

Universitätsklinik für Wiederkäuer¹ und Institut für Milchygiene², Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich

In vitro-Empfindlichkeit von mastitisassoziierten katalasenegativen äskulinpositiven Kokken gegenüber veterinärmedizinisch relevanten antimikrobiellen Wirkstoffen in Österreich

R. WALD¹, C. HEDERER¹, B. STESSL², T. WITTEK¹ und M. BAUMGARTNER¹

eingelangt am 14. November 2017

angenommen am 13. Juni 2018

Schlüsselwörter: *Streptococcus uberis*, Enterokokken, Laktokokken, Mastitis, minimale Hemmkonzentration, Antibiotika.

Keywords: *Streptococcus uberis*, enterococci, lactococci, mastitis, minimal inhibitory concentration, antibiotics.

Zusammenfassung

Zu den bedeutendsten Mastitiserregern werden grampositive katalasenegative äskulinpositive Kokken gezählt. In dieser großen Gruppe der Mikroorganismen können sich Therapieansätze aufgrund unterschiedlicher Heilungsaussichten unterscheiden und eine antibiotische Empfindlichkeitsprüfung wird gemäß dem Kodex der „Guten Veterinärmedizinischen Praxis“ empfohlen. Um die *in vitro*-Empfindlichkeit dieser Euterpathogene gegenüber elf in Österreich veterinärmedizinisch relevanten antimikrobiellen Wirkstoffen (Amoxicillin/Clavulansäure 2:1, Ampicillin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom, Erythromycin, Kanamycin/Cefalexin 10:1, Marbofloxacin, Oxacillin, Penicillin G, Pirlimycin) zu untersuchen, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) durch das kommerziell erhältliche Testsystem „MICRONAUT-S Mastitis 3“ (MERLIN Diagnostika) bestimmt. Die Isolate (n=115) stammten aus Viertelgemelksproben von Kühen mit klinischer und subklinischer Mastitis, die in das Milchlabor der Universitätsklinik für Wiederkäuer der Vetmeduni Vienna zur bakteriologischen Untersuchung eingesandt worden waren. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens diente der Speziesbestätigung. Die Isolate konnten als *Streptococcus uberis* (n=77), *Enterococcus* spp. (n=20), *Lactococcus* spp. (n=14) und *Aerococcus* spp. (n=4) identifiziert werden. *Streptococcus uberis* wies niedrige MHK₉₀-Werte für Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure,

Summary

In vitro-susceptibility of mastitis associated catalase-negative, gram-positive, esculin hydrolysing cocci to antimicrobial agents in Austria

Introduction

Gram-positive, catalase-negative, esculin-hydrolysing cocci are frequently involved in bovine mastitis. The group of udder pathogens is large and treatment protocols may differ. As Good Veterinary Practice requires susceptibility testing, we have assessed the susceptibility of microorganisms *in vitro* to veterinary antimicrobial agents in use in Austria.

Materials and methods

Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined using the commercially available MICRONAUT-S Mastitis 3 assay (MERLIN Diagnostika). Eleven antimicrobials were tested: amoxicillin/clavulanic acid 2:1, ampicillin, cefazoline, cefoperazone, cefquinome, erythromycin, kanamycin/cephalexin 10:1, marbofloxacin, oxacillin, penicillin G and pirlimycin. Pathogens that cause mastitis (n=115) were obtained from milk samples submitted to the diagnostic laboratory of the Clinic for Ruminants in Vienna for bacteriological examination. Sequencing of the 16S rRNA gene was used to confirm identity.

Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom und Kanamycin/Cefalexin auf, aber 20,8 % bzw. 26,0 % der Isolate wurden als resistent gegenüber Erythromycin und Pirlimycin klassifiziert. Keines der Enterokokkenisolate war gegenüber Penicillin, Ampicillin oder Amoxicillin/Clavulansäure resistent, aber alle zeigten hohe MHK Werte gegenüber Cephalosporinen, Oxacillin, Marbofloxacin und Pirlimycin. Das antibiotische Profil der Lacto- und Aerokokken wich von dem der *Sc. uberis*-Isolate ab: Die Laktokokken wiesen höhere MHK₉₀ gegenüber Penicillin G, Oxacillin, Cefoperazon sowie Kanamycin/Cefalexin auf, die Aerokokken niedrigere MHK-Werte gegenüber Pirlimycin und Erythromycin. Basierend auf diesen Ergebnissen können Penicilline als Therapeutika der ersten Wahl für Mastitiden durch katalasenegative äskulinpositive Kokken empfohlen werden.

Abkürzungen: ATCC = American Type Culture Collection; BU = Bakteriologische Untersuchung; BVL = Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute; DVG = Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft; EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; GERM-Vet = German National Antibiotic Resistance Monitoring; MHK = minimale Hemmkonzentration

■ Einleitung

Eutererkrankungen sind eine der häufigsten gesundheitsbedingten Abgangsursachen in Milchviehherden und gelten weltweit als kostenintensivste Produktionserkrankung (HOGEVEEN et al., 2011; ZUCHTDATA, 2016). Zur langfristig erfolgreichen Therapie und Prophylaxe von Mastitiden ist die Identifikation des kausalen Agens durch eine bakteriologische Untersuchung (BU) von Viertelgemelksproben unerlässlich (BRITTEN, 2012). Im Rahmen des Projektes „Advancement of Dairying in Austria“ gaben über die Hälfte der befragten österreichischen Tierhalter an, bei Kühen mit Symptomen einer Euterentzündung eine BU durchführen zu lassen (FIRTH et al., 2017). In den letzten fünf Jahren wurden im Milchlabor der Klinik für Wiederkäuer in knapp 39 % der bakteriologisch positiven Viertelgemelksproben (n=27.474) grampositive katalasenegative und äskulinpositive Kokken nachgewiesen. In dieser Gruppe werden Vertreter der Gattungen *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* und *Aerococcus* zusammengefasst. Hierbei stellt *Sc. uberis* die größte Fraktion dar (n=4.797). Aufgrund fehlender einfacher, aber sensitiver biochemischer Testsysteme werden *Aerococcus* spp. und *Lactococcus* spp. in der Routinediagnostik in der Regel nicht als solche identifiziert. Dies führt dazu, dass die Prävalenz dieser Mastitiden unbekannt ist (WYDER et al., 2011; WERNER et al., 2014; LIU et al., 2015).

Results

Isolates were identified as *Streptococcus* (*Sc.*) *uberis* (n=77), *Enterococcus* spp. (n=20), *Lactococcus* spp. (n=14) and *Aerococcus* spp. (n=4). *Sc. uberis* had low MIC₉₀ for penicillin G, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefazoline, cefoperazone, cefquinome and kanamycin/cephalexin but 20.8 % and 26.0 % of the isolates were resistant to erythromycin and pirlimycin. None of the enterococci was resistant to penicillin, ampicillin or amoxicillin/clavulanic acid but all had high MIC₉₀ values for cephalosporins, oxacillin, marbofloxacin and pirlimycin. *Lactococcus* spp. and *Aerococcus* spp. showed different patterns of antimicrobial susceptibility: the lactococci had higher MIC₉₀ for penicillin G, oxacillin, cefoperazone and kanamycin/cephalexin while the aerococci showed lower MIC values for pirlimycin and erythromycin.

Conclusion

Penicillins can be recommended for the first-line treatment of mastitis caused by catalase-negative, gram-positive, esculin-hydrolysing cocci in Austria.

