Tierärztliche Hochschule Hannover

Untersuchung der Effekte eines evidenzbasierten Therapie- und Beratungskonzeptes auf die Eutergesundheitssituation in einem Milchviehbestand

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Jan Kock

Vechta

Hannover 2019

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Volker Krömker

Hochschule Hannover

Fak. II, Abt. Bioverfahrenstechnik – Mikrobiologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Krömker
2. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Kietzmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2019

Meinen Eltern in tiefster Dankbarkeit gewidmet

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits auf folgenden Tagungen und in folgenden Journalen vorgestellt, bzw. veröffentlicht:

Kock, J.

Mastitisschnelldiagnostik mit Rapid-Petrifilm™

Vortrag auf dem Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover unter dem Motto „Mastitisnachmittag: Forschung für die Praxis“ am 17.03.2017

Kock, J.

Ergebnisse zur Anwendung von Petrifilm™ als Schnelltestsystem in der Mastitistherapie

Vortrag auf der 42. Leipziger Fortbildungsveranstaltung: „Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung“ am 16.06.2017

Kock, J., N. Wente, Y. Zhang, J.-H. Paduch, S. Leimbach u. V. Krömker

Accuracy of 12h-PetrifilmTM-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany

Millk Science International 71, 10-13

Kock, J., N. Wente, Y. Zhang, J.-H. Paduch, S. Leimbach, D. Klocke, C.C. Gelfert u. V. Krömker

Udder health effects of an evidence-based mastitis therapy concept in Northwestern Germany

Milk Science International, 71, 14-20

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Publikation I - Accuracy of 12h-Petrifilm™-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany 11
3. Publikation II - Udder health effects of an evidence-based mastitis therapy concept in northwestern Germany 16
4. Diskussion 24
   4.1. Schnelltestkonzept 3M™ Petrifilm™ 24
   4.2. Selektive Mastitistherapie 28
5. Zusammenfassung 34
6. Summary 38
7. Literaturverzeichnis 42
8. Danksagung 47

1. Einleitung

Die Entzündung des bovinen Eutergewebes (Mastitis) ist eine der häufigsten Erkrankungen der Milchkühe in der konventionellen Milchviehhaltung (Pol und Ruegg, 2007; Lam et al., 2013; Schukken et al., 2013). Dabei handelt es sich um eine Entzündung der Milchdrüse, deren Ursache infektiöser, traumatischer oder toxischer Natur sein kann (Krömker, 2007). Bei den Mastitiden gibt es zwei Erscheinungsformen, die, abhängig von Vorhandensein von sinnlich verändertem Sekrets, in klinische und subklinische Mastitis unterteilt werden. Diese können jeweils, abhängig vom Übertragungsweg und dem Erregerreservoir, einer kontagiösen und einer umweltassoziierten Gruppe von Erregern zugerechnet werden (Gomes und Henriques, 2015). Therapeutische Ansätze richten sich vorwiegend auf die Behandlung klinischer Euterentzündungen, die mit steigendem Schweregrad auch mit Entzündungssymptomen am Euter und Allgemeinstörungen einhergehen können (DVG, 2002). Um eine Entzündung möglichst schnell und effektiv zu bekämpfen, wird auf vielen Betrieben eine antibiotische Therapie eingeleitet. Viora et al. (2014) kamen in ihrer Studie zu der Erkenntnis, dass es in Europa durchaus üblich ist, nahezu alle klinischen Mastitiden mit einem Antibiotikum zu behandeln. Eine Studie von Pol und Ruegg (2007), die auf Betrieben in den USA durchgeführt wurde, stützt diese Aussage. Dort zeigte sich, dass 94% aller in der Studie untersuchten klinischen Mastitiden, antibiotisch behandelt wurden. Die Art der Behandlung ist bei dieser Art der Therapie zumeist auf empirische Beobachtungen der Mitarbeiter gestützt (McCarron et al., 2009). Von mehreren Autoren wird beschrieben, dass als Therapeutikum in erster Linie ein intramammär verabreichtes, breitwirksames Antibiotikum verwendet wird, um möglichst alle ursächlichen Erreger eliminieren zu können (Pol und Ruegg, 2007; Hill et al., 2009). Hill et al. (2009) haben den Antibiotika-Einsatz noch genauer untersucht

und konnten zeigen, dass zur Therapie von klinischen Mastitiden am häufigsten Cephalosporine eingesetzt werden (Hill et al, 2009). In einer Studie von Saini et al. (2012) konnte hingegen gezeigt werden, dass auf 94% der untersuchten Betriebe in Kanada intramammäre Penicillin-Kombinationen zur Therapie von klinischen Mastitiden zur Anwendung kamen.

In der heutigen Zeit steht der Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung innerhalb der Gesellschaft jedoch immer häufiger in der Kritik (Barza et al., 2002). Die Inzidenz der klinischen Mastitis wurde in neueren Untersuchungen zwischen 27 bis 40 Fälle pro 100 Kühe angegeben (Bradley et al., 2007; Lam et al., 2013; Santman-Berends et al., 2015). In einer Studie aus dem Jahr 2009 wurde berichtet, dass ca. 90% aller klinischen Mastitiden antibiotisch versorgt wurden (Hill et al., 2009). Mit neueren Therapiestrategien ist es allerdings möglich, den Antibiotikaeinsatz zu minimieren. Studien konnten zeigen, dass bei rund einem Drittel der Mastitiden kein Erreger isoliert werden konnte und somit eine antibiotische Therapie nicht gerechtfertigt ist (Mansion-de Vries et al., 2016). Schon 2013 ist eben diese Häufigkeit der Antibiotikatherapie ein Grund, weshalb in naher Zukunft die Nutzung von Antibiotika in der Milchviehhaltung stärker reguliert werden könnte (Merle et al., 2013). In der Rindermast wird bereits ein Monitoring angewendet, welches den Einsatz von Antibiotika dokumentiert (staatliche Antibiotikadatenbank, Arzneimittelgesetz, 16. AMG Novelle). Der öffentliche Druck führt zusammen mit den Erkenntnissen aus Studien, die zeigen konnten, dass die Heilungswahrscheinlichkeit nicht in allen Fällen positiv mit der Antibiotikamenge korreliert sind, zu der Überlegung, andere Therapiemöglichkeiten zu etablieren.

Jeder Einsatz von Antibiotika kann zur Bildung von Resistenzen beitragen, was einem natürlichen Vorgang in der Natur entspricht. Durch die Abtötung der empfindlichen Bakterien, können sich gegen das Antibiotikum resistente Stämme rasanter

vermehren. Durch einen Transfer der Resistenzgene auf andere Bakterien, kann es dazu kommen, dass antibiotische Formulierungen ihre Wirksamkeit gegen Bakterien verlieren (Lewy and Marshall, 2004). Besonders kritisch ist dies bei Stoffen, die sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin ihre Anwendung finden. Durch die Übertragung von Resistenzgenen auf humanpathogene Erreger kann es in kritischen Fällen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber mehreren Antibiotika kommen (Lewy and Marshall, 2004). Die Tiermedizin ist somit neben der Humanmedizin und vielen anderen Bereichen, in der Pflicht zukunftsfähige Alternativen in der Behandlung bakterieller Infektionen zu entwickeln, um ein Voranschreiten der Resistenzbildung zu vermeiden.

Einige Studien (Guterbock et al., 1993; Roberson, 2012; Suojala et al., 2010; Hoe und Ruegg, 2005; Lago et al., 2011a; Poutrel et al., 2008) konnten zeigen, dass durch gramnegative bakterielle Erreger ausgelöste Mastitiden eine hohe Selbstheilungstendenz besitzen. Lago et al. (2011b) bezogen zudem die Langzeiteffekte, wie die Rezidivrate und das Ausscheiden aus der Herde nach einer überstandenen klinischen Mastitis mit ein. Ein Therapiekonzept, bei dem klinische Mastitiden, verursacht durch gramnegative Erreger, nicht antibiotisch behandelt wurden, zeigte keine Unterschiede in den Heilungsraten und Langzeiteffekten im Vergleich zu einer herkömmlichen Therapie, bei der alle Mastitiden antibiotisch versorgt wurden. Ähnlich verhält es sich mit Euterentzündungen, bei denen kein Erreger in einer kontaminationsfrei gewonnenen Milchprobe nachgewiesen worden ist (Lago et al., 2011b). Dies stützt die Aussage von Roberson (2003), dass der Antibiotikaeinsatz in vielen Fällen auf grampositive Erreger beschränkt sein sollte. Breiten sich die Erreger der Mastitis jedoch im Körper des Tieres aus, kann dies zu

einer systemischen Erkrankung mit Fieber, Inappetenz oder Teilnahmslosigkeit führen, bei der das Leben des Tieres bedroht ist. Bei diesen schweren, akuten Fällen ist eine Flüssigkeitstherapie zur Behandlung der Endotoxinämie das Mittel der Wahl. Unterstützend kann ein nicht-steroidaler Entzündungshemmer (**NSAID**) verabreicht werden, um einen antiinflammatorischen Effekt erzielen zu können (McDougall et al., 2009). Eine Antibiose ist von zweithöchster Bedeutung und kann, unabhängig vom verursachenden Erreger, systemisch verabreicht werden, um die Bakteriämie zu bekämpfen (Wenz et al., 2001; Roberson, 2012; Erskine et al., 2003). Die Feststellung des Schweregrades der Mastitis ist somit in die Therapieentscheidung immer miteinzubeziehen.

Das Konzept der selektiven Mastitistherapie, bei der jede Kuh individuell therapiert wird, beruht auf einer Bewertung der kuh- und betriebsindividuellen Faktoren. Unter Berücksichtigung wissenschaftlicher Erkenntnisse werden Behandlungsentscheidungen für jeden einzelnen Patienten getroffen (Sackett et al., 1996). Für die Therapie der klinischen Mastitis bedeutet dies, dass sowohl der Einfluss des Erregers, als auch die kuhindividuellen Faktoren in der Therapie beachtet werden sollen (Mansion-de Vries et al., 2016). So wird die Therapiewürdigkeit eines jeden Tieres anhand der somatischen Zellzahlen in der Milch, der Anzahl der vorangegangenen Mastitiden in der laufenden Laktation, sowie des Schweregrades der Mastitis beurteilt (Ziesch u. Krömker, 2016; Degen et al., 2015; Roberson, 2012; Barkema et al., 2006). Der Erfolg einer antibiotischen Therapie ist ebenfalls abhängig von der Zellzahl in der Milch und möglichen Vorerkrankungen. Die Heilungsraten sind beispielsweise bei Kühen mit niedrigeren Zellzahlen höher (Swinkels et al., 2013), so dass bei Kühen mit hohen Zellzahlen der Antibiotikaeinsatz abgewogen werden sollte. Ebenso betrifft dies Kühe, die schon mehrfach eine Euterentzündung in der laufenden

Laktation hatten, denn die Anzahl an vorherigen Mastitiden kann einen negativen Einfluss auf die Heilung haben (Pinzón-Sánchez und Ruegg, 2011; Sol et al., 2000; Deluyker et al., 2005). Swinkels et al. (2013) untersuchten zudem die Effekte einer verlängerten Therapie von klinischen *Staphylococcus aureus* - Mastitiden und konnten keine Verbesserung der bakteriologischen Heilung durch eine verlängerte Therapie (fünf Tage) im Vergleich zu einer konventionellen Therapie (anderthalb Tage) feststellen. Unabhängig davon werden nicht antibiotisch behandelte Kühe mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern (**NSAID**) behandelt. Dies soll sowohl die klinische Heilung und die Senkung der Zellzahl unterstützen, als auch das Merzungsrisiko senken (Mansion de Vries et al., 2015; McDougall et al., 2009). Gleichzeitig werden die Kühe vor überflüssigen Schmerzen, Leiden oder Schäden bewahrt, wodurch ein aktiver Beitrag zum Tierschutz geleistet wird.

Die intramammäre Therapie von klinischen Mastitiden sollte immer auf der Basis von kulturellen Untersuchungen erfolgen (Roberson, 2012). Die mikrobiologische Kultur, die aus einer kontaminationsfrei entnommenen Viertelanfangsgemelksprobe einer euterkranken Kuh gewonnen wird, erscheint aufgrund ihrer Aussagekraft am ehesten geeignet. Durch den Transport in das Labor, den Ansatz und anderer etwaiger Zeitverzögerungen verstreichen allerdings einige Tage bis das Ergebnis vorliegt (Neeser et al., 2006). Eine etwaige Therapie kann somit nur verzögert starten. Die Kosten, die durch eine kulturelle (zytomikrobiologische) Milchprobenuntersuchung entstehen, belaufen sich auf ca. 12 € pro Probe. Diese enthalten sowohl die Untersuchungs- als auch die Transportkosten. Da viele Betriebe auch nach Erhalt des Probenergebnisses keine Anpassung der Therapie vornehmen, ist ihnen der Aufwand häufig zu hoch (Neeser et al., 2006). Diese Kosten addieren sich zu den restlichen, durch die Euterentzündung entstehenden, Kosten. Diese entstehen vorwiegend durch

Ablieferungssperren für Milch, die nicht den Qualitätskriterien entspricht oder medikamentöse Rückstände enthält. Weitere Kosten entstehen durch die tierärztliche Behandlung. Zudem bleibt die Milchleistung während und nach einer Erkrankung hinter der eines gesunden Euters zurück. Neben den genannten Punkten können weitere Verluste durch Sekundärerkrankungen oder dem Verlust des Tieres entstehen. Ein wesentlicher Aspekt ist allerdings das frühe Ausscheiden aus der Herde aufgrund einer verminderten Milchleistung, so dass man diese Kuh durch eine junge Färse ersetzen muss. Diese Remontierungskosten betragen rund 35% der Kosten einer Mastitis (Krömker, 2007).

Eine mögliche Lösung, mit der sich Zeit und Geld einsparen ließen, wäre ein Diagnostikum, welches vor Ort eine schnelle Erregergruppenidentifizierung vornimmt, um im Anschluss eine gezieltere Therapie beginnen zu können. Dieser Nutzen und Bedarf nach einem sogenannten „on-farm test“ wird seit einiger Zeit häufiger ausgesprochen (Griffioen et al., 2016; Neeser et al., 2006; Roberson, 2012) und wurde 2015 auch von der Europäischen Kommission in ihren Leitlinien zum umsichtigen Umgang mit antimikrobiellen Stoffen aufgenommen (EU 2015/C299/04). Um fundierte Therapieentscheidungen anhand des Ergebnisses treffen zu können, sollte ein solcher Schnelltest idealerweise einfach von dem Betriebspersonal durchzuführen sein und ein schnelles Ergebnis produzieren. Zwischen Erkennen der Mastitis und Therapiebeginn gibt es somit lediglich eine kleine Verzögerung, die der Test benötigt, bis er auswertbar ist. Roberson (2003) konnte zeigen, dass man in vielen Fällen, sofern es sich um milde Mastitiden handelt, ein bis zwei Tage mit dem Therapiebeginn warten kann, ohne nachteilige Effekte befürchten zu müssen. Für einen noch späteren Therapiebeginn traf er jedoch keine Aussage. Lago et al. (2011a) haben in ihrer Versuchsgruppe bis zu 24 Stunden auf ein Ergebnis gewartet, anhand dessen sie die

milden und moderaten Mastitiden behandelt haben und dabei keine nachteiligen Effekte festgestellt. Ein ‚Abwarten' bis zum Therapiebeginn unter Landwirten zu etablieren, ist allerdings eine große Herausforderung, wie Neeser et al. (2006) durch eine Umfrage unter Landwirten in den USA herausfand.

