



Abschlussbericht

**Förderinitiative Nachhaltige Pharmazie 2: Entwicklung eines innovativen
Therapeutikums auf Basis von lebenden Mikroorganismen zur lokalen
Anwendung bei Infektionen der bovinen Milchdrüse**

Aktenzeichen der Umweltstiftung 31833-32

Hochschule Hannover
Fakultät II, Abteilung Bioverfahrenstechnik
Prof. Dr. Volker Krömker, Dr. Jan-Hendrik Paduch
Heisterbergallee 12
30453 Hannover

Projektbeginn: 01.11.2014
Laufzeit: 41 Monate
Berichtszeitraum: 01.11.2014-31.03.2018

Hannover, 19.06.2018

1. Projektkennblatt

06/02		Projektkennblatt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt			
Az	31833/01-32	Referat	31/32	Fördersumme	280.395 €
Antragstitel		Förderinitiative Nachhaltige Pharmazie 2: Entwicklung eines innovativen Therapeutikums auf Basis von lebenden Mikroorganismen zur lokalen Anwendung bei Infektionen der bovinen Milchdrüse			
Stichworte					
Laufzeit		Projektbeginn		Projektende	
41 Monate		01.11.2014		31.03.2018	
Abschlussbericht					
Bewilligungsempfänger		Hochschule Hannover Fakultät II, Abteilung Bioverfahrenstechnik Heisterbergallee 12 30453 Hannover		Tel 0511-9296-2205 Fax 0511-9296-2210 Projektleitung Prof. Dr. med. vet. habil. Volker Krömker Bearbeiter	
Kooperationspartner		Dr. Windmann Pharma GmbH, 26810 Ihrhove Freie Universität Berlin, Tierklinik für Fortpflanzung, 14163 Berlin			
<p>Zielsetzung und Anlass des Vorhabens</p> <p>Bovine Mastitiden stellen eine der bedeutendsten Erkrankungen in der modernen Milcherzeugung dar. Das derzeitige Mittel der Wahl zur Therapie stellt die Gabe von Antibiotika dar; wirksame Alternativen fehlen bislang. In dem beantragten Vorhaben soll erstmalig ein Präparat zur Therapie von Mastitiden entwickelt werden, in das lebende Milchsäurebakterien als wirksame Komponente eingebunden werden sollen. Diese Mikroorganismen sollen auf den Zitzen- bzw. Euterepithelien gezielt angesiedelt werden, um so euterpathogene Mikroorganismen, die die bovine Milchdrüse infiziert haben, zu verdrängen. Die umweltrelevanten Ziele des Projekts sind: 1. Reduzierung des Eintrags von Antibiotika aus der Milcherzeugung in die Umwelt, 2. Vermeidung des Auftretens von Antibiotika-Rückständen im Lebensmittel Milch.</p>					
<p>Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden</p> <p>Das Projekt bestand aus zwei Phasen. In der ersten Projektphase wurden zunächst über bereits isolierte und geprüfte Milchsäurebakterien hinaus weitere Stämme dieser Mikroorganismen aus dem Umfeld der Milcherzeugung isoliert, die <i>in vitro</i> hemmend auf euterpathogene Mikroorganismen wirken. Daran anschließend wurden geeignete Isolate in verschiedene Matrices eingebunden werden, die eine Anwendung bei laktierenden Milchrindern zur Therapie bestehender Infektionen der Milchdrüse erlauben. In der zweiten Projektphase fanden Erkenntnisse aus der ersten Projektphase in <i>in vivo</i> Versuchen Umsetzung. Im ersten Teil dieser Projektphase wurde eine Verträglichkeits- und Etablierungsstudie durchgeführt werden, in der neben der Verträglichkeit der entwickelten Prototypen die Etablierung der ausgewählten, sich als geeignet erwiesenen Stämme auf den Zitzen- und Euterepithelien untersucht wurden. Abschließend wurde eine kontrollierte randomisierte klinische Feldstudie mit dem Stamm 118/37 durchgeführt, der die Ermittlung der Effekte der Applikation des neu entwickelten Präparates im Vergleich zu einer evidenzbasierten Mastitistherapie erlaubte.</p>					
Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • http://www.dbu.de					