Die Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Mastitistherapie oder zum Trockenstellen gehört zu den häufigsten Indikationen eines Antibiotikaeinsatzes in Milchviehbetrieben (RUEGG et al., 2015). Gemäß den Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln ist nur ein therapeutischer oder metaphylaktischer Antibiotikaeinsatz vertretbar. Die Verwendung darf nur erfolgen, wenn belegt oder mit Sicherheit anzunehmen ist, dass der zu bekämpfende bakterielle Erreger gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum empfindlich ist (BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT, 2013). Akute klinische Mastitiden erfordern jedoch in der Regel eine unmittelbare Therapieentscheidung. Ein BU-Ergebnis hat dennoch insofern Aussagekraft, dass es die Analyse des Mastitisgeschehens und damit eine Leitkeimbestimmung in einer Herde ermöglicht bzw. der Korrektur bereits begonnener Therapieverfahren dienen kann. Im Gegensatz dazu sollte die Wahl des Therapieverfahrens bei subklinischen Mastitiden auf Basis eines bakteriologischen Befundes und eines Antibiotogrammes erfolgen. Das Risiko der Entwicklung von Resistenzen soll durch pathogenspezifische Therapieansätze reduziert werden, da der Antibiotikaeinsatz gezielter (schmales Spektrum und evidenzbasierte Therapiedauer) erfolgen kann (HILLERTON u. KLIEM, 2002; SCHUKKEN et al., 2009; SWINKELS et al., 2014; MANSION-DE VRIES et al., 2015; SMITH et al., 2016; KRÖMKER u. LEIMBACH, 2017).

Die Durchführung einer antibiotischen Empfindlichkeitsprüfung muss strikt vorgegebenen international anerkannten Standards entsprechen. Nur dann können die Messwerte korrekt abgelesen und interpretiert werden. Entsprechende Standards werden regelmäßig durch das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) und das nordamerikanische Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) aktualisiert und veröffentlicht. Es ist zu beachten, dass nur Grenzwerte der entsprechenden Bakterienspezies für die passende Indikation der jeweiligen Tierart angewendet werden sollten (SCHWARZ et al., 2014). Bis auf den inzwischen öffentlich zugänglichen „Antimicrobial Susceptibility Testing Standard VET01S“ des CLSI sind die meisten anderen Grenzwerte zur Interpretation der Ergebnisse einer antibiotischen Empfindlichkeitsprüfung auf Wirkstoffe, die in der Humanmedizin eingesetzt werden, bezogen. Dieses CLSI-Dokument unterscheidet zwischen Menschen, einzelnen Tierarten (Hunden, Katzen, Pferden, Rindern und Schweinen) sowie Organsystemen, wobei nicht für alle diese Zielgruppen für jeden Wirkstoff und jede Indikation Grenzwerte zur Verfügung stehen (SCHWARZ et al., 2003, 2010; CLSI, 2015). Die EUCAST-Standards hingegen beziehen sich auf Humanisolate und beinhalten die Testung spezieller Veterinärpathogene wie *Sc. uberis* nicht. Dadurch ist in der Veterinärmedizin die Anwendung dieser Standards nur eingeschränkt möglich und die Kategorisierung erhobener Messwerte in „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ erschwert. In der Routinediagnostik werden hauptsächlich der Agardiffusionstest oder die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Mikrodilutionsverfahren durchgeführt, wobei FESSLER et al. (2017) letztere als Methode der Wahl beschreiben. Im Mastitisbereich hingegen wird überwiegend mit dem Agardiffusionstest gearbeitet (DARGATZ et al., 2017). Die Bestimmung der MHK ermöglicht aber im Gegensatz zu der Ermittlung des Hemmhofdurchmessers im Agardiffusionstest eine quantitative Aussage zur Empfindlichkeit der Bakterien sowie der benötigten Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe (SCHWARZ et al., 2003, FESSLER et al., 2017).

Studien aus Frankreich und Deutschland beschreiben einen Anstieg der Penicillinresistenzraten von *Sc. uberis*. Dies führt dazu, dass Makrolide und Cephalosporine als Alternativen eingesetzt werden (HAENNI et al., 2010; KRÖMKER et al., 2014). Über die antibiotische Empfindlichkeit mastitisassoziierter Lakto- und Aerokokken sind nach Kenntnisstand der Autoren keine Ergebnisse publiziert. Ziel dieser Untersuchungen war es daher, die Sensitivität von katalasenegativen äskulinpositiven Kokken gegenüber Wirkstoffen, die in der Mastitistherapie eingesetzt werden, zu untersuchen. Die Hypothese lautete, dass sich zwar innerhalb der verschiedenen Spezies Unterschiede im Resistenzmuster nachweisen lassen, aber Penicilline jedoch als Mittel der ersten Wahl in der Therapie von Streptokokkenmastitiden eingesetzt werden können.

■ Material und Methoden

Herkunft und Identifizierung der Isolate

Die Untersuchungen wurden im Milchlabor der Universitätsklinik für Wiederkäuer der Veterinärmedizinischen Universität Wien vom Sommer 2014 bis zum Sommer 2015 durchgeführt. Die Isolate wurden aus Viertelgemelksproben von Tieren mit klinischer oder subklinischer Mastitis isoliert, biochemisch charakterisiert, kryokonserviert und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Milchhygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien mittels Sequenzierung des 16S rRNA Gens bis auf Speziesebene identifiziert (WALD et al., 2017). Voraussetzungen für die Aufnahme in die Studie waren das Wachstum in Reinkultur, ein Mastitisvorbericht (lokale oder systemische Erkrankung, Milchveränderung, erhöhte Zellzahl) sowie der mikroskopische Nachweis (Ölimmersion, 1000fache Vergrößerung) von neutrophilen Granulozyten im Sediment der Milchprobe.

Für die Sensitivitätsprüfung wurden 115 mastitisassoziierte grampositive katalasenegative äskulinpositive Kokken (77 *Sc. uberis*, 20 *Enterococcus* spp., 14 *Lactococcus* spp., vier *Aerococcus* spp.) von 97 Kühen aus 48 Betrieben in Niederösterreich, Salzburg und der Steiermark herangezogen. Die Speziesverteilung der 20 getesteten Enterokokken setzte sich wie folgt zusammen: *E. faecalis* (n=6), *E. faecium* (n=5), *E. saccharolyticus* (n=5), *E. cecorum* (n=2), *E. mundtii* (n=1), *E. hirae* (n=1). Die Laktokokken wurden als *L. lactis* (n=6) und *L. garviae* (n=8) identifiziert. Alle vier Aerokokken konnten *A. viridans* zugeordnet werden.

