

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Schmidt, Andree: Differenzierung von Hefen aus Milchproben von Kühen mit klinischen und subklinischen Mastitiden und aus Tupferproben von der Melkanlage

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zum Vorkommen und zur Speziesdifferenzierung von Hefen in Milchproben von Kühen mit klinischen und subklinischen Mastitiden und in Tupferproben von der Melkanlage angestellt.

Es wurden retrospektive Auswertungen von 16562 Milchproben und 1203 Melkanlagentupferproben durchgeführt. 6728 Milchproben und 936 Melkanlagentupferproben waren von verschiedenen praktizierenden Tierärztinnen und Tierärzten aus dem norddeutschen Raum eingeschickt worden (Gruppe 1). 9834 Milchproben und 267 Melkanlagentupferproben kamen aus epidemiologischen Verlaufsuntersuchungen des Arbeitsbereiches Bestandstiermedizin der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes (Gruppe 2). Zielsetzung war zum einen, Aussagen über die Häufigkeit des Auftretens von Hefen in diesen Proben zu treffen. Andererseits fand bei den hefepositiven Proben eine epidemiologische Einordnung anhand der weiteren zytologisch-mikrobiologischen Befunde aus der Diagnostik statt.

1. 6,03% der Milchproben und 31,92% der Melkanlagentupferproben enthielten Hefen. In der Gruppe 1 waren 12,32% der Milchproben und 36,00% der Melkanlagentupfer hefepositiv, dagegen in Gruppe 2 nur 1,73% der Milchproben und 17,60% der Anlagentupferproben.
2. Mehr als 75% der kulturell hefepositiven Milchproben aus Gruppe 1 stammten von Tieren mit klinischen Mastitiden, dagegen kamen nur knapp 15% der kulturell hefepositiven Proben dieser Gruppe von Kühen mit subklinischen Mastitiden. Für die Gruppe 2 waren die Unterschiede nicht so extrem ausgeprägt. Hier stammten lediglich etwas mehr als 51% der kulturell hefepositiven Milchproben von Kühen, die an einer klinischen Mastitis erkrankt waren, aber immerhin mehr als 28% der hefepositiven Proben dieser Gruppe kam von Tieren mit subklinischer Mastitis.

3. Es zeigte sich, dass rund 51% der hefepositiven Proben aus Gruppe 1, die von Kühen mit klinischen Mastitiden entnommen worden waren, neben Hefen auch noch einen Gehalt an unspezifischen Keimen aufwiesen. Bei den hefepositiven Proben der Gruppe 1, die von Kühen mit subklinischer Mastitis kamen, enthielten knapp 47% Hefen zusammen mit einem unspezifischen Keimgehalt. In gut 85% der hefepositiven Proben aus Gruppe 2, die von Tieren mit klinischer Mastitis stammten, wurden Hefen in Reinkultur gefunden. Der alleinige Nachweis von Hefen gelang auch in fast 98% der hefepositiven Proben aus Gruppe 2, die von Tieren mit subklinischer Mastitis stammten.
4. Von den hefepositiven Melkanlagentupferproben der beiden Gruppen 1 und 2 waren aus 4,75% (Gruppe 1) bzw. 4,26% (Gruppe 2) Hefen in Reinkultur zu erhalten. 65,88% (Gruppe 1) bzw. 48,94% (Gruppe 2) der hefepositiven Anlagentupfer enthielten Hefen im Rahmen eines Gehaltes an unspezifischen Keimen. Dieser Umstand war auf das ubiquitäre Vorkommen von Hefen auch auf den Oberflächen der Melkanlage zurückzuführen.
5. Die dargestellten Unterschiede in den Ergebnissen erklären sich dadurch, dass prinzipimmanent bei den Betrieben, die vom Arbeitsbereich Bestandtiermedizin aufgesucht worden sind (Gruppe 2), mehr subklinische Mastitiden erfasst wurden und andererseits die Probenentnahme der Milch- und Tupferproben unter standardisierten Bedingungen erfolgte.
6. Eine spezielle Betrachtung der eingesandten Milch- und Melkanlagentupferproben der 22 Betriebe, die für die Hauptversuchsreihe ausgewählt worden waren, bestätigte die oben erhaltenen Ergebnisse.