Die Firma 3M™ Petrifilm™ (Neuss, Deutschland) bietet einen Test an, der als Schnelltest auf dem Betrieb anwendbar ist, um das Tier mit Bezug auf die Erregerklassifizierung fachgerecht behandeln zu können. Bei Anwendung der Kombination aus Rapid Aerobic Count und Rapid Coliform Count kann eine Milchprobe hinsichtlich der Erregergruppe ausgewertet werden. Die drei möglichen Testresultate nach einer aeroben Bebrütung bei 37°C sind „grampositives Wachstum", „gramnegatives Wachstum" oder „kein Erregerwachstum" anlehnend an Studien von Mansion-de Vries et al. (2014) und McCarron et al. (2009), die jeweils den Aerobic Count und Coliform Count Petrifilm™ (3M™, Neuss, Deutschland) verwendet haben. Der Unterschied zu den vorherigen Studien ist die schnellere Auswertbarkeit des Rapid-Schnelltests in dieser Studie. Beim Rapid Aerobic Count und Rapid Coliform Count ist eine Auswertung bereits nach 12 Stunden möglich, was einen Zeitgewinn von 12 Stunden im Vergleich zu dem Schnelltestsystem aus den vorherigen Studien erbringt. Somit können Tiere, die morgens beprobt wurden, am Abend bereits spezifisch anhand eines Testergebnisses therapiert werden. Ebenso schnell funktioniert ein von der Hochschule Hannover entwickelter Schnelltest (MastDecide®). Dieser besteht aus zwei Röhrchen, die mit einem Testmedium gefüllt sind, in die ein Teil der gewonnenen Milchprobe hineingegeben wird (Leimbach und Krömker, 2018). Der Test basiert auf einem Farbwechsel der Testmedien nach Bebrütung unter aeroben Bedingungen bei 37°C innerhalb von 12 Stunden. Das ursprünglich rosafarbene Testmedium verfärbt sich bei Vorhandensein eines grampositiven

Erregers in beiden Röhrchen und erscheint nach 12 Stunden weiß. Bei einem gramnegativen Erreger verfärbt sich lediglich ein Röhrchen, und bei Milchproben, die keinen Erreger enthalten, bleibt die rosafarbene Färbung bestehen.

Ziel der Arbeit war es, die Eutergesundheit auf einem Betrieb durch die Anwendung eines neuen Therapiekonzeptes zu verbessern oder zu erhalten und gleichzeitig den Einsatz von antimikrobiellen Stoffen zu reduzieren. Dabei sollte das neue Konzept hinsichtlich seiner Anwendbarkeit und Durchführbarkeit bewertet und mit der konventionellen Behandlungsmethode verglichen werden. Hierzu wurden auf einem Milchviehbetrieb in Niedersachsen die Kühe des Betriebes, die an einer klinischen Mastitis erkrankten, anhand ihrer Halsbandnummer randomisiert in je eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe unterteilt: Alle Kühe mit einer geraden Nummer gehörten zur Kontrollgruppe, alle Kühe mit einer ungeraden Nummer zur Versuchsgruppe. Die Halsbandnummer wurde zu Beginn der ersten Laktation zufällig vergeben. Die Kühe behielten diese Nummer bis zum Abgang aus der Herde. Somit war gewährleistet, dass beide Gruppen vergleichbar waren, da sie die gleiche Zusammensetzung aufweisen müssten. Von allen an klinischer Mastitis erkrankten Tieren wurden Viertelanfangsgemelksproben entnommen. Ein Teil der Milchprobe von Kühen aus der Versuchsgruppe wurde mit den 3M™ Petrifilm™-Platten (Rapid Aerobic Count-Petrifilm™, Rapid Coliform Count-Petrifilm™) vor Ort angesetzt. Der verbliebene Teil der Probe wurde im Labor der Hochschule Hannover konventionell nach DVG-Leitlinien mikrobiologisch untersucht (DVG, 2009). Die Petrifilmergebnisse wurden anschließend mit denen der konventionellen, kulturellen Diagnostik verglichen und publiziert.

Die Kontrollgruppe wurde betriebsüblich therapiert, wohingegen die Versuchsgruppe mit Hilfe eines evidenzbasierten Therapiekonzepts behandelt wurde, bei dem alle

Mastitisfälle initial mit einem NSAID versorgt wurden. Kühe mit Allgemeinstörungen erhielten zudem eine parenterale Antibiose. Eine lokale Antibiotikatherapie wurde nur verabreicht, wenn das Schnelltestergebnis einen grampositiven Erreger nachwies. Als Zielvariablen dieses randomisierten, nicht geblindeten Versuchs dienten die bakteriologische Heilungsrate, die zytologische Heilungsrate, die klinische Heilungsrate, die Rezidivrate, und das Ausscheiden aus der Herde. Dazu wurden die behandelten Tiere 14 und 21 Tagen nach Auftreten der Mastitis erneut beprobt, über einen Zeitraum von 60 Tagen nach Behandlungsende beobachtet, sowie die Daten der Milchleistungsprüfung und des Herdensicherungssystems ausgewertet.

Es wurde beabsichtigt, neue Erkenntnisse zur Diagnostik und Therapie von Eutererkrankungen bei Rindern zu erhalten. Das beinhaltet auch die Etablierung von Schnelltestsystemen in der Praxis als Schnelldiagnostikum, wobei neue Erkenntnisse zur Praxistauglichkeit und diagnostischen Vertrauenswürdigkeit der neuen Petrifilm™-Produkte der Firma 3M™ und des neu entwickelten MastDecide® erwartet wurden. Des Weiteren ist der gezielte Einsatz von NSAID als Therapiekonzept bisher nicht etabliert. In der Versuchsgruppe wurde eine Reduktion des Antibiotikaeinsatzes ohne negative Beeinflussung der therapeutischen Erfolge erwartet. Aus den Versuchen können Empfehlungen resultieren, wie sich der Einsatz von Antibiotika in der Milchviehhaltung reduzieren lässt ohne die Eutergesundheit oder das Tierwohl zu beeinträchtigen.

Die erste Veröffentlichung beschreibt die diagnostische Sicherheit des neu entwickelten Schnelltests der Firma 3M™ Petrifilm™ im Vergleich zu einer mikrobiologischen Kultur (durchgeführt nach DVG-Leitlinien, 2009). Es wird dargestellt, ob dieser Schnelltest, der nach 12 Stunden bereits ein Ergebnis liefert, eine sinnvolle Ergänzung zu der bakteriologischen Untersuchung von Milchproben ist

und ob die Resultate des Tests als Basis für eine selektive Mastitistherapie dienen können.

In der zweiten Publikation ist die Fall-Kontroll-Studie eines Therapiekonzeptes bearbeitet und ausgewertet worden. Dazu wurden alle Tiere eines großen Milchviehbetriebes, die an einer klinischen Mastitis erkrankten, in eine Kontroll- und eine Versuchsgruppe eingeteilt. Die Kühe der Kontrollgruppe erhielten je nach Schweregrad allesamt die betriebsübliche Therapie in Form eines lokal angewandten Antibiotikums. Die Kühe der Versuchsgruppe erhielten dagegen initial ein NSAID, Flunixin (Finadyne® Transdermal, MSD). Nach Auswertung der Schnelltestergebnisse erhielten alle Kühe, bei denen grampositive Erreger in der Milch nachgewiesen wurden, zusätzlich ein lokales Antibiotikum, welches aus einer Kombination von Cephapirin und Prednisolon besteht (Mastiplan® LC). Zeigten die Kühe zusätzlich zu den lokalen Entzündungserscheinungen noch systemische Anzeichen der Erkrankung in Form von Fieber, Fressunlust oder Abgeschlagenheit, so wurden sie parenteral mit Cefquinom, einem Cephalosporin der 4. Generation, (Cobactan® 2,5%) behandelt. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und das Therapiekonzept auf seine Anwendbarkeit überprüft. Ebenso können nach Abschluss der Studie Empfehlungen für die Umsetzbarkeit gegeben werden.

2. Publikation I - Accuracy of 12h-Petrifilm™-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany

Milk production

Accuracy of 12h-Petrifilm™-plates as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany

J. Kock[1], N. Wente[1], Y. Zhang[1], J.-H. Paduch[1], S. Leimbach[1], V. Krömker[1]
[1]Hannover University of Applied Sciences and Arts, Faculty II, Microbiology, Heisterbergallee 10a, D-30453, Hannover, Germany

Date submitted: 26/06/2018 *Date accepted: 08/07/2018* *Volume/Page(s): 71/10-13*

Abstract

Antibiotic resistance is a highly discussed issue in society. The use of antibiotics in livestock husbandry is critically viewed. As a result, the European commission issued guidelines for the prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine in 2015 (EU 2015/C 299/04). Thus, alternative approaches for treating cows in the future are necessary. In particular, the treatment of mastitis, the most frequent disease in the dairy industry, causes a high use of antibiotics. Implementing an on-farm test to assign mastitis pathogens to classes of pathogens (Gram-positive, Gram-negative, no bacterial growth) before treatment decisions are made provides the basis for an evidence-based mastitis therapy concept. Rapid Aerobic Count plates and Rapid Coliform Count plates of 3M™ Petrifilm™ (3M™ Neuss, Germany) were used in combination as a 12h rapid on-farm test concept. The diagnostic sensitivity and specificity were evaluated in comparison to the standard laboratory examination. 129 mastitis milk samples from the quarters with clinical mastitis by a conventional dairy farm in Germany were used for evaluation. Results were examined 12 hours after inoculating the Petrifilm™-plates. The sensitivity for Gram-positive pathogens was 93.2%. For Gram-negative pathogens it was 88.9%. The specificity was 39.0% for Gram-positive pathogens and 97.5% for Gram-negative pathogens, respectively. To get good results, training the milking personnel in taking aseptic milk samples as well as inoculating and evaluating the test is inevitable. On the basis of the results the 12h-Petrifilm™ concept can serve as a basis for treatment decisions in the evidence-based mastitis therapy in dairy herds with a low percentage of infections with eukaryotic pathogens and can complement bacteriological culture.

Keywords: dairy cow, clinical mastitis, rapid on-farm test, evidence-based mastitis therapy

Introduction

The bovine mastitis is one of the most frequent and costly diseases in dairy cattle and is often treated with antibiotics [1, 2, 3]. Nowadays, due to public concerns about using antibiotics in livestock husbandry and to avoid antimicrobial resistance, it is important to develop alternative approaches for treating cows in future. Therefore, the European commission recently issued guidelines for the prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine (EU 2015/C 299/04).

The commission advises the restrictive use of antibiotics, which should only be applied for clear indication and treatment necessary to protect the animal. In addition, the commission calls for the use of rapid tests prior to the treatment of clinical mastitis, because a forward-looking responsible use of intramammary antibiotics should be based on cultural results [4].

Some studies [5,6] have shown a high spontaneous cure rate for the mild and moderate clinical mastitis cases caused by Gram-negative pathogens, especially *Escherichia coli*. Thus, clinical mastitis cases showing abnormal milk with or without an infected udder do not benefit from an antibiotic therapy if they are caused by Gram-negative pathogens [6]. Nonetheless, it is recommended to treat clinical mastitis cases caused by Gram-positive pathogens with intramammary antimicrobial applications [6]. A therapy concept where Gram-negative mastitis cases were not given any antibiotic treatment did not differ in cure rates from a therapy where all cases were treated with antimicrobial products, similar to cases without any proof of a pathogen [7]. This confirms the statement by Roberson that the use of local antibiotics is limited to clinical mastitis cases with a Gram-positive test result [6]. Hence, distinguishing between Gram-negative and Gram-positive etiologies can reduce the use of antibiotics when selective treatment is applied [7].

3M™ (Neuss, Germany) established Petrifilm™ plates, which detect the mastitis causing pathogen (MCP) group on-farm [8]. The newly developed Rapid Aerobic Count (RAC) in combination with the Rapid Coliform Count (RCC) Petrifilm™, enables the distinction of Gram-positive MCP, Gram-negative MCP and no bacterial growth [9]. Twelve hours after inoculation, results are available and serve as a basis for an evidence-based mastitis therapy concept. This concept contributes to a reduction in antibiotic usage as well as consistent therapeutic success by only treating cows with Gram-positive test results with intramammary antibiotic compounds [7].

The results of a newly developed 12h-rapid on-farm test (Rapid Aerobic Count (RAC) and Rapid Coliform Count (RCC) of 3M™ Petrifilm™ (3M™, Neuss, Germany)) were evaluated in relation to the conventional standard method, the microbiological culture of the MCP [10, 12]. The aim of the present study was to demonstrate test characteristics on the basis of a field study on a conventional dairy farm.

Milk Science International (71) 2018 P. 10-13
ISSN 2567-9538

Material and Methods

Farm:

The study was conducted on a conventional dairy farm in Lower-Saxony, Germany, from June 2016 to January 2017. Approximately 900 lactating Holstein-Friesian cows were milked three times a day in a 32-cow rotary milking parlour with an average milk yield of 11,165 kg milk per cow and year (energy corrected milk, **ECM**). The average dairy herd improvement somatic cell count amounted to 390,700 cells/milliliter (mL). The percentage of healthy cows (cows below 100,000 cells/mL) in this period was 35.4% and the new infection rate within lactation was 32.0%. The cows were kept in a free-stall barn, being fed with a total mixed ration depending on the milk yield.

Mastitis cases:

Clinical mastitis cases were detected by forestripping done by trained milking personnel directly before milking. A clinical mastitis was defined by the appearance of abnormal milk character (clots, blood, water → mastitis grade M1 (low)), possibly with a swollen and/or heated udder (mastitis grade M2 (moderate)), or, in severe cases, accompanied by additional systemic signs of illness (e.g. fever, loss of appetite; mastitis grade M3 (high)) [5]. After detecting clinical mastitis, a quarter sample was aseptically taken.

Samples:

The quarter samples were drawn into test tubes (13 mL) with a preserving agent containing boric acid (0.5 mL Ly 20) [11]. They were taken according to the regulations of the German Veterinary Association **(GVA)** [10]. After cleaning and discarding a few milk jets the teat ends were disinfected with 70% ethanol and a few jets of milk were milked into the test tube. The milking personnel was trained in detecting clinical mastitis and taking samples. These were stored at 7°C until transportation to the laboratory twice a week. The laboratory personnel was unaware of the results of the on-farm test.

On-farm analysis with 3M™ Petrifilm™:

Two Petrifilm™ plates (3M™, Neuss, Germany), the Rapid Aerobic Count (RAC) plate and the Rapid Coliform Count (RCC) plate, were used to examine the mastitis milk samples. Milk samples were mixed and diluted 1:10 with sterile Ringer solution (Merck, Darmstadt, Germany). After thorough mixing, the dilution was added to the Petrifilm™ (1mL per plate) and spread out as described in the instruction manual (3M™ Petrifilm™). This procedure was performed twice – once for the RAC and once for the RCC. The plates were incubated for 12 hours at 37°C. According to McCarron et al. [9], five or more colonies on the Aerobic Count Petrifilm™ and 20 or more colonies on the Coliform Count Petrifilm™ were marked as a positive result. This limit value was also selected in this study for RAC and RCC. When both Petrifilm™-plates showed bacterial growth, the result was interpreted as Gram-negative MCP, whereas bacterial growth only on the RAC was detected as Gram-positive MCP. No bacterial growth was characterized on both plates.