Antibiotische Empfindlichkeitsprüfung

Die MHK-Bestimmung erfolgte von insgesamt 115 Feldisolaten sowie von fünf weiteren Referenz- oder Qualitätskontrollstämmen aus der American Type Culture Collection (ATCC) (*A. viridans* ATCC 700406, *L. lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Sc. uberis* ATCC 700407, *E. faecalis* ATCC 29212, *Sc. pneumoniae* ATCC 49619). Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Testsystem auf Basis der Bouillon-Mikrodilution „MICRONAUT-S Mastitis 3“, das für Erreger von Mastitiden der Rinder konzipiert ist, eingesetzt. Das Testpanel umfasst neben der Wachstumskontrolle elf antibiotische Wirkstoffe in folgenden Konzentrationen: Amoxicillin/Clavulansäure (4/2–32/16 mg/l), Ampicillin (4–16 mg/l), Cefazolin (4–32 mg/l), Cefoperazon (2–16 mg/l), Cefquinom (1–8 mg/l), Erythromycin (0,25–4 mg/l), Kanamycin/Cefalexin (4/0,4–32/3,2 mg/l), Marbofloxacin (0,25–2 mg/l), Oxacillin (1–4 mg/l), Penicillin G (0,0125–8 mg/l) und Pirlimycin (1–4 mg/l). Die kryokonservierten Stämme wurden zunächst auf Columbia-Agar mit 5 % Schafblutzusatz rekultiviert. Mehrere einzeln liegende Kolonien einer 18 bis 24 Stunden alten Reinkultur wurden in 5 ml steriler, 0,9%iger NaCl-Lösung homogenisiert, bis die Trübung einem McFarland-Standard von 0,5 entsprach. Für die Beimpfung der Mikrotiterplatten wurde die Bakterien suspension gemäß den Herstellerangaben im Verhältnis 1:110 in Mueller-Hinton-Bouillon verdünnt und mit einer Multikanalpipette je 100 µl/well aufgetragen. Die Platten konnten nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C entsprechend der Gebrauchsanleitung visuell abgelesen werden. Zusätzlich wurde für alle Isolate ein β-Laktamase-Blättchen-Test durchgeführt, bei dem *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 als Positivkontrolle fungierte.

Grenzwerte und statistische Auswertung

Als MHK wird die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, die zu einer Inhibierung des bakteriellen Wachstums führt, gewertet. MHK_{50} bzw. MHK_{90} beschreiben die MHK-Werte, bei denen ≥ 50 % bzw. ≥ 90 % der Isolate einer Testpopulation im Wachstum gehemmt werden (SCHWARZ et al., 2003; 2010).

Die Interpretation der ermittelten Werte von *Sc. uberis* und *Enterococcus* spp. erfolgte nach den "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals 2015" des CLSI bzw. gemäß den „Clinical Breakpoints 2017 Version 7.0“ des EUCAST (Tab. 1 u. 2). Die Isolate der sechs verschiedenen Enterokokkenspezies wurden zusammengefasst ausgewertet, da die von CLSI und EUCAST publizierten Grenzwerte übergreifend für *Enterococcus* spp. gültig sind. Da für *Sc. uberis* bei dem hier eingesetzten Testpanel nur der Grenzwert von Pirlimycin veröffentlicht ist, wurde auf Angaben für die Viridans-Streptokokkengruppe zurückgegriffen. Angaben aus wissenschaftlichen Publikationen wurden gemäß der Empfehlung des Arbeitskreises Antibiotikaresistenz der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) für Kanamycin/Cefalexin (PILLAR et al., 2009) und Cefoperazon (FESSLER et al., 2012) berücksichtigt.

Keine Interpretation ist derzeit für MHK-Werte von *Lactococcus* spp. und *Aerococcus* spp. möglich, da diese in den oben erwähnten Grenzwerttabellen nicht berücksichtigt sind. Aufgrund der begrenzten Größe der Testpopulationen und der daraus resultierenden geringen Aussagekraft wurde auf die Berechnung von MHK_{50} bzw. MHK_{90} verzichtet (SCHWARZ et al., 2010).

Bezugsquellennachweis

Céfinase β -Laktamase-Nachweis, bioMérieux, Frankreich; Columbia-Agar mit Schafblut, Oxoid Deutschland GmbH, Deutschland; MICRONAUT-S Mastitis 3 Testsystem, Merlin Diagnostika, Deutschland; Mueller-Hinton-Bouillon, Bio-Rad Laboratories, Österreich; Natriumchloridlösung 0,9 %, B. Braun Austria GmbH, Österreich

Ergebnisse

Über 90 % ($n \geq 70$) der *Sc. uberis*-Isolate zeigten bei Penicillin G, Ampicillin, Oxacillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom und Kanamycin/Cefalexin auch in den jeweils niedrigsten Testkonzentrationen kein Wachstum (MHK_{90} in Tab. 1). Gegenüber Penicillin G konnte ein getestetes *Sc. uberis*-Isolat als resistent und zwei weitere (2,60 %) als intermediär eingeschätzt werden, sodass sich eine Sensibilitätsrate von 96,1 % ($n=74$) ergab. Für Cefoperazon wurden 2,6 % ($n=2$) und für Kanamycin/Cefalexin 1,3 % ($n=1$) als intermediär kategorisiert, aber keine resistenten Isolate nachgewiesen. Für Cefquinom, Amoxicillin/Clavulansäure und Oxacillin sind keine Grenzwerte publiziert. Keines der *Sc. uberis*-Isolate wuchs bei der niedrigsten Cefquinom-Konzentration von 1 mg/l ($MHK_{90} \leq 1$ mg/l) und nur zwei (2,6 %) bei der geringsten Stufe mit 4/2 mg/l Amoxicillin/Clavulansäure ($MHK_{90} \leq 4/2$ mg/l). Gegenüber Oxacillin zeigten sechs Stämme (7,8 %) Wachstum in zumindest einer der vorhandenen Konzentrationsstufen ($MHK_{90} \leq 1$ mg/l). Da die Testreihen von Ampicillin sowie Cefazolin erst mit 4 mg/l beginnen, ist eine Beurteilung des Resistenzverhaltens anhand der Grenzwerte (sensibel $\leq 0,25$ mg/l bzw. $\leq 0,5$ mg/l) nicht möglich. Bei $\geq 98,7$ % der getesteten Stämme wurde kein Wachstum bei 4 mg/l festgestellt und die MHK_{90} betrug für beide Antibiotika ≤ 4 mg/l. Für die Wirkstoffe Pirlimycin und Erythromycin betrug die MHK für ≥ 90 % der getesteten

Stämme jeweils >4 mg/l, sodass sie außerhalb des Testbereichs der eingesetzten Mikrotiterplatte liegt. Es konnten 26,0 % der Isolate ($n=20$) als resistent gegenüber Pirlimycin und 20,8 % ($n=16$) als resistent gegenüber Erythromycin gewertet werden. Bei diesen resistenten Stämmen lag ein Wachstum bei jeder getesteten Konzentration vor und es wurde eine MHK_{90} von je >4 mg/l berechnet. Die MHK_{90} für Marbofloxacin betrug 2 mg/l. Eine Bewertung war hier aufgrund fehlender Grenzwerte für *Sc. uberis* nicht möglich. Der ATCC-Stamm *Sc. uberis* 700407 entsprach in seinen MHK-Werten den ermittelten MHK_{50} und MHK_{90} der Feldisolate.

Alle untersuchten Enterokokken-Stämme ($n=20$) waren gegenüber Penicillin G, Ampicillin und Amoxicillin/Clavulansäure empfindlich. Gegenüber Erythromycin (MHK_{90} 4 mg/l) wurden aber nur 55,0 % ($n=11$) als sensibel bewertet. Dazu zählten alle fünf *E. saccharolyticus*-, die beiden *E. cecorum*- und drei der sechs *E. faecalis*-Stämme sowie das *E. hirae*-Isolat. Die MHK-Werte der übrigen getesteten Antibiotika (Oxacillin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom, Kanamycin/Cefalexin, Pirlimycin, Marbofloxacin) sind aufgrund fehlender Grenzwerte für *Enterococcus* spp. nicht interpretierbar und die MHK_{90} in Tabelle 2 dargestellt. Bei Oxacillin, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom und Marbofloxacin lag in jeder Testkonzentration für alle fünf *E. faecium*-Isolate bakterielles Wachstum vor. Sie zeigten auch bei Penicillin G, Erythromycin und Kanamycin/Cefalexin höhere MHK-Werte als die übrigen Enterokokkenspezies. Lediglich bei Ampicillin ($MHK_{90} \leq 4$ mg/l) und Amoxicillin/Clavulansäure ($MHK_{90} \leq 4/2$ mg/l) war bei keinem der 20 Teststämme Wachstum zu beobachten.