Unter Verwendung des ID 32 C® -Identifizierungssystems für Hefen (Fa. bioMérieux, Nürtingen) in Kombination mit der Prüfung des Wachstumsverhaltens auf Reisagar bei 25°C bzw. auf „Hamburger-Test“-Agar (HT-Agar) bei 37°C wurde in einer Vorversuchsreihe die Speziesdifferenzierung von Hefeisolaten aus 60 Milchproben und 19 Melkanlagentupferproben (Milchproben und Melkanlagentupferproben von verschiedenen Milchviehbetrieben) angestrebt, um einen ersten Überblick über das Spektrum der vorkommenden Hefearten zu erhalten.

1. Bei 63,33% der Isolate aus den Milchproben und 57,89% der Isolate aus den Tupferproben führte die Speziesdifferenzierung zum Erfolg.
2. Die Hefen aus den Milchproben gehörten 12 verschiedenen Arten an. Am häufigsten wurde *Candida (C.) kefyr* identifiziert. 9 verschiedene Hefespezies wurden bei den Melkanlagentupferproben identifiziert. Mit mehr als einem Drittel der differenzierten Isolate war *C. famata* hier die vorherrschende Hefespezies.

Für die Hauptversuchsreihe wurden 144 Hefeisolate (75 aus Milchproben und 69 aus Melkanlagentupferproben) von 22 Milchkuhbetrieben (von einem jeweiligen Milchviehbetrieb mindestens ein Hefeisolat von einer Milchprobe und mindestens ein Hefeisolat von einer Melkanlagentupferprobe vorliegend) ausgesucht und zunächst mit den oben erwähnten Methoden (ID 32 C®- Test in Kombination mit den Wachstumsprüfungen) untersucht. Hier konnten 62,67% (n=47) der Isolate aus Milchproben und 66,67% (n=46) solcher aus Anlagentupferproben erfolgreich speziesdifferenziert werden.

Bei 51 der 144 Hefeisolate (28 Milchproben und 23 Anlagentupferproben) misslang der Versuch einer Speziesdifferenzierung der daraus isolierten Hefen mit den erwähnten Methoden. Hier wurde die Identifizierung der Spezies mit der konventionellen Methode der Hefedifferenzierung angestrebt. In 39 Fällen (22 Milchproben, 17 Anlagentupferproben) war es mit diesem Komplex an Untersuchungsverfahren möglich, die Hefespezies zu bestimmen.

12 (8,33%) der 144 Hefeisolate mussten auch nach Abschluss der konventionellen Verfahren als „nicht speziesidentifiziert“ angesehen werden.

Als weitere Ergebnisse der Hauptversuchsreihe sind festzuhalten:

1. Bei den Milchproben dominierten *Cryptococcus (Crypt.) curvatus* und *C. krusei* mit je 9 Nachweisen. *C. parapsilosis* war die vorherrschende Hefespezies bei den Melkanlagentupferproben, sie wurde hier 10mal isoliert.
2. Der überwiegende Teil (56%) der Hefespezies aus Milchproben und Melkanlagentupfern der 22 Hauptversuchsbetriebe zeigte auf Reisagar eine Bildung von Pseudomycel, ein Wachstum bei 37°C auf HT-Agar, aber keine Befähigung zur aeroben Lactoseassimilation. Anscheinend spielt die in der Milch enthaltene Lactose als Wachstumsfaktor für diese fakultativ pathogenen Hefen keine entscheidende Rolle. Grundsätzlich muss die Mehrzahl der Hefespezies, die aus Milch- und Anlagenproben

isoliert werden, als für das Euter pathogen angesehen werden, sofern eine Invasion in das Milchdrüsensystem stattfindet.

3. Für 27,27% (n=6) der 22 Hauptversuchsbetriebe konnten Übereinstimmungen von Hefespezies zwischen Milchproben und Melkanlagentupferproben ermittelt werden. Daher kann man prinzipiell unabhängig von der Mastitisrelevanz der identifizierten Hefespezies von der Möglichkeit einer Übertragung und Verbreitung von Hefen über die Melkanlage ausgehen.

## SUMMARY

Schmidt, Andree: Differentiation of yeasts from milk samples of cows with clinical and subclinical mastitis and from swab samples of the milking machine

In this study, the occurrence as well as the identification of various species of yeasts from milk samples of cows with clinical and subclinical mastitis and from swab samples of the milking machine, were investigated.