Microbiological analysis:

A microbiological analysis of the mastitis milk samples was performed following the examination standards as described in a study of Mansion-de Vries et al. [8]. The examination followed the regulations of the GVA and the laboratory handbook of the National Mastitis Council **(NMC)** [10, 12]. Laboratory personnel plated ten microliters of a well-mixed quarter foremilk sample with a sterile loop onto the quadrant of an aesculin sheep-blood agar plate (Oxoid, Wesel, Germany). The plates were incubated for 48 hours at 37°C under aerobic conditions and examined twice, 24 and 48 hours after inoculation. The grown colonies were identified by their colony morphology, Gram staining, haemolysis patterns and their aesculin hydrolysis. Additionally, other biochemical properties like the activity of catalase, clumping factor test, Lancefield serotyping, activity of cytochrome oxidase C and oxidation-fermentation of glucose were considered for further identification. Deviating from the regulations of the German Veterinary Association, a sample was claimed positive for environmental organisms if more than five colonies were identified in the examination (standard operation procedure in the laboratory). As the examinations by Smith indicate, the limit value of ten colony-forming units/0.01mL may be too high regarding coliform pathogens [13]. We aimed to achieve a higher sensitivity because the rapid on-farm test worked with an inoculum of 0.1mL. Withal, already one colony led to a positive result for cow-associated pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* [10]. If more than two different colony types were detected in one milk sample, the sample was categorized as contaminated. Two different colony types in one sample were referred to as mixed infection.

Statistical analysis:

The data were collected in Microsoft Access and Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

The accuracy of the Petrifilm™ concept was estimated by comparing the results of the rapid test concept with those of a microbiological culture that was considered as the reference test. Therefore, the test characteristics sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, Youden`s Index and the true and apparent prevalence were calculated. The evaluation was done using a 95% confidence interval **(CI)** by WinEpiscope 2.0 (http://www.winepi.net/30.08.2017).

Results

During the study period, 142 clinical mastitis milk samples from 142

Table 1: Amount and distribution of mastitis-causing pathogens in 142 mastitis milk samples from clinical mastitis cases (one case per cow) resulting from a six-month study on a dairy farm with 900 lactating cows in Lower-Saxony, Germany (microbiological culture)

Findings	Amount	Percentage	Confidence interval (95%)
No growth	17	12.0	(10.0; 14.0)
Staphylococcus aureus	19	13.4	(11.3; 15.5)
Streptococcus uberis	24	16.9	(14.6; 19.2)
Prototheca spp.	19	13.4	(11.3; 15.5)
Enterococcus spp.	6	4.2	(3.0; 5.4)
CNS*	6	4.2	(3.0; 5.4)
Coryneform bacteria	3	2.1	(1.2; 3.0)
Bacillus spp.	4	2.8	(1.8; 3.8)
Trueperella pyogenes	2	1.4	(0.7; 2.1)
Group C streptococci	2	1.4	(0.7; 2.1)
Escherichia coli	4	2.8	(1.8; 3.8)
Coliform bacteria	1	0.7	(0.2; 1.2)
Mixed growth†	22	15.5	(13.3; 17.7)
Contaminated‡	13	9.2	(7.4; 11.0)
Total	142	100	

*Coagulase negative staphylococci
†Mixed growth: two different pathogens in one mastitis milk sample
‡Contaminated: more than two different pathogens in one mastitis milk sample

different cows were collected. So, Gram-positive pathogens such as *Staphylococcus aureus* (13.4%; CI: (11.3; 15.5)) or *Streptococcus uberis* (16.9%; (14.6; 19.2)) were identified in the bacteriological culture. Other findings were cases with no microbiological growth (12.0%; (10.0; 14.0)) and *Prototheca spp.* (13.4%; (11.3; 15.5)). In 15.5% (13.3; 17.7) of all samples, two different colony types have been detected. This was referred to as mixed growth. Gram-negative bacteria were only identified in five samples (four *Escherichia coli* 2.8%; (1.8; 3.8); one coliform bacteria 0.7%; (0.2; 1.2)) using the standard method. Further distribution is described in Table 1. For evaluation, 13 cases were excluded from the study because the milk samples were contaminated. Consequently, for 129 cases the results of the rapid test were evaluated and compared with the results of a conventional microbiological culture that served as reference method. Table 2 contains the results of the statistical analysis differentiated according to the MCP. For Gram-positive MCP, the rapid test had a sensitivity of 93.2% (87.9, 98.4) and a specificity of 39.0% (24.1, 54.0). For Gram-negative pathogens, the test system had a sensitivity of 88.9% (68.4, 109.4) and a specificity of 97.5% (94.7, 100.3). The absolute agreement for Gram-positive MCP was 76.0% (kappa coefficient: 0.368, CI (0.208, 0.527)) and 96.9% for Gram-negative pathogens (kappa coefficient: 0.783, CI (0.612, 0.955)). Anyhow, the verification of prototheca infections in this study were inconsistent. In 73.7% of these cases, the rapid test showed an overall Gram-positive result (data not shown).

The evaluation only contains the first case of clinical mastitis in each cow in the current lactation. Subsequent cases were omitted from the evaluation. The rapid test worked the best for severe cases of mastitis (M3) (sensitivity and specificity of 100%).

Discussion

In this study, the diagnostic certainty and suitability of 3MT" PetrifilmT" plates (3MT", Neuss, Germany) were examined with clinical mastitis milk samples on a conventional dairy farm compared with the standard laboratory examination. Already 12 hours after inoculating the rapid on-farm test, results could be evaluated. The sensitivity for Gram-positive pathogens (93.2%) was similar with the results from previous studies (93.8%, 89.9%, 90.0%) [7, 11, 6]. In contrast to these studies, the specificity for Gram-positive pathogens was described with 39.0% (70.1%, 88.4%) [9, 8]. However, the specificity for Gram-positive pathogens in this study was similar to the results of Gitau et al. (51.0%) [14]. Compared with the standard method, the detection rate of the rapid test was higher due to the ten-fold higher inoculation volume (0.1 mL sample for PetrifilmT", 0.01 mL sample for the standard method). Thus, more samples could be recognized as pathogen-positive with the rapid test than with the standard method due to a higher amount of bacteria in the initial volume. Yet, the inoculum in the laboratory method is consistent with international standards following the regulations of the GVA and NMC [10, 12] and is seen as gold standard in microbiological examinations. The detection rate of the experimental method comes close to that of the gold standard if the inoculum increases [15]. Nonetheless, with a high number of detected Gram-positive pathogens, the negative predictive value still achieved 72.7%. The results of sensitivity in this study are similar to the results described in a study by Mansion-de Vries et al. (Gram-positive MCP: 89.9, Gram-negative MCP: 85.2, no growth: 41.0) [8].

The study design may have influenced the results of the microbiological analysis. The cold storage of milk samples could have influenced the growth of psychotropic bacteria or could have had a damaging effect on coliform bacteria. The use of a preserving agent could also have influenced the growth in the microbiological culture. Moreover, the limit value for environmental bacteria was decreased to five colonies because the examinations by Smith indicate that the limit value of ten colony-forming units/0.01mL may be too high regarding coliform pathogens [13]. We aimed to achieve a higher sensitivity because the rapid on-farm test worked with an inoculum of 0.1mL. This could have influenced proof of Gram-negative bacteria. A clear classification of prototheca infections with the test system was also not possible because the rapid test showed a Gram-positive result in nearly three quarters of prototheca infections. The rapid test is not useful for detecting prototheca and yeast infections because they do not grow within 12 hours [8]. Attention should be given to the fact that the study was only concerned with the accuracy of the test for clinical mastitis. Therefore, these results are expected to be different for subclinical mastitis.

A disadvantage of the PetrifilmT"-method is its inability to discriminate contaminated milk samples from uncontaminated ones or to recognize mixed infections [14]. In cases of mixed growth containing a Gram-positive MCP as well as a Gram-negative MCP, the test system was truly positive for both Gram-negative and Gram-positive bacteria. However, this result could not be differentiated from a Gram-negative test result because both PetrifilmT" plates (RAC and RCC) showed a positive result. Consequently, cows with a false positive Gram-negative result would

Table 2: Test characteristics of Rapid Aerobic Count and Rapid Coliform Count (3MTM PetrifilmTM) describing the correct prediction of the MCP[1] group (Gram-positive, Gram-negative, no bacterial growth) in 129 milk samples taken on a dairy farm with 900 lactating cows in nearly six months

Test characteristics (95% CI)	Gram-positive MCP [%]	Gram-negative MCP [%]	No bacterial growth [%]
Sensitivity	93.2 (87.9, 98.4)[3]	88.9 (68.4, 109.4)[3]	30.6 (15.5, 45.6)[3]
Specificity	39.0 (24.1, 54.0)	97.5 (94.7, 100.3)	95.7 (91.6, 99.8)
Positive predictive value	76.6 (68.6, 84.7)	72.7 (46.6, 99.0)	73.3 (51.0, 95.7)
Negative predictive value	72.7 (54.1, 91.3)	99.2 (97.5, 100.8)	78.1 (70.5, 85.7)
Youden`s index[2]	0.322 (0.164, 0.480)	0.864 (0.657, 1.071)	0.263 (0.107, 0.419)
True prevalence	68.2 (60.2, 76.3)	7.0 (2.6, 11.4)	27.9 (20.2, 35.6)
Apparent prevalence	82.9 (76.5, 89.4)	8.5 (3.7, 13.3)	11.6 (6.1, 17.2)

[1] Mastitis-causing pathogen
[2] Youden`s index not in %
[3] 95% confidence interval in brackets

not receive antibiotic therapy although they would benefit from it. This could lead to lower chances of being cured. On the other hand, false Gram-positive results lead to an increased use of antibiotics or rather do not lead to a reduction in antibiotics.

One advantage of the rapid test with the newly developed RAC is that it saves 12 hours of time compared to the 24h-Petrifilm™ concept used in the study by Mansion-de Vries et al. [8]. As described in their study, transporting milk samples to a laboratory is also unnecessary. Thus, results are available within two milking times and provide the basis for an evidence-based mastitis therapy concept. Therapy decisions can be made based on the results and the deferred therapy can commence in a time-frame that is associated with only minimal adverse effects [4]. The test can be used on-farm by the farm personnel because its inoculation and evaluation are easy to handle. After a short briefing, the farm personnel could carry out the test on their own. Before using the test, the disposal of used Petrifilm™-plates should also be organized because they have to be disposed separately from normal residual waste. Used tests have to be decontaminated. Mistakes when evaluating Petrifilm™-plates could also lead to false results and therefore to false therapy decisions resulting in lower cure rates or increased antibiotic use. Therefore, it is very important to train the milking personnel in taking aseptic milk samples as well as inoculating and evaluating the test. Furthermore, there is a risk of failing to recognize certain pathogens like *Prototheca spp.* and yeasts with the rapid test. Thus, regular microbiological examinations of the pathogen spectrum in the herd are inevitable [8]. Moreover, the rapid on-farm test is not able to test for antimicrobial resistance which is commonly performed after cultivating the pathogens in a microbiological culture.

Conclusions

All in all, the Petrifilm™ concept had a high sensitivity of 93.0% for Gram-positive and 83.3% for Gram-negative pathogens. The specificity for no detected bacterial growth was 94.8%. This leads to the conclusion that the Petrifilm™ concept is an effective tool and thus useful in diagnosing the pathogen group in dairy herds with a low percentage of infections with eukaryotic pathogens and uncontaminated milk samples. The rapid test was incapable of detecting eukaryotic cells and could lead to false results for samples with non-uniformly mixed infections (Gram-positive and Gram-negative pathogens simultaneously) or contaminated samples. Nonetheless, it provides the basis for therapy decisions in addition to the conventional standard method and can be used to support an evidence-based mastitis therapy concept in dairy herds with mainly bacterial pathogens.

Disclosure of conflicts of interest

All persons involved in this study declare no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors wish to thank 3M™ for providing the Petrifilm™-plates.

References

1. GVA (German Veterinary Association). Deutsche Leitlinien Bekämpfung der Mastitis des Rindes. 2012; 5th edition, Gießen, Germany: German Veterinary Association, Friedrichstraße 17, D-35392 Gießen: 1-226.
2. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research, 2003; 34: 475–491.
3. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. Journal of Dairy Science, 1998; 81: 411–419.
4. Roberson JR. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2003; 19 (1): 223-234.
5. Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. Journal of Dairy Science, 2011; 94 (9): 4441–4456.
6. Roberson JR. Treatment of Clinical Mastitis. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2012; 28 (2): 271–288.
7. Mansion-de Vries EM, Lücking J, Wente N, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V. Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage. Milk Science International (Milchwissenschaft), 2016; 69: 27–32.
8. Mansion-de Vries EM, Knorr N, Paduch J-H, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V. A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. Preventive Veterinary Medicine, 2014; 113 (4): 620–624.
9. McCarron JL, Keefe GP, McKenna SLB, Dohoo IR, Poole DE. Laboratory evaluation of 3M™ Petrifilms™ and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. Journal of Dairy Science, 2009; 92 (5): 2297–2305.
10. GVA (German Veterinary Association). Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern, 2009; 2nd edition, Gießen, Germany: German Veterinary Association, Friedrichstraße 17, D-35392 Gießen: 1-92.
11. Heeschen W, Reichmuth J, Tolle A, Zeidler H. Die Konservierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchung. Milchwissenschaft, 1969; 24: 729–734.
12. National Mastitis Council (NMC), 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. NMC, Madison, WI.
13. Smith KL. Mastitis control: a discussion. Journal of Dairy Science, 1983; 66: 1790-1794
14. Gitau GK, Bundi RM, van Leeuwen J, Mulei CM. Evaluation of Petrifilms™ as a diagnostic test to detect bovine mastitis organisms in Kenya. Tropical Animal Health and Production, 2013; 45: 883–886.
15. Krömker V, Paduch J-H, Klocke D, Zinke C. Microbiological investigation of culture negative milk samples of clinical mastitis cows. Milchwissenschaft, 2010; 65: 123–126.

3. Publikation II - Udder health effects of an evidence-based mastitis therapy concept in northwestern Germany

Milk production

Udder health effects of an evidence-based mastitis therapy concept in Northwestern Germany

J. Kock[1], N. Wente[1], Y. Zhang[1], J.-H. Paduch[1], S. Leimbach[1], D. Klocke[1], C.C. Gelfert[2], V. Krömker[1]

[1] *Hannover University of Applied Sciences and Arts, Faculty II, Microbiology, Heisterbergallee 10a, D-30453, Hannover, Germany*
[2] *MSD Animal Health, Intervet GesmbH, Siemensstraße 107, 1210 Wien, Austria*

Date submitted: 03/10/2018 *Date accepted: 24/10/2018* *Volume/Page(s): 71/14-20*

Abstract

Antibiotic use in dairy farming is a highly discussed issue in society. As a result, the European commission issued guidelines for the prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine in 2015 (EU 2015/C 299/04). Several studies could show effects of selective treatment of clinical mastitis. The present study assesses antibiotic reduction with-out negative effects on cure rates. The mastitis therapy concept was used on a 950-cow dairy farm in Northwestern Germany from 20162017. The cows showing clinical mastitis were assigned to an examina-tion and a control group. The control group (n=71) was given the stan-dard therapy, an intramammary antibiotic. Cows from the examination group (n=69) were treated, based on their individual mastitis history and the result of a rapid on-farm test of a quarter milk sample. The udder health effects such as clinical cure, bacteriological cure, cytolog-ical cure, number of recurrent cases of clinical mastitis, the culling rate as well as the withdrawal period and mean doses of antibiotics were compared between the control and examination group. There was a significantly higher chance of a clinical cure in the examination group (p=0.01, examination group: 43.5%, control group: 21.7%). The cure rate for bacteriological cure was 62.5% for the examination group and 66.6% for the control group. As well, 14.5% of cows had a cytological cure in the examination group and 9.9% of cows in the control group, respectively. However, the mean amount of local antibiotics per case was approximately 55% higher in the control group. Thus, this therapy concept could significantly reduce the antibiotic usage for mastitis treatment without there being any negative effects on cure rates.