Ebenfalls kein bakterielles Wachstum bei Ampicillin und Amoxicillin/Clavulansäure zeigten die 14 getesteten Laktokokkenisolate sowie *L. lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 (Tab. 3). Dies war auch bei Cefazolin mit Ausnahme von zwei Isolaten und bei Cefquinom mit Ausnahme eines Isolats der Fall. Während für Penicillin G, Oxacillin, Cefoperazon und Pirlimycin niedrigere MHK-Werte der *L. lactis*-Isolate im Vergleich zu den *L. garviae*-Isolaten ermittelt werden konnten, waren bei Erythromycin, Kanamycin/Cefalexin und Marbofloxacin keine Unterschiede zwischen beiden Spezies zu erkennen.

Alle vier Feldisolate von *A. viridans* zeigten bei Penicillin G, Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefazolin, Cefoperazon, Cefquinom und Kanamycin/Cefalexin wie *A. viridans* ATCC 700406 kein Wachstum in den jeweils geringsten Testkonzentrationen. Die Verteilungen der MHK-Werte für Oxacillin, Pirlimycin, Erythromycin, Marbofloxacin sind in Tabelle 4 angeführt.

Im β -Laktamase-Blättchen-Test waren alle 115 Feldisolate negativ.

Tab. 1: Minimale Hemmkonzentration (MHK) von mastitisassoziierten *Streptococcus uberis*-Isolaten (n=77) aus Österreich / Minimal inhibitory concentrations of mastitis associated *Streptococcus uberis* isolates from Austria

MHK-Werte [mg/l]	Antimikrobieller Wirkstoff										
	Penicillin G	Ampicillin	Oxacillin	Cefazolin	Cefoperazon	Cefquinom	Pirlimycin	Erythromycin	Marbofloxacin	Amoxicillin/ Clavulansäure 2:1	Kanamycin/ Cefalexin 10:1
<0,125	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0,125	74	NA	NA	NA	NA	NA	NA	59	NA	NA	NA
0,25	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1	NA	NA
0,5	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	7	NA	NA
1	0	NA	71	NA	NA	77	55	0	54	NA	NA
2	0	NA	4	NA	75	0	2	0	15	NA	NA
4	1	77	1	76	2	0	0	0	NA	75	76
8	0	0	NA	0	0	0	NA	NA	NA	2	0
16	NA	0	NA	1	0	NA	NA	NA	NA	0	1
32	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	0	0
Wachstum bei allen getesteten Konzentrationen	0	0	1	0	0	0	20	16	0	0	0
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	≤0,125	≤4	≤1	≤4	≤2	≤1	≤1	≤0,125	1	≤4 / 2	≤4/0,4
MHK ₅₀	≤0,125	≤4	≤1	≤4	≤2	≤1	≤1	≤0,125	1	≤4 / 2	≤4/0,4
MHK ₉₀	≤0,125	≤4	≤1	≤4	≤2	≤1	>4	>4	2	≤4 / 2	≤4/0,4
S [%]	96,10	NA	NA	NA	97,40	NA	74,03	77,92	NA	NA	98,70
Grenzwert	S ≤0,12 I 0,25–2 R ≥4 ^a	S ≤0,25 I 0,5–4 R ≥8 ^a		S ≤0,5 R >0,5 ^b	S ≤ 2 I 4 R ≥8 ^c		S ≤2 R ≥4 ^a	S ≤0,25 I 0,5 R ≥1 ^a		S ≤8/0,8 I 16/1,6 R ≥32/3,2 ^d	
Zielpathogen	Humane Viridans-Streptokokken	Humane Viridans-Streptokokken		Humane Viridans-Streptokokken	Mastitis <i>Streptococcus</i> spp.		Mastitis <i>Sc. uberis</i>	Humane Viridans-Streptokokken		Mastitis <i>Streptococcus</i> spp.	

Getestete Konzentrationen grau hinterlegt

^a CLSI VET01S 3. Auflage, 2015

^b EUCAST 7.1, 2017

^c FESSLER et al., 2012

^d PILLAR et al., 2009

S = sensibel

I = intermediär

R = resistent

NA = nicht angewendet – Verdünnungsstufe auf Mikrotiterplatte nicht vorhanden)

Tab. 2: Minimale Hemmkonzentration (MHK) von mastitisassoziierten *Enterococcus* spp.-Isolaten (n=20) aus Österreich / Minimal inhibitory concentrations of mastitis associated *Enterococcus* spp. isolates from Austria

MHK-Werte [mg/l]	Antimikrobieller Wirkstoff										
	Penicillin G	Ampicillin	Oxacillin	Cefazolin	Cefoperazon	Cefquinom	Pirlimycin	Erythromycin	Marbofloxacin	Amoxicillin/ Clavulansäure 2:1	Kanamycin/ Cefalexin 10:1
<0,125	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0,125	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6	NA	NA	NA
0,25	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5	0	NA	NA
0,5	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	2	NA	NA
1	1	NA	4	NA	NA	9	10	2	4	NA	NA
2	7	NA	2	NA	5	1	3	2	5	NA	NA
4	2	20	1	7	3	0	0	4	NA	20	8
8	0	0	NA	1	1	3	NA	NA	NA	0	0
16	NA	0	NA	3	2	NA	NA	NA	NA	0	6
32	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	0	0
Wachstum bei allen getesteten Konzentrationen	0	0	13	7	9	7	7	1	9	0	6
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2	≤4	>4	32	>16	8	>4	4	1	≤4 / 2	>32/3,2
MHK ₅₀	0,5	≤4	>4	16	16	2	1	0,25	2	≤4 / 2	16/1,6
MHK ₉₀	2	≤4	>4	>32	>16	>8	>4	4	>2	≤4 / 2	>32/3,2
S [%]	100,00	100,00	NA	NA	NA	NA	NA	55,00	NA	100,00	NA
Grenzwert	S ≤8 R ≥16 ^a	S ≤8 R ≥16 ^a						S ≤0,5 I 1–4 R ≥8 ^a		S ≤4 R >8 ^b	
Zielpathogen	Humane <i>Enterococcus</i> spp.	Humane <i>Enterococcus</i> spp.						Humane <i>Enterococcus</i> spp.		Humane <i>Enterococcus</i> spp.	

