiedener Koagulase-negativer Staphylokokken des Betriebs A.

DISKUSSION

spa type	SSR profile	Sequence Type
t2953	11-12-21-17-34-24-34-22-25-25	ST8
t337	07-16-23-23-02-12-23-02-34	n.d.
t056	04-20-12-17-20-17-12-17-17	ST101
t524	04-17	ST71
t044	07-23-12-34-34-33-34	ST97
t084	07-23-12-34-34-12-12-23-02-12-23	ST15
t3196	07-23-21-34	ST97
t521	07-23-12-21-17-34-34-34-34-33-34	ST746
t359	07-23-12-21-17-34-34-33-34	ST97
t529	04-34	ST504
t2453	07-23-12	n.d.
txAA	11-17-34-24-34-22-25-25	n.d.
txAB	04-20-17-24-31-24	ST1380
txAC	12-21-17-34-24-34-22-25-25	n.d.



Sakwinska et al., 2011

AUSBLICK

- **Pathoproof Evaluierung an Sammelgemelken**
- **Abklärung des dominanten spa Typs t2953/MLST Typ 8**
Vergleich mit vorhergehenden Studien im Rahmen des EU Projekts
BIOTRACER: regionales Vorkommen Schweiz, Vorarlberg, Italien bei
subklinischen und klinischen Mastitiden
- **Empfehlungen zur Verbesserung der Verarbeitungs- und US-Protokolle**
zur Minimierung der *S. aureus* Belastung

CONCLUSION

Pathoproof geeignet:

- **_zum Vorscreening in der Tankmilch**
- **Zim Vorscreening aus gepoolten Viertelgemelksproben**
- **Bei Problemställen zur Erkennung von Mehrfachinfektionen**
- **Sehr teuer für Routineeinsatz+technische Skills notwendig**

**Epidemiologische Abklärung bei S. aureus, KNS und Sc. Uberis
Infektionen nützlich**

Aufbau von Profildatenbanken zur Therapieerleichterung

DANKSAGUNG



Dr. med. vet. Martina Baumgartner
Prof. Martin Wagner
Bsc. Sonja Klinger
Anna-Lena Fürstenberger