Key words: dairy cow, clinical mastitis, selective mastitis treatment, antibiotic reduction

Introduction

The antibiotic therapy of clinical mastitis (**CM**) is the most common antibiotic treatment of dairy cows in Europe [1,2]. Due to public concerns concerning the use of antibiotics in live-stock husbandry, alternative therapy approaches are required. Previous studies could show that an antibiotic therapy is not required in all cases of clinical mastitis [3,4,5,6]. Roberson (2003) and Guterbock (1993) claimed that only cases of clinical mastitis caused by Gram-positive pathogens benefit from intramammary antibiotic therapy [30,31]. Cure rates of cases of mastitis caused by Gram-negative pathogens that did not receive antibiotic therapy were even equal to cases treated with antibiotics of Gram-positive cases of mastitis [3]. Therefore, an antibiotic intramammary therapy is not required for all cases of mastitis with a Gram-negative pathogen [7,8,9]. In addition to existing knowledge of the mas-titis-causing pathogen, the therapeutic success is also influenced by individual cow factors [3,10,11]. Former mastitis cases in the current lactation and the existence of chronic cases based on the somatic cell count could have negative effects on cure rates [12,10,13]. According to Trevisi et al. (2014), cows with a chronic clinical mastitis should also be excluded from antibiotic therapy [33]. Antibiotics are not indicated in these cases because they did not achieve the expected outcome in animal health [14]. Thus, studying the cow`s history of mastitis before treatment is recommended [13]. Furthermore, studies have shown the positive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (**NSAIDs**) on therapeutic success [15,16]. In conclusion, a therapy concept based on milk test results and data from former mastitis cases should have no lower cure rates with fewer antibiotics than conventional therapy. Therefore, the selective mastitis treatment depending on general condition and signs of inflammation, the cows` former mastitis history and the mastitis-causing pathogen should have no negative effects on the cure rates compared with the standard therapy on the farm - a generally local administration of antibiotic pharmaceuticals. The therapy decisions in the selective mastitis therapy concept were based on the results of a rapid on-farm test. Following the statement of Roberson (2012), it is sufficient to classify the pathogen into one of three categories: Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria or no growth. Only cows with a “Gram-positive” result should be given a local antibiotic therapy. In cases with other results (“Gram-negative” and “no growth”) local antibiotic usage could be avoided [17].

The aim of the present study was to use a new selective mastitis treatment concept on a conventional dairy farm. The study was conducted as a randomised controlled trial. The new therapy concept was based on a 12-hour rapid on-farm test in combination with an initial applica-tion of a NSAID.

Material and methods

Farm and animals:

The field trial was performed on a conventional dairy farm in Lower

Milk Science International (71) 2018 P. 14-20
ISSN 2567-9538

Saxony, Germany, from September 2016 to September 2017. Approximately 950 lactating Holstein-Friesian cows were milked three times a day in a 32-cow rotary milking parlour. The milkers performed a pre-milking of two or three jets of milk before attaching the cluster without any disinfecting pre- or postdip of the teat ends. The average milk yield was 11,311 kg (fat and protein corrected milk, ECM) with an average bulk tank milk somatic cell count below 400,000 cells/mL. Over the entire study period, the clinical mastitis incidence was ap-proximately 55.3% per year. The average new intramammary infection rate (cows with over 100,000 cells/mL in the actual dairy herd improve-ment of all cows below 100,000 cells/mL in the previous month) within lactation was 31.9%. The most common pathogens on farm in causing clinical mastitis were *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* (data not shown). The cows were kept in a free-stall barn and fed with a total mixed ration depending on their milk yield.

Clinical mastitis cases:

Only cows suffering from CM were assigned to the study. CM was detected by fore-stripping and allocated to one of three categories. Clinical mastitis was defined by the appearance of an abnormal milk character (clots, blood, water →mastitis grade M1), possibly with a swollen and/or heated udder (mastitis grade M2), or, in severe cases, accompanied by additional systemic signs of illness (mastitis grade M3) [18].

Samples:

The milking personnel, trained in detecting and categorising a CM as well as in taking the samples, took aseptical quarter foremilk samples from cows with clinical mastitis, complying with the regulations of the GVA (2009). After cleaning and discarding a few milk jets, teat ends were disinfected with 70% ethanol and a few jets of milk were milked into a test tube with a preserving agent containing boric acid (Ly20) [19]. The samples were used for implementing the rapid on-farm test before being stored at 7"C until being transported to the University of Applied Sciences and Arts in Hannover, Germany twice a week. There, they were examined by researchers unaware of the rapid test results, in accordance with the regulations of the GVA (2009).

Laboratory analysis:

A microbiological analysis of the mastitis milk samples was done following the examination standards as described in a study by Mansion-de Vries et al. (2014) [32]. Laboratory personnel plated ten microlitres of a well-mixed quarter foremilk sample with a sterile loop onto the quadrant of an esculin blood agar plate (Oxoid, Wesel, Ger-many). The plates were incubated for 48 hours at 37"C under aerobic conditions and examined twice, 24 and 48 hours after inoculation, respectively. The grown colonies were identified by means of their col-ony morphology, Gram staining, haemolysis patterns and their esculin hydrolysis. Additionally, other biochemical properties such as catalase activity, clumping factor test, Lancefield serotyping, cytochrome oxi-dase C activity and oxidation-fermentation of glucose were considered for further identification. Deviating from the regulations of the German Veterinary Association, a sample was claimed to be positive for envi-ronmental organisms if more than five colonies were identified in the examination (standard operating procedure in the laboratory). As ex-aminations by Smith (1983) indicate, the limit value of ten colony-form-ing units/0.01mL may be too high regarding coliform pathogens [20]. However, already one colony led to a positive result for cow-associated pathogens like *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* [21]. If more than two different colony types were detected in one milk sample, the sample was categorised as contaminated. Two different colony types in one sample were referred to as mixed infection.

Experimental procedure:

First of all, based on the farmer's decision, cows that should not be administered any medication on the farm were excluded from the study. These were cows at the end of lactation and those that had an abnormal milk character for a longer period of time without showing systemic signs of illness or only minimal clinical signs of illness (only one clot during pre-milking). Furthermore, cows with a currently high milk yield above herd average in the first half of lactation (subjective perception of the farmer) were also not given any therapy if they had clinical mastitis without systemic signs of illness. The study was performed with two groups: an examination group (**EG**) and a control group (**CG**). Remaining cows with CM were assigned to the two groups based on the cow`s individual neck number on the farm, which had been randomly distributed at the start of the first lactation. All cows with an odd number were assigned to the examination group and all cows with an even number were assigned to the control group. Thus, both groups contained cows with the same characteristics such as days in milk and number of lactations. Cows in the examination group were treated according to the concept in Figure 1. The control group received the standard therapy on the farm, an intramammary applica-tion of antibiotics for 2.5 days. There was no determined antimicrobial product. Different intramammary drugs were possible. The study was conducted as a randomized controlled trial. The therapeutic success of the selective mastitis treatment concept in the examination group was compared with the results of the conventional treatment on the farm, the intramammary application of antibiotics in the control group.

Rapid on-farm test:

Every mastitis milk sample from cows belonging to the examination group was tested with a rapid on-farm test on the day the sample was collected. It was noted whether there was a Gram-positive or Gram-negative pathogen present or if there was no pathogen present. The farm personnel implemented and evaluated the tests. Two differ-ent rapid tests were used for detecting the mastitis-causing pathogen

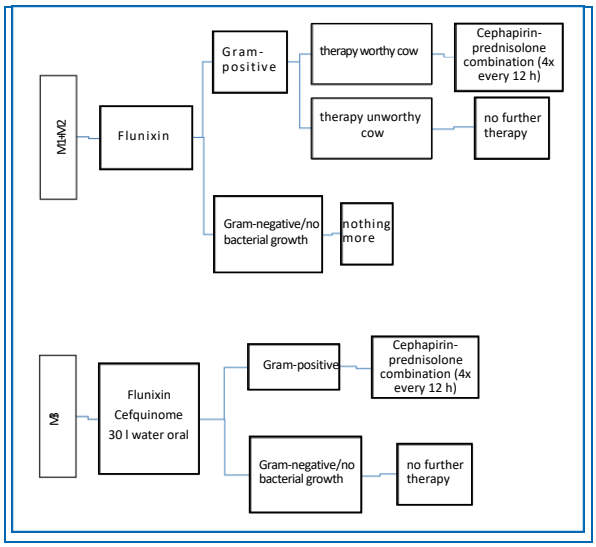

Figure 1: Treatment concept of a selective mastitis therapy concept based on a rapid test considering therapy worthiness and the severity of mastitis (M1 of mastitis = abnormal milk character, M2 = M1 plus swollen and/or heated udder, M3 = M1 or M2 and additional systemic signs of illness).

group. From September 2016 to January 2017, 3M™ Petrifilm™ plates (3M™, Neuss, Germany) were used for detection. The concept was a combination of Rapid Aerobic Count and Rapid Coliform Count which could assign the causative pathogens to Gram-positive, Gram-negative and no bacterial growth [22]. Since January 2017, a newly developed rapid test (MastDecide, QuIdee GmbH, Homberg Ohm, Germany) has been used on the farm. This test was also able to divide the possible test outcomes into the three categories. The test system, consisting of two tubes is based on a colour change of the liquid test medium. The tubes were inoculated with 0.1mL milk, closed, thoroughly mixed and kept in an incubator at 37°C for 12 hours. The liquid test medium only changed from pink to white if bacteria were growing. Thus, no change in colour meant no growth and a colour change in only one tube was interpreted as growth of Gram-negative bacteria. If both test tubes undergo a colour change, it is assumed that Gram-positive pathogens have caused the mastitis [17,23]. Samples from cows in the control group were tested only in the laboratory.

Examination group:

Initially, every cow with clinical mastitis (M1-M3) was administered a cutaneous application of Flunixin (Finadyne® Transdermal, Intervet Deutschland GmbH, Germany) after detection of signs of illness and taking a sample. A one-off application was specified for the recommended therapy. Cows with an M3 additionally received parenteral cefquinome (Cobactan® 2.5%, Intervet Deutschland GmbH, Germany) once a day for two days and were given 30 litres of water orally likewise once a day. Depending on the on-farm test result, only cows with a Gram-positive test result were given an intramammary cephapirin/prednisolone combination (Mastiplan LC®, Intervet Deutschland GmbH, Germany) every 12 hours for two days. Cows with a Gram-negative result or no bacterial growth were not given any local application of antimicrobial products. However, only therapy worthy cows received the intramammary cephapirin/prednisolone combination. Therapy worthiness is defined as an expected therapeutic success. Cows having experienced more than two clinical mastitis cases in the current lactation on the same quarter, and those having more than 700,000 cells/mL milk in the last three dairy herd improvement milk recording tests did not receive a local antibiotic therapy regardless of the on-farm test result. The latter cows have a lower chance of therapeutic success [10]. They only received the Flunixin application once for the actual case as did cows with no bacterial growth or a Gram-negative pathogen in the milk sample. Nevertheless, cows showing systemic signs of illness (M3) were administered parenteral cefquinome even if they were therapy unworthy. The selective mastitis treatment concept for the examination group is shown in Figure 1. **Control group:** After the farmer`s decision, cows in the control group whose milk character was completely lost (thick clots with only a minimal liquid portion) received the standard therapy on the farm based on a local intramammary antibiotic product, independent of a rapid on-farm test. Cows with an M1 and M2 only received a local antimicrobial product. Cows with systemic signs of illness were treated with local antimicro-bial products, additionally with a parenteral antimicrobial product and, in cases of subjectively rated poor general condition, with a NSAID. In most cases, a combination of an amoxicillin clavulanic acid with prednisolone (Synulox® LC Plus, Zoetis, Germany) was the first choice of intramammary therapy. It was applied every 12 hours over five treat-ments. Marbofloxacin (Boflox®, Livisto, Germany) was usually used for parenteral therapy and applied once a day for three days. Alternatively, a one-shot preparation of marbofloxacin (Forcyl®, Vetoquinol, Germany) was applied. If a cow was not clinically cured after the first therapy, the subsequent therapy with intramammary cefquinome (Cobactan® LC, Intervet Deutschland GmbH, Germany) was started. The treatment was independent of individual cow factors like somatic cell count or previous diseases.

Definitions:

The therapeutic success of a treatment is defined by the cure rate which can be differentiated into clinical cure (CC), bacteriological cure (BC) and cytological cure (CYC) [9,24,25,26]. These variables served as a basis for evaluation after treatment of CM. Therefore, two control milk samples were collected by one of the authors 14 (+-3) and 21 (+-3) days after identifying a CM [26,15]. These samples were also exam-ined in the laboratory of the University of Applied Sciences and Arts in Hannover. CC was established by macroscopical examination of the milk, evaluation of the general condition and evaluation of appetite and body temperature. Cows with physiological milk character and an undisturbed general condition were defined as cured. The param-eters were evaluated five days after identifying a CM. Macroscopical changes to the milk character at this time indicated that the cow was not clinically cured. A cow was bacteriologically cured when the initial pathogen in the mastitis milk sample could not be detected in both control samples. The CYC was evaluated by means of the somatic cell count which was determined in the laboratory. A somatic cell count below 200,000 cells/mL in both control samples means a cytologically cured cow [3]. All parameters of cure were compared between the examination and the control group. Furthermore, recurrent cases of clinical mastitis, the amount of culling and follow-on treatments (for the actual clinical mastitis case) as well as the mean doses of antibiotics with withdrawal period were evaluated. A recurrent clinical mastitis was defined as renewed CM more than 14 days after the clinical cure.

Number of cows:

The tested hypothesis was that the control group (standard therapy) resulted in a higher bacteriological cure rate (70%) than the exam-ination group (new concept therapy) (45%). Based on a one-sided

Table 1: Amount and distribution of mastitis-causing pathogens in 140 mastitis milk samples from cases of clinical mastitis resulting from a 12-month study on a dairy farm with 950 lactating cows in Lower Saxony, Germany (microbiological culture)

Pathogen	Number of samples	Percentage (%)	Confidence interval (95%)
No growth	37	26.4	(23.7; 29.1)
Streptococcus uberis	36	25.7	(23.0; 28.4)
Prototheca spp.	13	9.3	(7.5; 11.1)
Staphylococcus aureus	13	9.3	(7.5; 11.1)
Contaminated	8	5.7	(4.3; 7.1)
Mixed infections	8	5.7	(4.3; 7.1)
CNS	7	5.0	(3.7; 6.4)
Escherichia coli	7	5.0	(3.7; 6.4)
Streptococcus dysgalactiae	3	2.1	(1.2; 3.0)
Coliform bacteria	3	2.1	(1.2; 3.0)
Enterococcus spp.	2	1.4	(0.7; 2.1)
Bacillus spp.	1	0.7	(0.2; 1.2)
Coryneforme	1	0.7	(0.2; 1.2)
Trueperella pyogenes	1	0.7	(0.2; 1.2)
Total	140		

Table 3: Cure rates, long-term effects and mean doses of antibiotics with withdrawal period for the examination and control group. The significances are given on the basis of multivariate analysis

	Examination group		Control group		p-value
	amount	percentage	amount	percentage	
Clinical cure	30/69	43.5%	15/69	21.7%	0.013
Bacteriological cure	30/48	62.5%	36/54	66.6%	0.286
Cytological cure	10/69	14.5%	7/71	9.9%	0.959
Recurrent cases of clinical mastitis	9/43	20.9%	2/31	6.5%	0.107
Follow-on treatment	9		13		0.257
Culling	2 cows	2.9%	4 cows	5.6%	0.317
Mean doses of local antibiotics	3.07		4.76		< 0.001
Mean doses of parenteral antibiotics	0.29		0.28		0.822
Withdrawal period	6.11		6.19		0.797

Chi-square test with type I error (α=0.05) and type II error (ß=0.20), a total of 59 animals were required per treatment group. Assuming that approximately 10% of cows drop out of the trial post admission, approximately 65 cows were required per treatment group, in total 130 cows with CM.