Getestete Konzentrationen grau hinterlegt

CLSI VET01S 3. Auflage, 2015

^b EUCAST 7.1, 2017

^c FESSLER et al., 2012

^d PILLAR et al., 2009

S = sensibel

I = intermediär

R = resistent

NA = nicht angewendet – Verdünnungsstufe auf Mikrotiterplatte nicht vorhanden

Tab. 3: Minimale Hemmkonzentration (MHK) von mastitisassoziierten *Lactococcus lactis*- und *Lactococcus garviae*-Isolaten (n=6/n=8) aus Österreich / Minimal inhibitory concentrations of mastitis associated *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garviae* isolates from Austria

MHK-Werte [mg/l]	Antimikrobieller Wirkstoff											
	Penicillin G	Ampicillin	Oxacillin	Cefazolin	Cefoperazon	Cefquinom	Pirlimycin	Erythromycin	Marbofloxacin	Amoxicillin/Clavulansäure 2:1	Kanamycin/Cefalexin 10:1	
<0,125	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0,125	3 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5 5	NA	NA	NA	NA
0,25	3 0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1 1	0 0	NA	NA	NA
0,5	0 6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0 1	1 2	NA	NA	NA
1	0 1	NA	5 1	NA	NA	6 7	1 1	0 0	3 2	NA	NA	NA
2	0 0	NA	1 0	NA	4 1	0 0	2 0	0 0	1 2	NA	NA	NA
4	0 0	6 8	0 0	5 7	2 5	0 0	2 0	0 0	NA	6 8	2 3	NA
8	0 0	0 0	NA	1 1	0 2	0 0	NA	NA	NA	0 0	4 5	NA
16	NA	0 0	NA	0 0	0 0	NA	NA	NA	NA	0 0	0 0	0 0
32	NA	NA	NA	0 0	NA	NA	NA	NA	NA	0 0	0 0	0 0
Wachstum bei allen getesteten Konzentrationen	0 0	0 0	0 7	0 0	0 0	0 1	1 7	0 1	1 2	0 0	0 0	0 0
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454	0,25	≤4	≤1	≤4	≤2	≤1	2	≤0,125	1	≤4 / 2	16/1,6	

Getestete Konzentrationen grau hinterlegt

MHK-Werte von *Lactococcus lactis* sind vor dem Trennstrich | , die von *Lactococcus garviae* dahinter dargestellt

Aufgrund der geringen Anzahl an Teststämmen entfällt die Berechnung von MHK₅₀ und MHK₉₀

NA = nicht angewendet

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass die antibiotische Empfindlichkeitsprüfung von katalase-negativen äskulinpositiven Kokken Einschränkungen unterliegt: Es stehen nicht nur für therapierrelevante Wirkstoffe der Veterinärmedizin keine Grenzwerte zur Verfügung, sondern auch für einige wichtige Mastitiserreger. Die Empfindlichkeit gegenüber den Substanzen Penicillin G, Ampicillin und Erythromycin sowie Amoxicillin/Clavulansäure (*Enterococcus* spp.) und Cefazolin (*Streptococcus* spp.) ist nur eingeschränkt beurteilbar, da die vorhandenen Grenzwerte für humane Isolate und andere Streptokokken als *Sc. uberis* gültig sind. Im Fall von Ampicillin sowie Cefazolin ermöglicht das hier eingesetzte Plattenlayout lediglich eine Resistenzbeurteilung

aber keine Interpretation bezüglich Sensibilität. Für Cefquinom, Oxacillin und Marbofloxacin liegen weder Grenzwerte für *Sc. uberis*- noch für *Enterococcus* spp. vor. Dies ist jedoch für die Praxis weniger bedeutend, da diese bezüglich der Therapieentscheidung keine Wirkstoffe der ersten Wahl darstellen. Die Beurteilung der Penicilline hingegen ist essentiell, da sie als first-line-Antibiotika für diese Indikation beschrieben werden (HAENNI et al., 2010). Für mastitis-assoziierte *Sc. uberis*-Stämme sind lediglich Daten für Cefoperazon und Kanamycin/Cefalexin (PILLAR et al., 2009; FESSLER et al., 2012) sowie Penicillin-Novobiocin, Ceftiofur sowie Pirlimycin in den aktuellen CLSI-Tabellen publiziert. Die Testung der letztgenannten drei Wirkstoffe ist für praktizierende Tierärzte in Österreich nicht praxisrelevant, da derzeit kein intramammäres Präparat für die Mastitistherapie erhältlich ist. Auch für Enterokokken stehen keine anerkannten

Tab. 4: Minimale Hemmkonzentration (MHK) von mastitisassoziierten *Aerococcus viridans*-Isolaten (n=4) aus Österreich / Minimal inhibitory concentrations of mastitis associated *Aerococcus viridans* isolates from Austria

MHK-Werte [mg/l]	Antimikrobieller Wirkstoff										
	Penicillin G	Ampicillin	Oxacillin	Cefazolin	Cefoperazon	Cefquinom	Pirlimycin	Erythromycin	Marbofloxacin	Amoxicillin/ Clavulansäure 2:1	Kanamycin/ Cefalexin 10:1
<0,125	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0,125	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA
0,25	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	0	NA	NA
0,5	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	NA	NA
1	0	NA	0	NA	NA	4	2	1	1	NA	NA
2	0	NA	2	NA	4	0	2	0	2	NA	NA
4	0	4	2	4	0	0	0	0	NA	4	4
8	0	0	NA	0	0	0	NA	NA	NA	0	0
16	NA	0	NA	0	0	NA	NA	NA	NA	0	0
32	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	0	0
Wachstum bei allen getesteten Konzentrationen	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Aerococcus viridans</i> ATCC 700406	≤0,125	≤4	4	≤4	≥2	≤1	≤1	0,25	2	≤4 / 2	≤4/0,5

Getestete Konzentrationen grau hinterlegt

Aufgrund der geringen Anzahl an Teststämmen entfällt die Berechnung von MHK_{50} und MHK_{90}

NA = nicht angewendet

Breakpoints für Rinder zur Verfügung. Grenzwerte aus der Humanmedizin sollten aufgrund der abweichenden Physiologie zwischen Menschen und Rind nicht kritiklos übernommen werden (SCHWARZ et al., 2003). Auch wenn Grenzwerttabellen und Publikationen für *Enterobacteriaceae* oder *Staphylococcus* spp. bessere Interpretationsmöglichkeiten bieten, widmen sich unter anderem das Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, ein Subkomitee von EUCAST, sowie der Arbeitskreis Antibiotikaresistenz der DVG der Grenzwertproblematik in der Veterinärmedizin (ARBEITSKREIS ANTIBIOTIKARESISTENZ, o. J.; VELDMAN, 2015).

Um auch ohne Grenzwerte die therapeutische Wirksamkeit von β -Laktam-Antibiotika einzuschätzen, kann die Fähigkeit eines Bakteriums, β -Laktam-Antibiotika zu inaktivieren, beurteilt werden. Der Nachweis kann mittels chromogenen Testblättchen zur Detektion der β -Laktamase-Produktion erfolgen (BIOMÉRIEUX,

2015). CLSI (2015) empfiehlt bei allen penicillinresistenten Staphylokokken-Stämmen zusätzlich einen β -Laktamase-Test oder *blaZ*-Gen-Nachweis durchzuführen. In der hier beschriebenen Untersuchung wurde auch bei katalasenegativen Kokken ein β -Laktamase-Blättchen-Test eingesetzt, da in einer Studie in Wisconsin (USA) in *Streptococcus* spp.-Isolaten (u. a. *Sc. uberis*) und in der von den Autoren als „streptococcal-like organisms“ (*Lactococcus lactis*, *Aerococcus viridans*, *Enterococcus* spp.) bezeichneten Gruppe das *blaZ*-Gen detektiert werden konnte (RUEGG et al., 2015). Es ist anzumerken, dass die Eignung der Testblättchen weder für *Enterobacteriaceae* noch Strepto- oder Laktokokken vom Hersteller geprüft wurde. Vor diesem Hintergrund sind die hier beschriebenen negativen Ergebnisse zu hinterfragen. In Folgestudien könnte daher ein zusätzlicher *blaZ*-Gen-Nachweis von Interesse sein (EUCAST, 2017).