16,562 milk samples and 1,203 swab samples were investigated, retrospectively. 6,728 milk samples and 936 swabs had been collected by practicing veterinarians under unknown field conditions (group 1). On the other hand, 9,834 milk samples and 267 swabs had been collected by the Production Medicine Group, School of Veterinary Medicine Hannover, under controlled conditions (group 2). From the results it was possible to determine the frequency of yeasts in these samples. Moreover, with regard to the results of the microbiological investigation of the samples, an estimation of a possible epidemiological importance of yeast findings from the samples was made.

1. From 6.03 per cent of the milk samples and from 31.92 per cent of the swab samples yeasts were isolated. In group 1, 12.32 per cent of the milk samples and 36.00 per cent of the swab samples were tested positive for yeasts. In group 2 on the other hand, frequency of yeasts was only 1.73 per cent in milk samples and 17.60 per cent in swabs, respectively.
2. More than 75 per cent of the yeast positive milk samples of group 1 had been taken from quarters with clinical mastitis. In contrast, more than 28 per cent of the milk samples of group 2 containing yeasts had been collected from subclinical cases of mastitis.
3. Concerning group 1, 51 per cent of the milk samples collected from quarters with clinical mastitis and 47 per cent of those collected from quarters with subclinical mastitis contained yeasts in connection with other unspecific microbiological agents. In group 2, 85 per cent of the milk samples collected from quarters with clinical

mastitis and nearly 98% of the milk samples collected from quarters with subclinical mastitis yielded yeasts in pure cultures.

4. In 4.75 per cent (group 1) and 4.26 per cent (group 2), respectively, of the swab samples yeasts were found in pure cultures. 65.88 per cent (group 1) and 48.94 per cent (group 2), respectively, of the swabs contained yeasts in connection with other unspecific microbiological agents. This result refers to the fact that yeast organisms are usually common in the environment even on the different surfaces of the milking machine.
5. The differences in the results between group 1 and 2 can be explained by the fact that the milk samples were collected under better hygienic conditions in group 2 than in group 1.
6. The results were confirmed by an investigation considering the milk and swab samples of the 22 dairy farms chosen for the main experiments.

Species identification of yeasts from milk samples and from swab samples of the milking machine was carried out using the ID 32 C® identification system (bioMérieux company, Nürtingen, Germany). This assay was supplemented with investigations regarding the growth behaviour of yeasts on rice extract agar and on “Hamburger-Test”-Agar (HT-Agar) at a temperature of 37 degrees Celsius.

Pre-experiments with 60 milk samples and 19 swab samples (milk samples and swabs from different farms) were started in order to get a survey of the various species of yeasts.

1. 63.33 per cent of yeast isolates from milk samples and 57.89 per cent of such from swab samples were successfully identified to the species level.
2. Yeasts from milk samples belonged to 12 different species. The most identified species was *Candida (C.) kefyr*. On the other hand, yeasts from swab samples of the milking machine belonged to 9 different species, of which *C. famata* was the most identified species.

In the main experiments (milk samples and swabs from the same farms), 144 yeast isolates from 75 milk samples and 69 swab samples of 22 dairy farms were investigated by the described methods. 62.67 per cent (n=47) of yeast isolates from milk samples and 66.67 per cent (n=46) of such from swab samples were successfully identified.

51 yeast isolates (28 milk samples and 23 swab samples) could not be identified by the described methods. Using the common assimilation and fermentation methods striving for species identification, 39 yeast isolates (22 milk samples, 17 swab samples) were successfully identified.

However, 12 (8.33 per cent) of the 144 yeast isolates could not be identified at all.

Further results:

1. The most identified species from the milk samples were *Cryptococcus (Crypt.) curvatus* and *C. krusei*. *C. parapsilosis* was the dominating species isolated from swab samples.
2. The majority of the yeasts (56 per cent) from milk and swab samples of the 22 dairy farms revealed formation of pseudomycelium and growth at 37 degrees Celsius, but there was no ability to assimilate lactose under aerobic conditions. Unexpectedly, lactose does not seem to be an important growth factor for facultative pathogenic yeasts. From these results, it turned out that most of the isolated yeasts must be considered as pathogens, once they manage to invade the udder.
3. In 6 of the 22 dairy farms (27.27 per cent), yeast species from milk samples were in accordance with yeast species from swab samples of the milking machine. From this result the conclusion can be drawn that there is a possibility of transmission of yeasts by the milking machine among quarters of various cows.