Statistics:

The data were collected in Microsoft Access and Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). SPSS (SPSS 24.0, IBM Corp., Armonk, USA) was used for the statistical calculations. Normally distributed metric data were statistically analyzed using the Student's t-test in order to test the homogeneity of data of the two treatment groups. The nominal, i.e., clinical grade, data were compared in terms of proportions with a X^2-test (Chi-Square Test). A value of p<0.05 was considered as significant.

Although the affected quarter was the unit of observation for the tar-get variables, only one quarter per cow was included and therefore cow and quarter analysis were identical. BC, CC, and CYC were evaluat-ed with the help of a mixed model logistic regression analysis wherein parity, days in milk (DIM; ≤100, 101–200, ≥201), grade of mastitis (mild/moderate/severe), treatment and pathogen type (streptococci, staphylococci, no growth, and other) were included as fixed effects. The treatment was the main variable of interest in the study. Categori-sation of cytological cure was based on the cut-off value of 200,000 cells/mL as mentioned earlier. The full model can be given by:

Logit (BC, CC, CYC, recurrent cases of clinical mastitis, culling rate, follow-on treatments) = Lactation + DIM + mastitis severity + patho-gen-group + treatment + pathogen-group x treatment + e

Akaike information criterion was used to determine the model quality.

Table 2: Distribution and composition of cases of clinical mastitis for both test groups and their comparability by p-value

	Examination group	Control group	p-value
Mastitis cases	69	71	
Days in milk*	80 (range: 4-156)	98 (range: 5-191)	0.204
Lactation number†	3 (range: 1-7)	3 (range: 1-8)	0.758
M1	41	45	
M2	22	19	0.617‡
M3	6	7	

* Mean of days in milk

† Mean of lactation number

‡p-value for all grades of mastitis- to compare the frequency distributions

Results

In total, 140 clinical mastitis cases were included in the evaluation, 69 cases of which belonged to the examination group and 71 cases to the control group. 46 cases were not considered in the evaluation and were disregarded due to false treatment (accidental change of an-tibiotics or too short treatment), missing control samples or extended therapy, which would distort the evaluation. Based on farmer`s deci-sion, another 382 cases were not enrolled due to high milk yield or minimal clinical symptoms as described earlier. These cows did not get any therapy. However, the two test groups were comparable in terms of days in milk (p= 0.204), number of lactations (p= 0.758) and distri-bution of mastitis severity (p=0.617). The microbiological results of the mastitis samples are shown in Table 1 and were evaluated for the 140 cases. S*treptococcus uberis* was the most frequent pathogen (25.7%), followed by *Staphylococcus aureus* (9.3%) and *Prototheca spp.* (9.3%). In 26.4% of all cases, no pathogen was found. More than one pathogen (mixed infections) could be isolated in 5.7% of all cases. A detailed composition of control and examination group is shown in Table 2. The bacterial spectrum varied significantly between the two groups due to the uneven distribution of streptococci (more in CG) and staphylococci (more in EG) (p< 0.01, data not shown). Table 3 shows the cure rates al-located to the examination and control group. The bacteriological cure did not differ much between either group (examination group (EG): 62.5%, control group (CG): 66.6%). The difference was not significant neither was the cure rate of the cytological cure (EG: 14.5%, CG: 9.9%). Using the generalised linear mixed model, no significant differences for cure rates except from the clinical cure could be established. The variable "CC" outcome was associated with the mastitis grade (M13) (p=0.08). Similarly, the value "BC" was associated with number of lactations (p=0.08) as well as the bacterial group (p=0.115). But, the clinical cure at day 5 after detecting mastitis (EG: 43.5%, CG: 21.7%) was significantly different between the control and examination group (p=0.013). Besides, there was no difference in the amount of follow-on treatments (FOT) (EG: N=10 FOT, CG: N=13 FOT). Nonetheless, more recurrent cases of clinical mastitis were detected in the examination group (EG: 20.9%, CG: 6,5%) with p=0.107, but the culling rate of CG was twice as high as in the examination group (EG: 2.9%, CG: 5.6%; p=0.317). The average withdrawal period in the control group was 6.19 days and 6.11 days in the examination group, respectively (p=0.797). The mean doses of antibiotics for each clinical mastitis were evalu-ated for local application and parenteral application and significantly differed in the use of local antibiotics between the examination (3.07) and the control group (4.76) (table 3, p<0.001). The null hypothesis

mentioned at the beginning of the paper had to be rejected. Contrary to the assumption, the cure rate of the experimental group is not 25 % lower than that of the control group but even higher for BC (6.2%), CYC (4.6%) and CC (21.8%).

Discussion

A selective mastitis therapy concept was used on one 950-cow dairy farm in Northwestern Germany and applied to cows with clinical mas-titis. After excluding cows with high milk yields and those with only minimal clots in their milk, based on the farmer`s decision, cows were enrolled then assigned to the control or to the examination group. The therapy decisions for antibiotic treatment in the examination group were based on a rapid on-farm test, the results of which were available only twelve hours after sampling a cow. Cure rates of both groups were compared to those of other studies. All in all, using a rapid on-farm test in combination with selective mastitis treatment should result in less frequent use of antibiotics without there being any negative effects on cure. As seen in our results, neither the bacteriological nor the cytolog-ical or clinical cure in the examination group were inferior to that of the control group (BC: EG: 62.5%, CG: 66.6%; CYC: EG: 14.5%, CG: 9.9%; CC: EG: 43.5%, CG: 21.7%, respectively). There was even a significant high-er chance of clinical cure for cows in the examination group compared with cows of the control group. On the other hand, the mean doses of local and parenteral antibiotics in the control group were about 50% higher than in the examination group (EG: 3.07 local antibiotics, 0.29 parenteral antibiotics; CG: 4.76 local and 0.28 parenteral, respectively). Thus, selective treatment could significantly reduce the use of antibi-otics. Nevertheless, the withdrawal time was also fairly similar in both the examination and control group. Lago et al. (2011) also found no negative effects on cure rates for strategic treatment of clinical masti-tis. They were able to show a decreased withdrawal time of one day in the examination group, which could not be stated in our present study due to a higher withdrawal period of the local antibiotic used in the examination group. A study by Mansion-de Vries et al. (2016) could also show a significant reduction in the mean doses of local antibiotics in the examination group, with there being no negative effects on cure rates. The cure rates shown in their study were equal in both the exam-ination and control group. Moreover, 54.5% of their documented milk samples showed no growth or growth of a Gram-negative pathogen, unlike those in our present study (20.5%).

The main challenge was the elimination of many cases due to “high milk yield” and minimal clinical signs of mastitis for the evaluation. Due to the fact that these cases had been excluded from evaluation before being assigned to the examination or control group, they did not in any way influence the results. The exclusion, based on the farmer`s choice, was not intended to influence the study`s results but to maintain a high milk yield and to reduce milk losses. As every treatment led to milk losses, the farmer was anxious to treat as few cows as possible. There-fore, all cows with a subjectively perceived high quantity of milk and clinical mastitis only discovered by one clot were not treated in order to minimise the milk losses (382 cases). The udder health effects were not a primary goal for the farm. Thus, this study was conducted under “real life conditions” which did not influence the distribution of the animals to the control or examination group. In addition, further cases were excluded from the evaluation after being assigned to the control or examination group. These were cases due to false treatment, miss-ing control samples or extended therapy. Mostly, the false treatment was characterized by an accidental change of local antibiotics. The cases were not taken into account in order to improve the comparability of the examination and the control group. These exclusions did not introduce a bias in the analysis of the results because the deviations from the inclusion criteria were not purposive but due to the lack of compliance. Under these conditions, the new antibiotic reduced treatment concept showed the same outcomes compared to conventional treatment. Certainly, the results of this study were influenced by the high somatic cell count, corresponding infection pressure and presence of many chronic infections. Due to these circumstances, many cases of clinical mastitis could not be cured. The number of recurrent cases of clinical mastitis was higher in the examination group than in the control group, whereas the culling rate was twice as high in the control group than in the examination group. However, no significance was established. There was no discernible reason for this. Further studies are necessary to show whether this effect is reproducible on farms with a lower somatic cell count and another pathogen spectrum. A larger number of samples and studies on other farms are required to prove these outcomes.

Two of the dominant pathogens on the farm, namely *Staphylococcus aureus* and *Prototheca spp.*, particularly affected the cure rates for both the examination and control group. Cases of mastitis caused by *Staphylococcus aureus* are accompanied with low bacteriological cure rates [27]. Moreover, *Prototheca spp.* could hardly be eliminated from the udder. Culling is the better option [28] and these cases would probably not benefit from an antibiotic therapy [29]. A high number of infections with eukaryotes (yeasts and P*rototheca spp.*) were the major difficulty in this study. The rapid test, made for detecting Gram-posi-tive cocci and Gram-negative bacteria, could not identify eukaryotic cells. Nonetheless, the result was “Gram-positive” in 73.3% of all protothecal cases tested with the Petrifilm test [22]. Clinical mastitis caused by these cells should have been classified as samples with no growth but received antimicrobial products due to the rapid test result. These factors could have led to lower cure rates in both, the control and examination group. However, despite there being a high amount of these pathogens in the samples, antibiotic usage could be reduced in the examination group without there being any negative effects on the cure rates. Furthermore, the bacterial spectrum varied significantly between the control and the examination group. Streptococci were predominantly detected in samples from the control group, whereas staphylococci were mainly isolated in samples from the examination group. However, this effect was excluded from the analytical statistics with concept * bacteriological group.

Nevertheless, the “evidence-based mastitis therapy concept” required greater effort than the standard therapy on the farm. Taking the milk samples, implementing the on-farm rapid test combined with studying every cow’s mastitis history and measuring the temperature were more time-consuming than only administering local antibiotics. Ad-ditionally, the evaluation of the on-farm tests after 12 hours and the delayed treatment of a cow after evaluation require more work and defined work planning especially if more than one person is involved in the treatment. The results for the cure and usage of antibiotics in the examination group were affected by the on-farm test results of the rapid test. Thus, the rapid test could have influenced the results. However, the diagnostic certainty was proved for both tests. Compared to a microbiological culture, MastDecide had a sensitivity of 83.6% for Gram-positive pathogens and 72.2% for Gram-negative pathogens. The specificity was 94.1% for Gram-positive pathogens and 83.3% for Gram-negative pathogens, respectively [23]. Petrifilm™ achieved similar results: Sensitivity (specificity) of 93.2% (39.0%) for Gram-pos-itive and 88.9% (97.5%) for Gram-negative pathogens [22]. Therefore,

both tests could be comparable. Furthermore, the test results could have been influenced by the farm personnel who implemented and evaluated the tests. Thus, professional training in implementing and evaluating the tests as well as taking samples without contamination is necessary and recommended.

This therapeutic concept could lead to a lower use of antibiotics for mastitis treatment without any negative effects on cure. The withdrawal period was not negatively influenced, and the mean doses of antibiotics could be significantly reduced. The economic aspects have to be checked individually for every farm. Additional costs for rapid tests, NSAIDs and operating expenses should be calculated for udder health and reduction in antibiotics. Moreover, this concept depends on the farm personnel and its motivation. The concept could be one approach to reducing the use of antibiotics in mastitis therapy but is no compensation for lacking prevention.

Conclusion

This concept of selective mastitis treatment could show no negative effects on cure rates compared with a standard therapy on the farm with simultaneous reduction of local antibiotics by approximately 50%. Despite the additional expense for work implementing and evaluating the rapid test and cows` mastitis history, the concept could be a step towards reducing the use of antibiotics for mastitis therapy. More studies on other farms with other dominating pathogens and better udder health are necessary to prove this result.

Acknowledgements

All persons involved in this study declare no conflict of interests. We wish to thank Intervet Deutschland GmbH and Steinbeis Research Cen-tre Milk Science for financially supporting this study. Furthermore, we would like to thank the farm for providing their cows and enabling the study to be carried out.

Literature

1. Viora L, Graham EM, Mellor DJ, Reynolds K, Simoes PB , Geraghty TE. Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis. Vet Rec, 2014; 175: 89.
2. Kuipers A, Koops WJ, Wemmenhove H. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. J Dairy Sci, 2016; 99(2): 1632–1648.
3. Mansion-de Vries EM, Lücking J, Wente N, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V. Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage. Milk Sci Int, 2016; 69: 27-32.
4. Roberson JR. Treatment of Clinical Mastitis. Vet Clin N Am-Food A, 2012; 28(2): 271-288.
5. Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. J Dairy Sci. 2011; 94(9): 4441-4456.
6. Hoe FGH, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. J Am Vet Med Assoc, 2005; 227(9): 1461-1468.
7. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. J Mammary Gland Biol, 2011; 16(4): 383–407.
8. Persson Y, Katholm J, Landin H, Mörk MJ. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of acute clinical mastitis caused by Escherichia coli in dairy cows. Vet Rec, 2016; 178(10): 240.
9. Suojala L, Kaartinen L, Pyörälä S. Treatment for bovine Escherichia coli mastitis--an evidence-based approach. J Vet Pharmacol Ther, 2013; 36(6): 521-531.
10. Degen S, Paduch JH, Hoedemaker M, Krömker V. Factors affecting the probability of bacteriological cure of bovine mastitis. Tierarztl Prax G N, 2015; 43(4): 222-227.
11. Keefe G, McCarron J, MacDonald K. Using on-farm mastitis culturing. Western Canadian Dairy Seminar, 2011; 23: 81-91.
12. Grieger AS, Zoche-Golob V, Paduch JH, Hoedemaker M, Krömker V. Rezidivierende klinische Mastitiden bei Milchkühen - Bedeutung und Ursachen. Tierarztl Prax G N, 2014; 42(3): 156–162.
13. Pinzón-Sánchez C, Ruegg PL. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. J Dairy Sci. 2011; 94(7): 3397-3410.
14. Østerås O. Mastitis Epidemiology Practical Approaches and Applications. XXIV World Buiatrics Congress, 2006; (3).
15. McDougall S, Abbeloos E, Piepers S, Rao AS, Astiz S, van Werven T, Statham J, Pérez-Villalobos N. Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance. J Dairy Sci, 2016; 99(3): 2026–2042.
16. Krömker V, Paduch JH, Abograra I, Zinke C, Friedrich J. Effects of an additional non-steroidal anti-inflammatory therapy with carprofen (Rimadyl Rind) in cases of severe mastitis of high yielding cows. Berl Munch Tierarztl, 2011; 124 (3-4): 161–167.
17. Krömker V, Schmenger A, Kock J, Klocke D, Paduch JH, Leimbach S. Aspekte einer modernen Mastitistherapie, Prakt Tierarzt, 2018; 99 (02/2018): 180-189.
18. International Dairy Federation (IDF). Suggested interpretation of mastitis terminology. Bulletin of the IDF. 1999; 338, Brussels.
19. Heeschen W, Reichmuth J, Tolle A, Zeidler H. Die Konservierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchung. Milchwissenschaft, 1969; 24: 729–734
20. Smith KL. Mastitis control: a discussion. J Dairy Sci, 1983; 66: 1790-1794.
21. GVA (German Veterinary Association). Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern, 2009; 2nd edition. Gießen, Germany: German Veterinary Association, Friedrichstraße 17, D-35392 Gießen: 1-92
22. Kock J, Wente N, Zhang Y, Paduch JH, Leimbach S, Krömker V. Accuracy of 12h-Petrifilm plate as a rapid on-farm test for evidence-based mastitis therapy on a dairy farm in Germany. Milk Sci Int, 2018; 71: 10-13.
23. Leimbach S, Krömker V. Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups. J Dairy Sci. 2018 101(7), 6357-6365
24. Deluyker HA, van Oye SN, Boucher JF. Factors Affecting Cure and Somatic Cell Count After Pirlimycin Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Cows. J Dairy Sci, 2005; 88 (2): 604-614
25. GVA (German Veterinary Association). Deutsche Leitlinien Bekämpfung der Mastitis des Rindes, 2012, 5th edition. Gießen, Germany: German Veterinary Association, Friedrichstraße 17, D-35392 Gießen:
26. McDougall S, Agnew KE, Cursons R, Hou XX, Compton CRW. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. J Dairy Sci, 2007; 90(2): 779-789.
27. Linder M, Paduch JH, Grieger AS, Mansion-de Vries E, Knorr N,

Zinke C, Teich K, Krömker V. Heilungsraten chronischer subklinischer Staphylococcus aureus-Mastitiden nach antibiotischer Therapie bei laktierenden Milchkühen. Berl Munch Tierarztl, 2013; 126(7–8): 291–296.