In der Praxis dienen die MHK-Bewertungen der DVG-Leitlinien „Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern“ und der Fachabteilung Eutergesundheitsdienst und Milchhygiene des Tiergesundheitsdienstes Bayern als Interpretationshilfe, da sie für die eingesetzte Mastitis-Mikrotiterplatte anwendbare Werte bereitstellen. Diese basieren auf den inzwischen in aktualisierter Version vorliegenden National Committee for Clinical Laboratory Standards M31-A2, heute als CLSI bezeichnet, aus dem Jahr 2002 und auf Herstellerangaben (FEHLINGS et al., 2009; FACHABTEILUNG EUTERGESUNDHEITSDIENST UND MILCHHYGIENE, 2016). Im Gegensatz zu den neuesten EUCAST- und CLSI-Standards ist hier für *Sc. uberis* eine Interpretation der MHK-Werte aller Wirkstoffe möglich. Dies ergibt sich daraus, dass bei der DVG-Grenzwerttabelle die Spezies *Sc. uberis* den Gruppen „*Streptococcus* spp.“ oder „andere Erreger als Staphylokokken“ zugeordnet werden kann. Die Wertungen von Penicillin G, Cefoperazon, Pirlimycin, Erythromycin sowie Kanamycin/Cefalexin unterscheiden sich zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen nicht. Weniger als 3 % der getesteten *Sc. uberis*-Isolate würden mit diesen Grenzwerten als resistent gegenüber den Wirkstoffen Oxacillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefazolin und Cequinom interpretiert und fast alle Isolate (98,7 %) als intermediär gegenüber Marbofloxacin kategorisiert werden. Für Cefazolin, Cefquinom, Oxacillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Marbofloxacin ist aufgrund fehlender anwendbarer EUCAST- oder CLSI-Grenzwerte keine Beurteilung der DVG-Interpretation möglich.

Nach Kenntnisstand der Autoren sind bisher keine MHK-Daten für mastitisassoziierte katalasenegative äskulinpositive Kokken aus Österreich beschrieben, daher ist kein direkter Vergleich mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen möglich. Stellt man die hier dargelegten Resultate denen aus internationalen Angaben (dem europäischen VetPath-Monitoring, dem German National Antibiotic Resistance Monitoring (GERM-Vet) und einer Studie aus Frankreich) gegenüber, sind die MHK_{90} -Werte der untersuchten österreichischen *Sc. uberis*-Isolate für Penicillin G und Oxacillin niedriger, während jene für Cefoperazon, Marbofloxacin und Kanamycin/Cefalexin gleich sind (HAENNI et al., 2010; DE JONG et al., 2015; BVL, 2017): Die MHK_{90} für Penicillin G wurde für Isolate aus neun europäischen Ländern mit 0,25 mg/l ($n=188$) und in Deutschland mit 0,5 mg/l ($n=385$) bestimmt (DE JONG et al., 2015; BVL, 2017). Der MHK_{90} -Wert für Oxacillin lag in Frankreich und Deutschland bei 2 mg/l (HAENNI et al., 2010; BVL, 2017). Gegenüber Cefoperazon konnten in Deutschland wie auch bei uns ≥ 90 % der untersuchten *Sc. uberis* bei 2 mg/l gehemmt werden (BVL, 2017). Für Kanamycin/Cefalexin ist eine MHK_{90} von 4 mg/l publiziert, was ebenfalls unseren

Ergebnissen entspricht (DE JONG et al., 2015). Diese Übereinstimmung traf auch auf die MHK_{90} von 2 mg/l für Marbofloxacin zu (DE JONG et al., 2015; BVL, 2017). Im Gegensatz zu Ergebnissen aus Deutschland (MHK_{90} 2 mg/l) konnten wir für Pirlimycin einen Wert von >4 mg/l, eine Untersuchung in den Niederlanden darüber hinaus einen MHK von 64 mg/l ermitteln (MARAN, 2010; BVL, 2017). Allerdings wurde die geringere Empfindlichkeit der untersuchten *Sc. uberis*-Isolate gegenüber Erythromycin ($MHK_{90} >4$ mg/l) in diesen beiden Ländern nicht beschrieben ($MHK_{90} \leq 0,12$ mg/l). Wenn auch nicht jeder Wirkstoff anhand der ermittelten Werte kategorisiert werden konnte, zeigen die Resultate dennoch niedrige MHK-Werte von *Sc. uberis* in Österreich gegenüber β -Laktam-Antibiotika.

Enterokokken besitzen natürliche Resistenzen gegenüber den Wirkstoffgruppen Cephalosporine, penicillinasefeste Isoxazolylpenicilline (Oxacillin oder Cloxacillin), Lincosamide (wie Pirlimycin) oder Erythromycin. Erworbene Resistenzen werden für Fluorchinolone oder Ampicillin beschrieben (REINERT, 2009; LECLERCQ et al., 2013). Es wurden daher erwartungsgemäß in Deutschland wie auch in Österreich generell hohe MHK-Werte für die getesteten Cephalosporine, Oxacillin, Pirlimycin und Erythromycin dargestellt. Die Sensibilitätsrate der Enterokokken gegenüber Erythromycin lag bei circa 20 % (55 % in Österreich). Wie bereits bei *Sc. uberis* war bei unseren Enterokokken-Teststämmen die MHK_{90} für Penicillin niedriger als die in Deutschland (BVL, 2017) und lag wie auch für Amoxicillin/Clavulansäure und für Ampicillin im als sensibel definierten Konzentrationsbereich. GERM-VET unterscheidet bei Mastitisindikation zwischen *E. faecalis* und *E. faecium* und konnte für einige Wirkstoffe Unterschiede feststellen: Es wurden keine Resistenzen der *E. faecalis*-Isolate ($n=29$) für Penicillin beschrieben und trotz einer Sensibilität von 90 % höhere MHK_{90} -Werte von *E. faecium* ($n=41$) ermittelt. Die Isolate beider Spezies zeigten sich empfindlich für Ampicillin. Die höheren MHK-Werte von *E. faecium* gegenüber Marbofloxacin weisen auf eine verminderte Wirksamkeit hin, welche auch für die Isolate aus Österreich beobachtet werden konnte (BVL, 2017). Für Enterokokken beschreiben LECLERCQ et al. (2013) bei einzelnen Stämmen die Produktion von β -Laktamase. Diese konnten wir bei den von uns getesteten Isolaten nicht nachweisen.

Über die Resistenzprüfung von mastitisassoziierten Laktokokken stehen nur einige wenige Publikationen aus den USA sowie Kanada zur Verfügung (WERNER et al., 2014; PLUMED-FERRER et al., 2015; CAMERON et al., 2016). Ähnlich stellt sich die Datenlage für Aerokokken, die aus Kuhmilch isoliert wurden, dar (KIRK et al., 2005; LIU et al., 2015). Auch wenn einige Autoren *Lactococcus* spp. und *Aerococcus* spp., teilweise auch *Enterococcus* spp., als „streptococcal-like organisms“ oder Umweltstreptokokken bezeichnen, was unter anderem den Schwierigkeiten in

der Identifizierung bzw. Differenzierung durch die BU geschuldet ist, sollten sie getrennt betrachtet werden (WERNER et al., 2014; PLUMED-FERRER et al., 2015; RUEGG et al., 2015). Außerdem ist anzumerken, dass für katalasenegative äskulinpositive Kokken Unterschiede in den Heilungsraten beschrieben worden sind (SWINKELS et al., 2014; SMITH et al., 2016). Für *L. lactis* wurden im Vergleich zu *Sc. uberis* niedrigere bakteriologische Heilungsraten und ein höheres Risiko von rekurrierenden Mastitiden beobachtet (SMITH et al., 2016). In Zusammenhang mit *Sc. uberis*-Mastitiden wird eine verbesserte bakteriologische Heilungsrate durch eine verlängerte Therapiedauer, (extended therapy) dargestellt (KRÖMKER et al., 2014). Unter Berücksichtigung der geringen Anzahl der getesteten Isolate konnten wir Unterschiede im antibiotischen Profil von *Sc. uberis*, Lakto- und Enterokokken beobachten. Die getesteten Laktokokken wiesen höhere MHK₉₀ gegenüber Penicillin G, Oxacillin, Cefoperazon sowie Kanamycin/Cefalexin auf, die Aerokokken niedrigere MHK-Werte gegenüber Pirlimycin und Erythromycin. Die Enterokokken zeigten lediglich gegenüber Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Pirlimycin mit *Sc. uberis* vergleichbare MHK₉₀. Vor dem Hintergrund eines Penicillin-Einsatzes und der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber diesem Wirkstoff ist die Überprüfung der antibiotischen Empfindlichkeit auch nach begonnener Therapie anzuraten.

Grundsätzlich wird der Einsatz kommerzieller Mikrotiterplatten wie „MICRONAUT-S Mastitis 3“ zur MHK-Wertbestimmung in der Routinediagnostik empfohlen. Es ist jedoch beim Einsatz zu beachten, dass eine Beladung nach der sogenannten „Breakpointmethode“, die pro Wirkstoff nur wenige Konzentrationsstufen umfasst und die Einteilung in „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ ermöglicht (SCHWARZ et al., 2003), sich bei *Sc. uberis*, Entero-, Lakto- und Aerokokken aufgrund fehlender Grenzwerte

als nachteilig erweisen kann. Eine Empfehlung zur Aktualisierung des Layouts wurde bereits veröffentlicht (FESSLER et al., 2017). Wie SCHWARZ et al. (2003) beschreiben, ermöglicht ein MHK-Wert unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik eine Einschätzung, ob der Wirkstoff im Zielgewebe eine ausreichende Hemmung oder Elimination des Erregers gewährleisten kann. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass einige publizierte Wirkstoffkonzentrationen, die in der Milchdrüse erreicht werden, am isoliert perfundierten Rindereuter erhoben wurden. Zudem müssen beispielweise auch Applikationsart, Wirkstoffkonzentration und –formulierung sowie Partikelgröße mit dem eingesetzten Präparat übereinstimmen, um eine Aussage über eine mögliche klinische Wirksamkeit treffen zu können. Weiterhin haben laut Herstellerangaben Ödembildung und Exsudation im Euter Einfluss auf die Gewebeverteilung des Arzneimittels und wirksame Wirkstoffkonzentrationen können *in vivo* deutlich höher sein als die *in vitro* ermittelten MHK-Werte (EHINGER u. KIETZMANN, 2001; VANA GmbH, 2016; VETCARE OY; 2017). Therapeutische Wirkstoffkonzentrationen werden auch aufgrund bestimmter Mechanismen des Pathogens, wie der Fähigkeit zur Biofilmbildung bei *Sc. uberis*, nicht erreicht (KRÖMKER et al., 2014). Dennoch ist die Erarbeitung valider Grenzwerte für Wirkstoffe der Veterinärmedizin dringend notwendig, um den sorgfältigen Einsatz von Antibiotika zu gewährleisten und den „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln“ gerecht werden zu können (SCHWARZ et al., 2003, 2014; BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT, 2013).

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der Hochschuljubiläumstiftung der Stadt Wien sowie der Österreichischen Buiatrischen Gesellschaft für die Unterstützung.

Fazit für die Praxis:

Die hier dargestellten Ergebnisse belegen eine günstige Resistenzsituation von *Sc. uberis* in Österreich gegenüber β -Laktam-Antibiotika. Basierend auf diesen Ergebnissen werden Penicilline als Therapeutika der ersten Wahl empfohlen. Zudem wird zu einer bakteriologischen Untersuchung mit antibiotischer Empfindlichkeitsüberprüfung geraten, um im Falle einer Mastitis durch andere grampositive katalasenegative äskulinpositive Kokken den Erfolg der Initialtherapie abzusichern.

Literatur

ARBEITSKREIS ANTIBIOTIKARESISTENZ DER DEUTSCHEN VETERINÄRMEDIZINISCHEN GESELLSCHAFT (o. J.): Erarbeitung neuer Methoden für die Empfindlichkeitsbestimmung; <http://antibiotikaresistenz.dvg.net/index.php?id=1908>; letzter Zugriff: 13.11.2017.

BIOMÉRIEUX (2015): Testerkklärung Cefinase (CEF-F). Schnellnachweis von β -Laktamasen.

BRITTEN, A.M. (2012): The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **28**, 187–202.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - BVL (2017): Berichte zu den Resistenzmonitoringstudien 2014 und