28. Ranjan R, Swarup D, Patra RC, Nandi D. Bovine protothecal mastitis: a review. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veter-inary Science, Nutrition and Natural Resources, 2006; 1(17): 1–7.
29. Jánosi S, Szigeti G, Rátz F, Laukó T, Kerényi J, Tenk M, Katona F, Huszenicza A, Kulcsár M, Huszenicza G. Prototheca zopfii mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. Vet Quart, 2001; 23(2): 80–83.
30. Roberson, JR. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. Vet Clin N Am-Food A, 2003; 19: 223-234
31. Guterbock WM, Van Eenennaam AL, Anderson RJ, Gardner IA, Cullor JS, Holmberg CA. Efficacy of intramammary Antibiotic Therapy for Treatment of Clinical Mastitis caused by Environmental Pathogens. J Dairy Sci, 1993; 76 (11): 3437-3444
32. Mansion-de Vries EM, Knorr N, Paduch JH, Zinke C, Hoedemaker M, Krömker V. A field study evaluation of PetrifilmTM plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. Prev Vet Med, 2014; 113(4): 620–624.
33. Trevisi E, Zecconi A, Cogrossi S, Razzuoli E, Grossi P, Amadori M. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. Res Vet Sci, 2014; 96(2): 229-233.

4. Diskussion

Über einen Zeitraum von über einem Jahr wurden auf einem Milchviehbetrieb mit rund 950 laktierenden Milchkühen Daten zur Eutergesundheit gesammelt, Milchproben von Kühen mit klinischer Mastitis gezogen, ein Therapiekonzept angewendet und dessen Verlauf begleitet. Die Ergebnisse dazu wurden ausgewertet mit dem Ziel, ein Therapiekonzept in Form einer selektiven Mastitistherapie zu etablieren, durch das der Antibiotikaeinsatz zur Behandlung von Euterentzündungen verringert werden kann. Die Heilungswahrscheinlichkeit sollte dadurch im Vergleich zum bisherigen Behandlungsschema nicht negativ beeinflusst werden. Durch die Auswertung der zytomikrobiologischen Untersuchung von Milchproben nach erfolgter Therapie konnten Rückschlüsse über die Wirksamkeit des Therapiekonzeptes gezogen werden. Zusätzlich wurden die Rezidivrate und die Anzahl an Abgängen aus der Herde betrachtet, um auch darüber Rückschlüsse auf die Wirksamkeit des Konzeptes zu erhalten.

In einem Vorversuch sollte die diagnostische Sicherheit eines Schnelltestkonzeptes der Firma 3M™ Petrifilm™ im Vergleich mit der Standard-Laboruntersuchung, die zytobakteriologische Untersuchung von Milchproben nach DVG Leitlinien, überprüft werden.

1. Schnelltestkonzept 3M™ Petrifilm™

In dieser Studie wurde die diagnostische Sicherheit und Eignung von 3M™ Petrifilm™-Platten (3M™, Neuss, Deutschland) als Schnelltest von klinischen Mastitis-Milchproben auf einem konventionellen Milchviehbetrieb im Vergleich zur Standard-Laboruntersuchung untersucht. Durch die Kombination des neuen Rapid Aerobic Count (RAC) mit dem Rapid Coliform Count (RCC) der Firma 3M™ lässt sich eine

Sterilitätsprüfung von Milchproben durchführen. Als mögliches Ergebnis werden drei Kategorien ausgegeben: Grampositives Bakterienwachstum, gramnegatives Wachstum oder kein bakterielles Wachstum. Bereits 12 Stunden nach dem Ansetzen des Schnelltests konnten die Ergebnisse ausgewertet werden. Die Sensitivität für grampositive Krankheitserreger (93,2%) war ähnlich wie in früheren Studien (93,8%, 89,9%, 90,0%) (McCarron et al., 2009; Gitau et al., 2013; Mansion-de Vries et al., 2014). Im Gegensatz zu diesen Studien wurde die Spezifität für grampositive Erreger mit 39,0% (70,1%, 88,4% (McCarron et al., 2009; Mansion-de Vries et al., 2014)) beschrieben. Die Spezifität für grampositive Erreger in dieser Studie war jedoch vergleichbar mit den Ergebnissen von Gitau et al. (51,0%) (Gitau et al., 2013). Im Vergleich zur Standardmethode war die Nachweisrate des Schnelltests aufgrund des zehnfach höheren Inokulationsvolumens höher (0,1 ml Probe für Petrifilm™, 0,01 ml Probe für die mikrobiologische Untersuchung). So konnten mit dem Schnelltest mehr Proben mit einem positiven Erregernachweis erkannt werden als mit der Standardmethode, da im Ausgangsvolumen mehr Bakterien vorhanden waren. Das Inokulum in der Labormethode entspricht jedoch den internationalen Standards nach den Vorschriften der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft und des National Mastitis Council (DVG, 2009; NMC, 1999) und gilt als Goldstandard in der mikrobiologischen Untersuchung. Die Nachweisrate bakterieller Erreger würde sich jedoch erhöhen, wenn das Inokulationsvolumen in der mikrobiologischen Untersuchung zunähme (Krömker et al., 2010). Dennoch erreichte der negative prädiktive Wert bei einer hohen Anzahl von nachgewiesenen grampositiven Erregern immer noch 72,7%. Die Ergebnisse der Sensitivität in dieser Studie sind ähnlich derer einer Studie von Mansion-de Vries et al. (2014) (grampositive Erreger: 89,9, gramnegative Erreger: 85,2, kein Wachstum: 41,0).

Das Studiendesign könnte die Ergebnisse der mikrobiologischen Analyse beeinflusst haben: Die Kühllagerung von Milchproben könnte das Wachstum psychrotropher Bakterien beeinflusst oder eine schädigende Wirkung auf coliforme Bakterien gehabt haben. Durch den Einsatz des Konservierungsmittels (Ly20) hätte das Wachstum in der mikrobiologischen Kultur ebenfalls beeinflusst werden können. Darüber hinaus wurde der Grenzwert zum Nachweis von Umweltbakterien von zehn auf fünf Kolonien gesenkt um eine bessere Sensitivität zu generieren, da die Untersuchungen von Smith zeigen, dass der Grenzwert von zehn koloniebildenden Einheiten/0,01 ml für coliforme Erreger zu hoch sein könnte (Smith, 1983). Wir wollten eine höhere Sensitivität erreichen, da der Schnelltest im Betrieb mit einem Inokulum von 0,1 ml durchgeführt wurde. Eine eindeutige Klassifizierung von Infektionen mit Prototheken war mit dem Schnelltestsystem nicht möglich, da der Schnelltest bei fast drei Viertel der Infektionen mit Prototheken ein grampositives Ergebnis nachwies. Der Schnelltest ist für den Nachweis von Prototheken- und Hefeinfektionen nicht geeignet, da sie nicht innerhalb von 12 Stunden wachsen (Mansion-de Vries et al., 2014). Eine erfolgsversprechende Behandlung von Prototheken- oder Hefemastitiden gibt es derzeit allerdings nicht. Somit ist ein grampositives Ergebnis beim Vorhandensein dieser Erreger für die Therapieempfehlung etwas irreführend. Diese Krankheitserreger *(Prototheca spp.* und Hefen) werden somit vom Schnelltest nicht erkannt. Auch unterscheidet der Schnelltest nicht über die Art des Erregers. Das Schnelltestkonzept kann nicht ermitteln, ob kritische Erreger wie etwa *Streptococcus agalactiae* im Bestand vorhanden sind. Daher sind regelmäßige mikrobiologische Untersuchungen des Erregerspektrums in der Herde unumgänglich (Mansion-de Vries et al., 2014). Darüber hinaus ist der Schnelltest im Betrieb nicht in der Lage, die Antibiotikaresistenz zu testen, die üblicherweise nach der Kultivierung der Krankheitserreger als Agardiffusionstest in einer mikrobiologischen Kultur durchgeführt wird.

Ein weiterer Nachteil des Schnelltestsystems ist die Unfähigkeit, kontaminierte Milchproben von nicht kontaminierten zu unterscheiden oder Mischinfektionen zu erkennen (Gitau et al., 2013). Bei gemischtem Wachstum mit einem grampositiven Erreger und einem gramnegativen Erreger lässt sich das Testergebnis nicht von dem einer Probe mit reinem gramnegativen Wachstum unterscheiden. Folglich würden Kühe mit einem falsch-positiv gramnegativen Ergebnis keine Antibiotikatherapie erhalten, obwohl sie davon profitieren würden. Dies könnte zu geringeren Heilungschancen führen. Andererseits führen falsch grampositive Ergebnisse zu einem verstärkten Einsatz von Antibiotika bzw. nicht zu einer Reduktion der Antibiotikamenge.

Der große Vorteil des Schnelltests mit dem neu entwickelten Rapid Aerobic Count ist die Zeitersparnis von 12 Stunden gegenüber dem in der Studie von Mansion-de Vries et al. (2014) verwendeten 24h-Petrifilm™-Konzept. Wie in deren Studie beschrieben, ist der Transport von Milchproben zu einem Labor ebenfalls nicht notwendig. So liegen die Ergebnisse innerhalb von zwei Melkzeiten vor und können die Grundlage für eine selektive Mastitistherapie bilden. Anhand der Ergebnisse können Therapieentscheidungen getroffen werden und die Therapie kann in einem Zeitrahmen begonnen werden, der nur mit minimalen Nebenwirkungen verbunden ist (Roberson, 2003). Der Test kann vom Betriebspersonal angewendet werden, da die Inokulation und die Auswertung einfach zu handhaben sind. Nach einer kurzen Einweisung konnte das Betriebspersonal den Test selbstständig durchführen. Vor der Verwendung des Tests sollte auch die Entsorgung der gebrauchten Petrifilm™-Platten organisiert werden, da diese getrennt vom normalen Restmüll entsorgt werden müssen. Gebrauchte Tests müssen dekontaminiert werden, bevor sie entsorgt werden. Dazu

könnten sie beispielsweise autoklaviert werden. Fehler bei der Auswertung von Petrifilm™-Platten können ebenfalls zu falschen Ergebnissen und damit zu falschen Therapieentscheidungen führen, die zu niedrigeren Heilungsraten oder einem erhöhten Antibiotikaeinsatz führen können. Daher ist es sehr wichtig, das Melkpersonal in der Entnahme von kontaminationsfreien Milchproben sowie in dem Ansetzen und Auswerten des Tests zu schulen. Zu beachten ist, dass es bei der Studie nur um die Genauigkeit des Tests bei klinischen Mastitiden ging. Daher werden für die subklinische Mastitis andere Ergebnisse erwartet.

Grundsätzlich kann das Schnelltestsystem als eine Grundlage für eine selektive Mastitistherapie dienen, da die diagnostische Sicherheit ausreichend hoch ist, um anhand der Ergebnisse Therapieentscheidungen auszusprechen.

2. Selektive Mastitistherapie

Das Konzept der selektiven Mastitistherapie wurde im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie bearbeitet: Ein Vergleich zweier Therapiekonzepte über einen Zeitraum von einem Jahr auf einem Milchviehbetrieb mit rund 950 laktierenden Milchkühen. Die Kühe der Herde, die an einer klinischen Mastitis erkrankten, wurden anhand ihrer Halsbandnummer in eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Somit war ein gleichmäßiges Verteilungsmuster gegeben, da die Halsbandnummer mit Beginn der ersten Laktation vergeben wurde und bis zum Abgang nicht gewechselt wurde. Im Anschluss wurde eine kontaminationsfreie Milchprobe von dem betroffenen Viertel entnommen und zytomikrobiologisch im Labor der Hochschule Hannover untersucht. Ein Teil der Probe von Kühen aus der Versuchsgruppe wurde zuvor mit einem Schnelltest (Petrifilm™ oder MastDecide™) untersucht. Kühe der Kontrollgruppe

erhielten die Standardtherapie auf dem Betrieb: eine lokale Antibiotikaapplikation. Kühe aus der Versuchsgruppe erhielten allesamt initial ein NSAID und wurden nach Auswertung des Schnelltests der Mastitismilchprobe tierindividuell und erregerabhängig therapiert. Nach Auswertung der letzten Milchleistungsdaten der Kühe, wurden alle chronisch kranken Kühe (in jeweils drei vorangegangenen Prüfungen mehr als 700.000 Zellen/ml Milch) als unheilbar definiert, so dass diese Kühe im Falle einer klinischen Mastitis kein lokales Antibiotikum erhielten. Zudem erhielten nur Kühe mit einem grampositiven Erregernachweis eine lokale Antibiose. Kühe mit systemischen Erkrankungsanzeichen (Fieber/Inappetenz) erhielten dagegen eine systemische Antibiose, unabhängig vom Schnelltestergebnis.

Die Heilungsraten beider Gruppen wurden mit denen anderer Studien verglichen. Grundsätzlich soll die Verwendung eines Schnelltest in Kombination mit einer selektiven Mastitisbehandlung zu einem geringen Einsatz von Antibiotika führen, ohne dass es zu negativen Einflüssen auf die Heilung kommt. Wie unsere Ergebnisse zeigten, waren weder die bakteriologische noch die zytologische oder klinische Heilung in der Versuchsgruppe schlechter als in der Kontrollgruppe (bakteriologische Heilung: Versuchsgruppe (**VG**): 62,5%, Kontrollgruppe (**KG**): 56,3%; zytologische Heilung: VG: 14,5%, KG: 9,9%; klinische Heilung: VG: 43,5%, KG: 21,7%). Zudem war die durchschnittliche Anzahl der angewandten lokalen und parenteralen Antibiotika pro Fall in der Kontrollgruppe etwa 50% höher als in der Versuchsgruppe. (VG: 3,07 Applikationen lokaler Antibiotika, 0,29 Applikationen parenterale Antibiotika; KG: 4,76 Applikationen lokaler Antibiotika, 0,28 Applikationen parenterale Antibiotika). So konnte die selektive Behandlung den Einsatz von Antibiotika deutlich reduzieren, wohingegen die Zahl der wiederkehrenden Mastitiden in der Versuchsgruppe höher war (VG: 20,9%, KG: 6,5%). Die Wartezeit für Sperrmilch und daraus resultierende

Einkommensverluste, waren in der Versuchs- und der Kontrollgruppe ähnlich. Auch Lago et al. (2011a) fanden keine negativen Auswirkungen auf die Heilungsraten bei der strategischen Behandlung der klinischen Mastitis. Sie konnten in ihrer Studie eine verkürzte Wartezeit für Sperrmilch von einem Tag nachweisen, die in unserer Studie aufgrund der höheren Wartezeit des verwendeten Lokalantibiotikums in der Versuchsgruppe nicht bestätigt werden konnte. Eine Studie von Mansion-de Vries et al. (2016) konnte auch eine signifikante Reduktion der mittleren Dosen lokaler Antibiotika in der Versuchsgruppe zeigen, ohne negative Auswirkungen auf die Heilungsraten. Die Heilungsraten in ihren Studien waren in der Versuchs- und Kontrollgruppe ähnlich. Außerdem zeigten 54,5% ihrer dokumentierten Milchproben kein Wachstum oder Wachstum eines gramnegativen Erregers, im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie (20,5%).