- 2015 - Resistenzsituation bei klinisch wichtigen tierpathogenen Bakterien. Report 11.5, Berlin.
- CAMERON, M., SAAB, M., HEIDER, L., MCCLURE, J.T., RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C., SANCHEZ, J. (2016): Antimicrobial susceptibility patterns of environmental streptococci recovered from bovine milk samples in the maritime provinces of Canada. *Front Vet Sci* **3**. doi:10.3389/fvets.2016.00079.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2015): VET01S - Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals - 3rd Edition. Wayne, USA, 44-53.
- HINGER, A.M., KIETZMANN, M. (2001): The tissue distribution of antibiotics in the udder - Comparison of the situation *in vivo* with the isolated perfused bovine udder. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **108**, 195–200.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST (2017): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1. 42–47.
- FACHABTEILUNG EUTERGESUNDHEITSDIENST UND MILCHHYGIENE (2016): Übersicht Breakpoints bei Resistenzbestimmung mittels Bestimmung der Minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK). Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.
- FEHLINGS, K., ZSCHÖCK, M., BAUMGÄRTNER, B., GERINGER, M., HAMANN, J., KNAPPSTEIN, K. (2009): DVG-Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern. 3. Aufl., Gießen, 64.
- FESSLER, A.T., BÖTTNER, A., FEHR, M., KASPAR, H., KEHRENBURG, C., KIETZMANN, M., KLARMANN, D., KLEIN, G., PETERS, T., RICHTER, A., SCHWARZ, C., SIGGE, C., STEPHAN, B., WALDMANN, K.-H., VERSPOHL, J., WALLMANN, J., WERCKENTHIN, C., SCHWARZ, S. (2017): Mikrotiterplattenlayouts für Kleintiere, Großtiere und Mastitis. *deutsches Tierärzteblatt* **65**, 472–481.
- FESSLER, A.T., KASPAR, H., LINDEMAN, C.J., STEGEMANN, M.R., PETERS, T., MANKERTZ, J., WATTS, J.L., SCHWARZ, S. (2012): A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. *Vet Microbiol* **157**, 226–231.
- FIRTH, C.L., SCHLEICHER, C., KÄSBOHRER, A., OBRITZHAUSER, W. (2017): Advancement of Dairying in Austria (ADDA): Antimicrobial dry cow therapy on conventional dairy farms – farmers' management decisions. American Dairy Science Association (ADSA) Annual Meeting. *J Dairy Sci* **100** Suppl. 2, 237–238.
- HAENNI, M., SARAS, E., MADEC, J.Y. (2010): Demonstration of a shift towards penicillin resistance in the *Streptococcus uberis* population. *J Med Microbiol* **59**, 993–995. doi:10.1099/jmm.0.018978-0.
- HILLERTON, J.E., KLIEM, K.E. (2002): Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *J Dairy Sci* **85**, 1009–1014.
- HOGVEEN, H., HUIJPS, K., LAM, T.J. (2011): Economic aspects of mastitis: New developments. *N Z Vet J* **59**, 16–23.
- JONG, A. DE, MOYAERT, H., SIMJEE, S., GARCH, F. EL, HAAGDIERGARTEN, S., KLEIN, U., LUDWIG, C., BUTTY, P., RICHARDMAZET, A., RIGAUT, D., THIRY, J., THOMAS, V. (2015): Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens isolated from diseased dairy cows across Europe: VetPath monitoring results. Proceedings Annual ECCMID meeting. Kopenhagen, Dänemark.
- KIRK, J.H., MCCOWAN, B., ATWILL, E.R., GLENN, K.S., HIGGINBOTHAM, G.E., COLLAR, C.A., CASTILLO, A., REED, B.A., PETERSON, N.G., CULLOR, J.S. (2005): Association of minimum inhibitory concentration cluster patterns with dairy management practices for environmental bacteria isolated from bulk tank milk. *J Dairy Sci* **88**, 3710–3720.
- KRÖMKER, V., LEIMBACH, S. (2017): Mastitis treatment - Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod Domest Anim* **52** Suppl. 3, 21–29.
- KRÖMKER, V., REINECKE, F., PADUCH, J.-H., GRABOWSKI, N. (2014): Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis. *Clin Microbiol* **3:157**.
- LECLERCQ, R., CANTÓN, R., BROWN, D.F., GISKE, C.G., HEISIG, P., MACGOWAN, A.P., MOUTON, J.W., NORDMANN, P., RODLOFF, A.C., ROSSOLINI, G.M., SOUSSY, C.J., STEINBAKK, M., WINSTANLEY, T.G., KAHLMEYER, G. (2013): EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* **19**, 141–160.
- LIU, G., LIU, Y., ALI, T., FERRERI, M., GAO, J., CHEN, W., YIN, J., SU, J., FANNING, S., HAN, B. (2015): Molecular and phenotypic characterization of *Aerococcus viridans* associated with subclinical bovine mastitis. *PLoS ONE* **10**, e0125001.
- MANSION-DE VRIES, E.M., HOEDEMAEKER, M., KRÖMKER, V. (2015): Aspekte einer evidenzbasierten Therapie klinischer Mastitiden. *Tieraerztl Prax G N* **43**, 287–295.
- MARAN (2010): Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in Animals in the Netherlands in 2008.
- PILLAR, C.M., GOBY, L., DRAGHI, D., GROVER, P., THORNSBERRY, C. (2009): Evaluating the *in vitro* susceptibility of bovine mastitis pathogens to a combination of kanamycin and cefalexin: Recommendations for a disk diffusion test. *J Dairy Sci* **92**, 6217–6227.
- PLUMED-FERRER, C., BARBERIO, A., FRANKLIN-GUILD, R., WERNER, B., MCDONOUGH, P., BENNETT, J., GIOIA, G., ROTA, N., WELCOME, F., NYDAM, D.V., MORONI, P. (2015): Antimicrobial susceptibilities and random amplified polymorphic DNA-PCR fingerprint characterization of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus garvieae* isolated from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci* **98**, 6216–6225.
- REINERT, R.R. (2009): Streptococcaceae. In: NEUMEISTER, B., GEISS, H.K., BRAUN, R., KIMMIG, P. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, 329.
- RUEGG, P.L., OLIVEIRA, L., JIN, W., OKWUMABUA, O. (2015): Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *J Dairy Sci* **98**, 4521–4534.
- SCHUKKEN, Y., CHARTER, M.E., MOSLOCK-CARTER, B., BELOMESTNYKH, N., ZADOKS, R. (2009): Strep species: to differentiate or not to differentiate? *Eastern Dairy Business* **5**, 18–19.
- SCHWARZ, S., BÖTTNER, A., HAFEZ, M., KEHRENBURG, C., KIETZMANN, M., KLARMANN, D., KLEIN, G., KRABISCH, P., KÜHN, T., LUHOFER, G., RICHTER, A., TRAEGER, W., WALDMANN, K.-H., WALLMANN, J., WERCKENTHIN, C. (2003): Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die

- Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. *Berl Munch Tierarztl* **116**, 353–361.
- SCHWARZ, S., FESSLER, A.T., KASPAR, H., WERCKENTHIN, C., WALLMANN, J. (2014): Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien im diagnostischen Labor. In: *Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in der Veterinärmedizin. Der praktische Tierarzt* **95** Suppl. 5, 18–22.
- SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S., WOODFORD, N., VAN DUIJKEREN, E., JOHNSON, A.P., GAASTRA, W. (2010): Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* **65**, 601–604.
- SMITH, J.S., MORONI, P., NYDAM, D. (2016): Lactococcus: an emerging mastitis pathogen. *Dairy Business & Holstein World* **10**, 36–38.
- SWINKELS, J.M., KRÖMKER, V., LAM, T.J. (2014): Efficacy of standard vs. extended intramammary cefquinome treatment of clinical mastitis in cows with persistent high somatic cell counts. *J Dairy Res* **81**, 424–433.
- VANA GmbH (2016): Fachinformation Vanaproc 333 mg/g - Suspension zur intramammären Anwendung für Rinder.
- VELDMAN, K. (2015): Available breakpoints of antimicrobials for veterinary use. VetCAST meeting, 27 April 2015, Kopenhagen, Dänemark.
- VETCARE OY (2017): Fachinformation Ubropen 600 mg Suspension zur intramammären Anwendung bei laktierenden Kühen.
- WALD, R., BAUMGARTNER, M., URBANTKE, V., STESSL, B., WITTEK, T. (2017): Diagnostic accuracy of a standardized scheme for identification of *Streptococcus uberis* in quarter milk samples: A comparison between conventional bacteriological examination, modified Rambach agar medium culturing, and 16S rRNA gene sequencing. *J Dairy Sci* **100**, 1459–1466.
- WERNER, B., MORONI, P., GIOIA, G., LAVÍN-ALCONERO, L., YOUSAF, A., CHARTER, M.E., CARTER, B.M., BENNETT, J., NYDAM, D. V, WELCOME, F., SCHUKKEN, Y.H. (2014): Genotypic and phenotypic identification of environmental streptococci and association of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* with intramammary infections among different dairy farms. *J Dairy Sci* **97**, 6964–6969.
- WYDER, A.B., BOSS, R., NASKOVA, J., KAUFMANN, T., STEINER, A., GRABER, H.U. (2011): *Streptococcus* spp. and related bacteria: Their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis - A molecular approach. *Res Vet Sci* **91**, 349–357.
- ZUCHTDATA (2016): Jahresbericht 2016. ZuchtData EDV-Dienstleistungen GmbH, Wien, 25-26.

Rechtsnormen

- BUNDESMINISTERIUM FÜR GESUNDHEIT (2013): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln. BMG-74330/0007-II/B/12/2013.