Aufgrund „hoher Milchleistung“ und minimaler Anzeichen klinischer Mastitis wurden viele Fälle klinischer Mastitis bereits vor der Zuordnung zur Kontroll- oder Versuchsgruppe aus der Studie genommen. Da diese Fälle vor ihrer Zuordnung zur Versuchs- oder Kontrollgruppe von der Auswertung ausgeschlossen wurden, hatten sie jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Der Ausschluss von Kühen, ausgehend vom Landwirt, sollte nicht die Ergebnisse beeinflussen, sondern eine hohe Milchleistung auf dem Betrieb aufrechterhalten und die Milchverluste durch Sperrmilch reduzieren. Da jede Behandlung zu Milchverlusten führt, war der Landwirt bestrebt, so wenig Tiere wie möglich zu behandeln. Daher wurden alle Tiere mit einer subjektiv hoch empfundenen Milchleistung und klinischer Mastitis, bei der nur minimale Anzeichen einer klinischen Mastitis erkennbar waren, nicht behandelt, um die Milchverluste zu minimieren. Das primäre Ziel des Betriebes war nicht die Erhöhung der Eutergesundheit, sondern eine Aufrechterhaltung der aktuellen hohen

Herdenmilchleistung. Somit wurde diese Studie unter realen Praxisbedingungen durchgeführt. Darüber hinaus wurden weitere Fälle aus der Auswertung genommen, nachdem sie der Kontroll- oder Versuchsgruppe zugeordnet wurden. Dies waren Fälle, die falsch behandelt wurden, länger behandelt wurden als vorgesehen, oder bei denen Kontrollproben fehlten. Meist bestand die Falschbehandlung in einer versehentlichen Applikation eines anderen Lokalantibiotikums, so dass dieser Fall nicht mehr auswertbar war, um die Vergleichbarkeit zu erhalten. Diese Fälle stellten wegen des fehlenden Einflusses auf die Ergebnisse allerdings kein Problem dar, da sie in der Statistik nicht einbezogen wurden. Die Abweichungen waren der schlechten Compliance auf dem Betrieb geschuldet, die unter anderem durch Sprachprobleme mit den Mitarbeitern, einem fehlenden Ansprechpartner für die Behandlung, sowie wechselndem Personal entstand. Falsche Behandlung, keine Behandlung bei Hochleistungskühen und Kühen mit minimalen Anzeichen einer klinischen Mastitis sind Auswirkungen schlechter Compliance, welche durchaus vorkommen kann beim Mitwirken von Praxisbetrieben an wissenschaftlichen Studien. Unter diesen Bedingungen zeigte das neue antibiotisch reduzierte Behandlungskonzept die gleichen Heilungsergebnisse wie die konventionelle Therapie. Sicherlich wurden die Ergebnisse durch die hohe Zellzahl, dem entsprechenden Infektionsdruck und das Vorhandensein vieler chronischer Euterentzündungen beeinflusst. Aufgrund dieser Umstände konnten viele Fälle nicht geheilt werden. Die Zahl wiederkehrender Fälle war in der Versuchsgruppe höher als in der Kontrollgruppe, wohingegen die Merzungsrate in der Kontrollgruppe doppelt so hoch war wie in der Versuchsgruppe. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu zeigen, ob dieser Effekt in Betrieben mit geringeren Zellzahlen und einem anderen Erregerspektrum reproduzierbar ist.

Die selektive Therapie von Kühen mit klinischer Mastitis erforderte einen höheren Arbeitsaufwand als die Standardtherapie auf dem Betrieb. Die Entnahme der Milchproben, die Durchführung des Schnelltests in Kombination mit der Untersuchung der Mastitis-Geschichte einer Kuh und die Messung der Temperatur sind zeitaufwendiger als die Verabreichung lokaler Antibiotika ohne Kenntnis über Erregergruppe oder Therapiewürdigkeit. Zusätzlich erforderte die verzögerte Behandlung einer Kuh zwölf Stunden nach Testansatz mehr Arbeit und eine definierte Arbeitsplanung. Dies gilt insbesondere dann, wenn mehr als eine Person für die Therapie der erkrankten Tiere zuständig ist. Die Ergebnisse der Behandlung und auch der Antibiotikamengen in der Versuchsgruppe wurden maßgeblich vom Ergebnis des Schnelltests beeinflusst, wodurch ein verzerrtes Bild entstehen könnte. Die diagnostische Sicherheit wurde jedoch für beide angewandten Tests nachgewiesen. Zudem hätten die Testergebnisse durch das Betriebspersonal, das die Schnelltests durchgeführt und ausgewertet hat, beeinflusst werden können. Daher ist eine regelmäßige Schulung in der Durchführung und Auswertung der Tests, sowie eine kontaminationsfreie Probennahme notwendig und empfehlenswert.

Der Ansatz des Schnelltests auf dem Betrieb hat keine großen Probleme bereitet. Nach zwei kleinen Schulungen, die den Ansatz und die Auswertung des Tests erklärten, waren die Mitarbeiter in der Lage, diesen fehlerfrei durchzuführen. Hierbei kann es allerdings zu betriebsindividuellen Unterschieden kommen. Gründe dafür sind vor allem Personalmangel und fehlende Motivation. Auch wenn mehrere Milchproben gleichzeitig getestet wurden, hat der Ansatz selten länger als fünf Minuten gedauert. Für das Funktionieren des Therapiekonzeptes sind folgende Aspekte erforderlich: saubere Milchprobennahme mit Einteilung in einen der drei Mastitisgrade, zeitnahe

Ansetzung des Schnelltests, gewissenhafte Auswertung des Schnelltests, Dokumentation der Maßnahmen, um die tierindividuelle Mastitisgeschichte nachvollziehen zu können.

Dieses Therapiekonzept der selektiven Mastitistherapie konnte in dieser Studie zu einem geringeren Einsatz von Antibiotika ohne negative Auswirkungen auf die Heilung führen. Die Wartezeit wurde nicht wesentlich beeinflusst, jedoch die durchschnittliche Anzahl an Antibiotika um rund die Hälfte reduziert. Die wirtschaftlichen Aspekte, die ebenfalls dazu beitragen, ob man dieses Konzept nutzt, müssen betriebsindividuell geprüft werden. Zusätzliche Kosten für die Utensilien zur Durchführung des Schnelltests (Petrifilm™: 3,7€ pro Testeinheit, MastDecide™: 10,1€ pro Testeinheit + Inkubator), nichtsteroidale Entzündungshemmer (Kosten unterschiedlich je nach Produkt) und Betriebskosten (Arbeitsaufwand, Personalkosten, Mehraufwand durch Testansatz und -auswertung) sollten mit einer Reduzierung der Antibiotikadosen (in dieser Studie um gut 50% der lokalen AB), einer etwaigen Verbesserung der Eutergesundheit (Bewusstsein schaffen für chronisch kranke Kühe, klinische Heilungsrate erhöht) und einer bei hohem Vorkommen von gramnegativen Erregern niedrigeren Anzahl an Tagen, an denen die Milchlieferung aufgrund von Hemmstoffen gesperrt ist, gegengerechnet werden. Darüber hinaus hängt dieses Konzept sehr vom Betriebspersonal und dessen Motivation ab. Das Konzept könnte ein Ansatz sein, den Einsatz von Antibiotika in der Mastitistherapie zu reduzieren, ist aber kein Ausgleich für mangelnde Prävention.

5. Zusammenfassung

Jan Kock

Untersuchung der Effekte eines evidenzbasierten Therapie- und Beratungskonzeptes auf die Eutergesundheitssituation in einem Milchviehbestand

Der Einsatz von Antibiotika in der Nutztierpraxis wird zunehmend kritisch geprüft. Im Bereich der Masttiere gibt es bereits eine staatliche Antibiotikadatenbank, in der jedem Betrieb eine Kennzahl über dessen Verbrauch zugeordnet wird. Damit wird der Einsatz von Antibiotika dokumentiert und es soll dadurch zur deren Verringerung beigetragen werden. Diese Datenbank könnte sich nach Ansicht von Experten in der Zukunft auch auf die Milchproduktion ausweiten. Gerade für die Behandlung der klinischen Mastitis des Rindes, eine der häufigsten Erkrankungen der Milchkühe, wäre es somit in Zukunft wichtig, alternative Therapiemethoden anwenden zu können, mit denen der Antibiotikaeinsatz reduziert werden kann. Diese Studie konnte zeigen, dass durch die Anwendung eines alternativen Therapiekonzeptes der Einsatz von antimikrobiellen Stoffen bei gleichbleibenden Heilungschancen verringert werden und somit ein Beitrag zur Reduzierung von Antibiotikaresistenzen geschaffen werden konnte. Die Voraussetzung dafür ist ein verlässliches Schnelltestsystem, auf dessen Grundlage Therapieentscheidungen getroffen werden können und das einfach in der Handhabung ist.

In der ersten Publikation wurde die diagnostische Sicherheit eines Schnelltestsystems der Firma 3M™ Petrifilm™ anhand von Milchproben von Kühen mit klinischer Mastitis

überprüft. Ein Teil der gewonnenen Milchprobe wurde dafür verwendet, den Schnelltest zu beimpfen. Der Großteil der Milchprobe wurde anschließend kühl gelagert und im Labor der Hochschule Hannover zytomikrobiologisch untersucht. Der Schnelltest unterschied nur zwischen grampositiven Erregern, gramnegativen Erregern und keinem Wachstum. Im Labor hingegen wurde der ursächliche Erreger genau identifiziert. Dieser wurde anschließend ebenfalls in eine der Kategorien eingeteilt, wodurch man die diagnostische Sicherheit des Testsystems ermitteln konnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität vor allem für grampositive Erreger sehr hoch war, wohingegen für gramnegative Erreger eine hohe Spezifität ausgewiesen werden konnte. Das Schnelltestsystem ist somit ein Tool, mit dem Milchproben von Kühen mit klinischer Mastitis auf dem Betrieb untersucht werden können und anhand dessen Ergebnisse Therapieempfehlungen ausgesprochen werden können. Ein solcher Schnelltest ist gewissermaßen die Voraussetzung für eine selektive Mastitistherapie, bei der nicht alle Kühe in derselben Art und Weise behandelt werden, sondern jede Kuh individuell beurteilt wird.

Die zweite Publikation stellt eine Abhandlung über solch ein Therapiekonzept dar, das auf einem großen Milchviehbetrieb im Nordwesten Deutschlands angewendet wurde. Kühe mit einer klinischen Mastitis wurden anhand ihrer Halsbandnummer in eine Kontroll- und eine Versuchsgruppe unterteilt, bei der die Kühe mit einer klinischen Mastitis aus der Kontrollgruppe betriebsüblich mit einem lokalen antibiotischen Euterpräparat behandelt wurde. Kühe aus der Versuchsgruppe erhielten dagegen initial ein NSAID. Eine etwaige antibiotische Therapie wurde nur den Tieren zuteil, bei denen der angewandte Schnelltest einen grampositiven Erreger in der Milchprobe nachgewiesen hat und bei denen in der Mastitishistorie der laufenden Laktation keine Anzeichen für eine chronische Entzündung vorlagen. Die Ergebnisse konnten die

Aussagen aus früheren Studien bestätigen und zudem einen Zeitgewinn von 12 Stunden nachweisen, da das Schnelltestergebnis bereits nach 12 Stunden vorlag. Die Heilungschancen von Kühen aus der Versuchsgruppe, die selektiv behandelt wurden, waren nicht schlechter als die der Kontrollgruppe. Die klinische Heilung, bakteriologische Heilung und zytologische Heilung wurden nicht negativ beeinflusst. Im Gegenteil, die klinische Heilung war in der Versuchsgruppe sogar signifikant höher, als in der Kontrollgruppe. Zudem konnten rund 50% der lokalen Antibiotika in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe eingespart werden.

Diese Arbeit konnte zeigen, wie durch Einsatz eines Mastitisschnelltests in Kombination mit einer Beurteilung der kuhindividuellen Krankheitsgeschichte eine Reduzierung der durchschnittlichen Antibiotikamenge erreicht werden konnte ohne negative Einflüsse auf die Heilungsraten hinnehmen zu müssen. Die Kosten bei der Einführung des neuen Therapiekonzeptes beruhen auf zusätzlichen Kosten für Utensilien zur Durchführung des Schnelltests, nichtsteroidale Entzündungshemmer, sofern sie nicht bisher schon Anwendung fanden, und Betriebskosten für den Arbeitsmehraufwand. Dem gegenüber steht allerdings ein Mehrerlös aus Milch: Bei alleiniger Gabe des NSAID in dieser Studie betrug die Wartezeit für Sperrmilch auf Milch lediglich anderthalb Tage bis die Milch wieder geliefert werden konnte. Bei einer lokalen Antibiotikagabe ist sie ungleich länger. Dadurch kann die Milch bei gleichbleibender schneller klinischer Heilung, wenn die Milch ohne besonderen Befund ist, zu einem früheren Zeitpunkt wieder vermarktet werden, was zu einem Mehrerlös aus der gewonnen Milch führt. Zudem können die Ausgaben durch eine Reduzierung der Antibiotikadosen (in dieser Studie um gut 50% der lokalen AB) gesenkt werden. Ebenso kann es zu einer Verbesserung der Eutergesundheit kommen (Bewusstsein schaffen für chronisch kranke Kühe, erhöhte klinische Heilungsrate).

Die Ergebnisse dieser Studie sollten dabei für jeden Betrieb individuell betrachtet werden. Durch betriebliche Unterschiede im Erregerspektrum der Herde kann es zu Unterschieden in den Heilungsraten und im Einsatz von lokalen Antibiotika kommen. Jedoch konnte in dieser Studie auf einem Betrieb mit vielen eukaryotischen Mastitiserregern bereits eine Antibiotikareduktion bei gleichbleibenden oder sogar verbesserten (klinische Heilungsrate) Heilungsraten erzielt werden. Einen wichtigen Aspekt stellt allerdings die Anwendbarkeit des Schnelltests und die gezogenen Milchproben dar. Der Ablauf muss auf jedem Betrieb individuell gelehrt und besprochen werden, damit ein reibungsloser Ablauf gewährleistet werden kann. Fehler in der Auswertung oder bereits beim Ziehen der Milchprobe können zu Fehlern in der Therapie führen, wodurch es unter Umständen zu fehlerhaften Behandlungen kommen kann. Als mögliche Folge könnten verschlechterte Heilungsraten auftreten. Die Europäische Kommission fordert zudem bereits die Förderung der Verwendung von Schnelldiagnosetests zur Identifizierung von Keimen, die Mastitis verursachen, um die Verwendung sowohl intramammärer als auch injizierbarer antimikrobieller Mittel bei milchliefernden Kühen auf ein Mindestmaß zu beschränken (EU 2015/C 299/04). Somit sollten Milchviehbetriebe sich in naher Zukunft damit auseinandersetzen müssen.

Die selektive Mastitistherapie kann somit ein Ansatz sein, durch den man eine Reduzierung des Antibiotikaverbrauchs erreichen kann, der für die Sicherstellung der Tiergesundheit notwendig ist. Diese Reduktion wird nicht zu Lasten der Tiergesundheit durchgeführt, sondern kann auch zu einer Verbesserung der Heilungsraten führen, womit man einen aktiven Beitrag zum Tierschutz leisten kann.

6. Summary

Jan Kock

Investigation of the effects of an evidence-based therapy and counselling concept on the udder health situation in a dairy herd

The use of antibiotics in large animal practices is increasingly being critically examined. In the field of animals reared for slaughter there is already a state databank for antibiotics in which every farm is allocated an index on their own use. Thereby, the use of antibiotics is documented and this should in turn contribute to their reduction. This databank could from the point of view of experts also be extended to milk production in future. Especially for treating clinical mastitis in cattle, one of the most frequently occurring disease in dairy cows, it would be of importance in future to use alternative methods of therapy whereby the use of antibiotics could be reduced. This study was able to show that through implementing alternative therapy concepts, the use of anti-microbial substances could be reduced in the case of consistent chances of a cure, thereby contributing to achieving a reduction in antibiotic resistance. The prerequisite for this is a reliable easy to use rapid on-farm test system on the basis of which therapy decisions can be taken.

Consequently, in the first publication, the diagnostic certainty of a rapid test system of the company 3M™ Petrifilm™ was checked, based on milk samples from cows with clinical mastitis. A percentage of the milk sample was used for this purpose to inoculate the rapid test. The remainder of the milk sample was then refrigerated and examined cytomicrobiologically at the Laboratory of the University of Applied Sciences and Arts

in Hannover. The rapid test differentiated only between Gram-positive pathogens, Gram-negative pathogens and no growth. On the contrary, the causal pathogen was precisely identified at the laboratory. Afterwards, this was also allocated to one of the categories, whereby the diagnostic certainty of the test system could be determined. It could be shown that the sensitivity above all for Gram-positive pathogens was very high, whereas for Gram-negative pathogens a high specificity could be identified. The rapid on-farm test system is thereby a tool with which milk samples from cows with clinical mastitis can be examined on the farm and as a result of these results therapy recommendations are able to be made. Such a rapid test is to some extent the prerequisite for a selective mastitis therapy by which not all cows can be treated in the same manner, but each cow can be assessed individually.

The second publication is a paper about such a therapy concept which was implemented on a large dairy farm in North-West Germany. Cows were divided into a control and examination group based on their collar number. The cows with clinical mastitis from the control group were being treated with a local antibiotic pharmaceutical used on the farm. In contrast, cows in the examination group initially received an NSAID. Antibiotic therapy was only given to the animals where the applied rapid test proved a Gram-positive pathogen in the milk sample and no signs of a chronic inflammation were present in the mastitis history in the current lactation. The findings could confirm evidence from earlier studies. Additionally, the study could prove a gain in time of twelve hours compared to previous studies because the rapid on-farm test could be evaluated already twelve hours after implementation. The healing chances of cows from the test group, which were selectively treated, were not worse than those from the control group. The clinical cure, bacteriological cure and cytological cure were not negatively influenced. On the contrary, the clinical cure was even significantly

higher in the test group than in the control group. Additionally, approximately 50 % of the local antibiotics in the test group could be saved compared to the control group.

This study could show how a reduction in the average amount of antibiotics could be achieved by using a mastitis rapid on-farm test in combination with an assessment of the individual cow's medical history without there having to be any negative influences on the cure rates.

The costs for introducing the new therapy concept are based on additional costs for utensils for carrying out the rapid test and non-steroidal anti-inflammatory drugs insofar as that they were not previously used, and operating costs for additional workload. On the other hand, there is an additional profit from milk: for sole administration of NSAID, the withdrawal time for milk was only one and a half days before the milk could be delivered again. When administering local antibiotics, it is much longer. Therefore, the milk can be marketed again at an earlier point in time with a consistent rapid clinical cure if the milk shows negative results, which leads to additional profits gained from the obtained milk. Moreover, expenditure can be reduced by reducing antibiotic doses (local antibiotics doses in this study being reduced by more than 50%). There may also be an improvement in udder health (raising awareness of chronically ill cows, increased clinical cure rate).

The results of this study should be considered individually for each farm. Operational differences in the pathogen spectrum of the herd can lead to differences in the cure rates and in the use of local antibiotics. However, in this study a reduction in antibiotics could already be achieved on a farm with many eukaryotic mastitis pathogens with constant or even improved (clinical cure rate) cure rates. Nevertheless, taking the milk samples, implementing and evaluating the test are of great importance. The procedure must be taught and discussed individually on each farm in order to ensure an accurate

process. Errors in the evaluation or already in the drawing of the milk sample can lead to errors in the therapy, whereby it can result in incorrect treatments. As a possible consequence, diminished cure rates could occur. The European Commission also already calls for the promotion of the use of rapid diagnostic tests to identify mastitis-causing pathogens in order to minimise the use of both intramammary and injectable antimicrobial agents in dairy cows (EU 2015/C 299/04). Dairy farms should therefore have to deal with this in the near future.

The selective mastitis therapy can be an approach through which a reduction in the use of antibiotics can be achieved, this being necessary for safeguarding animal health. This reduction will not be carried out at the expense of animal health but can also lead to an improvement in the healing rates, with which an active contribution can be made to the protection of animals.

7. Literaturverzeichnis

Barkema, H.W., Y.H. Schukken u. R.N. Zadoks (2006):
The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis.
J. Dairy Sci. 89, 1877–1895

Barza, M., S. Gorbach u. S.J. DeVincent (2002):
The Need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture. Ecological and Human Health Consequences.
Clin. Infect. Dis. 34 (Suppl 3), 71-72

Bradley, A.J., K.A. Leach, J.E. Breen, L.E. Green u. M.J. Green (2007):
Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales.
Vet. Rec. 160(8), 253-258

Degen, S., J.-H. Paduch, M. Hoedemaker u. V. Krömker (2015):
Factors affecting the probability of bacteriological cure of bovine mastitis.
Tierärztl. Prax. 43(G), 222-227

Deluyker, H. A., S.N. van Oye u. J.F. Boucher (2005):
Factors affecting cure and somatic cell count after Pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows.
J. Dairy Sci. 88(2), 604-614

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) (2002):
Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem.
4. Auflage, Verlag der DVG e.V., Gießen

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) (2009):
Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern.
2. Auflage, Verlag der DVG e.V., Gießen

Erskine, R.J., S. Wagner, u. F.J. DeGraves (2003):
Mastitis therapy and pharmacology.
Vet. Clin. Food Anim. 19, 109-138

Gitau, G.K., R.M. Bundi, J. Vanleeuwen u. C.M. Mulei (2013):
Evaluation of Petrifilms™ as a diagnostic test to detect bovine mastitis organisms in Kenya.
Trop. Anim. Health Prod. 45, 883–886

Gomes, F. u. M. Henriques (2015):
Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches.
Curr. Microbiol. 72(4), 377-382.

Griffioen, K., G.E. Hop, M.M.C. Holstege, A.G.J. Velthuis, T.J.G.M. Lam u. 1Health4Food – Dutch Mastitis Diagnostics Consortium (2016):
Dutch dairy farmers' need for microbiological mastitis diagnostics.
J. Dairy Sci. 99, 1-11.

Guterbock, W.M., A.L. Van Eeenennaam, R.J. Anderson, I.A. Gardner, J.S. Cullor u. C.A. Holmberg (1993):
Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical mastitis caused by environmental pathogens.
J. Dairy Sci. 76, 3437–3444

Hill, A.E., A.L. Green, B.A. Wagner u. D.A. Dargatz (2009):
Relationship between herd size and annual prevalence of and primary antimicrobial treatments for common diseases on dairy operations in the United States.
Prev. Vet. Med. 88(4), 264-277

Hoe, F.G.H. u. P.L. Ruegg (2005):
Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 227(9), 1461-1468

Krömker, V. (2007):
Kurzes Lehrbuch der Milchkunde und Milchhygiene.
1. Aufl. Verlag Parey, Stuttgart

Krömker, V., J.-H. Paduch, D. Klocke u. C. Zinke (2010):
Microbiological investigation of culture negative milk samples of clinical mastitis cows.
Milchwissenschaft 65, 123–126

Lago, A., S.M. Godden, R. Bey, P.L. Ruegg u. K. Leslie (2011a):
The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes.
J. Dairy Sci. 94, 4441–4456

Lago, A., S.M. Godden, R. Bey, P.L. Ruegg u. K. Leslie (2011b):
The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival.
J. Dairy Sci. 94, 4457-4467

Lam, T.J.G.M, B.H.P. van den Borne, J. Jansen, K. Huijps, J.C.L. van Veersen, G. van Schaik u. H. Hogeveen (2013):
Improving bovine udder health: A national mastitis control program in the Netherlands.
J. Dairy Sci. 96, 1301-1311

Leimbach, S u. V. Krömker (2018):
Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups.
J. Dairy Sci. 101, 6357-6365

Lewy, S.B. u. B. Marshall (2004):
Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.
Nat. Med. 10(12), 122-129

Mansion-de Vries, E.M., N. Knorr, J.-H. Paduch, C. Zinke, M. Hoedemaker u. V.Krömker (2014):
A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm.
Prev. Vet. Med. 113, 620–624

Mansion-de Vries, E.M., M. Hoedemaker u. V. Krömker (2015):
Aspekte einer evidenzbasierten Therapie klinischer Mastitiden.
Tierärztl. Prax. 43 (G), 287–295

Mansion-de Vries E.-M., J. Lücking, N. Wente, C. Zinke, M. Hoedemaker u. V. Krömker (2016):
Comparison of an evidence-based and a conventional mastitis therapy concept with regard to cure rates and antibiotic usage.
Milk Sci. Int., 27-32.

McCarron, J.L., G.P. Keefe, S.L. McKenna, I.R. Dohoo u. D.E. Poole (2009):
Evaluation of the University of Minnesota Tri-Plate and 3M Petrifilm for the isolation of S. aureus and Streptococcus species from clinically mastitic milk samples.
J. Dairy Sci. 92, 5326–5333

McDougall, S., M.A. Bryan u. R.M. Tiddy (2009):
Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment and culling of dairy cows with mild clinical mastitis.
J. Dairy Sci. 92, 4421–4431

Merle, R., Y. Mollenhauer, P. Hajek, M. Robanus, C. Hegger-Gravenhorst, W. Honscha, A. Käsbohrer u. L. Kreienbrock (2013):
Monitoring of antibiotic consumption in cattle on agricultural farms.
Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 126, 318–325

Neeser, N.L., W.D. Hueston, S.M. Godden u. R.F. Bey (2006):
Evaluation of the use of an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 228(2), 254–260

National Mastitis Council (NMC), Madison, Wisconsin, USA (1999):
Laboratory handbook on bovine mastitis.

In: NMC, Madison, WI

Pinzón-Sánchez, C. u. P.L. Ruegg (2011):
Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis.
J. Dairy Sci. 94(7), 3397–3410

Pol, M. u. P.L. Ruegg (2007):
Treatment Practices and Quantification of Antimicrobial Drug Usage in Conventional and Organic Dairy Farms in Wisconsin.
J. Dairy Sci. 90(1), 249-261.

Poutrel, B., M.R. Stegemann, O. Roy, F. Pothier, N. Tilt u. M. Payne-Johnson (2008):
Evaluation of the efficacy of systemic danofloxacin in the treatment of induced acute *Escherichia coli* bovine mastitis.
J. Dairy Res. 75(3), 310-318

Roberson, J.R. (2003):
Establishing treatment protocols for clinical mastitis.
Vet. Clin. Food Anim. 19, 223–234

Roberson, J.R. (2012):
Treatment of Clinical Mastitis.
Vet. Clin. Food Anim. 28, 271-288

Sackett, D.L., W.M.C. Rosenberg, J.A. Muir Gray, R.B. Haynes u. W.S. Richardson (1996):
Evidence based medicine: what it is and what it isn't.
Brit. Med. J. 312, 71–72

Saini, V., J.T. McClure, D.T. Scholl, T.J. DeVries u. H.W. Barkema (2012):
Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis Staphylococcus aureus isolates on Canadian dairy farms.
J. Dairy Sci. 95(4), 1921-1929

Santman-Berends, I.M.G.A., T.J.G.M. Lam, J. Keurentjes u. G. van Schaik (2015):
An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data.
J. Dairy Sci. 98(10), 6965-6977

Schukken, Y.H., M.J. Zurakowski, B.J. Rauch, B. Gross, L.L. Tikofsky u. F.L. Welcome (2013):
Noninferiority trial comparing a first-generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows.
J. Dairy Sci 96, 6763-6774

Smith, K. L. (1983):
Mastitis control: a discussion.

J. Dairy Sci. 66, 1790-1794

Sol, J., O.C. Sampimon, H.W. Barkema u. Y.H. Schukken (2000):
Factors Associated with Cure after Therapy of Clinical Mastitis caused by *Staphylococcus aureus.*
J. Dairy Sci. 83, 278–284

Suojala, L., H. Simojoki, K. Mustonen, L. Kaartinen u. S. Pyörälä (2010):
Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis.
J. Dairy Sci. 93, 1960–1969

Swinkels, J.M., P. Cox, Y.H. Schukken u. T.J.G.M. Lam (2013):
Efficacy of extended cefquinome treatment of clinical *Staphylococcus aureus* mastitis.
J. Dairy Sci. 96(8), 4983–4992

Viora, L., E.M. Graham, D.J. Mellor, K. Reynolds, P.B.A. Simoes u. T.E. Geraghty (2014):
Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis.
Vet. Rec. 175(4), 89

Wenz, J.R., G.M. Barrington, F.B. Garry, K.D. McSweeney, R.P. Dinsmore, G. Goodell u. R.J. Callan (2001):
Bacteremia associated with naturally occuring acute coliform mastitis in dairy cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 219(7), 976-981

Ziesch, M. u. V. Krömker (2016):
Factors influencing bacteriological cure after antibiotic therapy of clinical mastitis.
Milk Sci. Int. 69, 7-14

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich abschließend recht herzlich bei einigen Personen bedanken, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Dazu gehört an erster Stelle Prof. Dr. Volker Krömker, der mir dieses Thema zur Verfügung gestellt hat und mir bei der Arbeit stets mit Rat zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich ganz herzlich dem Betriebspersonal des Milchviehbetriebes danken. Dabei seien namentlich Eike und Anja, sowie vor allem auch Kristin zu nennen, ohne die die zahlreichen Proben nie zustande gekommen wären. Dazu zählt auch Jörn, als Tierarzt, mit dem ich mich hinsichtlich der Eutergesundheit stets auf dem kurzen Dienstweg austauschen konnte.

Ein großes Dankeschön gilt auch Nicole und Yanchao, die unermüdlich die Milchproben im Labor untersucht haben und sich stets die Zeit genommen haben, meine Rückfragen zu beantworten.

Zuletzt möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken. Durch ihre Unterstützung - sei es durch das zur Verfügung stellen eines Autos, bis hin zum positiven Enthusiasmus, der diese Arbeit vorangebracht hat - ist diese Arbeit erst zu dem geworden, was sie heute ist. Sie standen mir immer zur Seite und waren selbstlos für mich da, wenn ich sie gebraucht habe. Ich kann Ihnen dafür gar nicht genug danken.