Ergebnisse und Diskussion

In der ersten Projektphase wurden dazu insgesamt 416 Milchsäurebakterien-Stämme aus 1.532 Proben (Viertelgemelksproben, Tankmilch, Gras, Gülle, Einstreumaterial) isoliert. 367 Isolate, zwei Referenzstämme und sechs Kombinationen wurden *in vitro* mit dem Well-Diffusionstest, bei dem fünf Lösungen (zellhaltige Bouillon, zellfreie, pH-eingestellte Lösung, mit Pepsin, Trypsin oder Katalase behandelte Lösungen) eingesetzt wurden, auf ihre Hemmwirkung gegenüber den euterpathogenen Mikroorganismen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *Sc. uberis*, *Sc. agalactiae* und *E. coli* gescreent. Eine Hemmung von *Sc. uberis* konnte durch 175 Stämme bzw. deren Kombinationen erzielt werden. Einzig die Kombination aus den beiden Isolaten 78/37 und 118/37 und den beiden Referenzstämmen *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11545 und *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 hemmte alle Testmikroorganismen. Die erzielten Ergebnisse der Untersuchungen der Wachstumsaktivitäten in Milch weisen darüber hinaus darauf hin, dass diese Isolate an Milch als Substrat angepasst sind. Aufgrund des Fehlens von Resistenzgenen wurde anschließend mit dem Isolat 118/37 weiterverfahren.

Um die Milchsäurebakterien vor der Applikation lagern zu können, wurden diese in einer Laktose-haltigen Lösung gefriergetrocknet. Für die Applikation wurden die Bakterien dann in wässriger Lösung resuspendiert. Unverträglichkeiten konnten keine festgestellt werden.

Die Gruppe der mit Milchsäurebakterien behandelten Mastitisfälle unterschied sich nicht signifikant hinsichtlich Heilung und Neuinfektionen von der Gruppe der evidenzbasiert behandelten Fälle.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse des Projektes wurden veröffentlicht in:

Diepers, A.C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J.H. 2016. Milchsäurebakterien – Untersuchung hemmender Eigenschaften gegenüber euterpathogenen Mikroorganismen in-vitro. Vortrag, Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover, Hannover, 01.04.2016.

Diepers, A.C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J.H. 2017. In vitro ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. Sustainable Chemistry and Pharmacy 5: 84-92.

Wallis, J. 2018. *In vitro* Biofilmbildung von Milchsäurebakterien mit probiotischem Potential. Vortrag, Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover, Hannover, 17.03.2017.

Diepers, A.C., Paduch, J.H., Krömker, V. 2017. Milchsäurebakterien – Entwicklung eines innovativen Therapeutikums zur lokalen Mastitistherapie. Vortrag, 42. Leipziger Fortbildungsveranstaltung „Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung“, Leipzig, 16.06.2017.

Diepers, A.C. 2017. Isolierung von Milchsäurebakterien mit hemmender Wirkung gegenüber Euterpathogenen und orientierende Untersuchungen zur intramammären Anwendung an der bovinen Milchdrüse. Dissertation, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Wallis, J. 2018. Adhäsionsfähigkeit biofilmbildender Milchsäurebakterien an das Drüsenepithel des bovinen Euters. Vortrag, Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover, Hannover, 02.03.2018.

Wallis, J. 2018. Adhäsionsfähigkeit biofilmbildender Milchsäurebakterien an das Drüsenepithel des bovinen Euters. Vortrag, DVG-Kongress, Berlin, 23.03.2018.

Wallis, J., Krömker, V., Paduch, J.H. 2018. Biofilm formation and adhesion to bovine udder epithelium of potentially probiotic lactic acid bacteria. AIMS Microbiology 4: 209-224.

Weitere Veröffentlichungen sind in Vorbereitung.

Fazit

In dem Projekt wurden Milchsäurebakterien isoliert, die *in vitro* hemmend auf euterpathogene Mikroorganismen wirken. In der zweiten Projektphase wurde eine Matrix zur Einbindung der Bakterien entwickelt und der Feldversuch zur Wirksamkeit durchgeführt. Im Vergleich zu einer evidenzbasierten Mastitistherapie wurden für die Therapie mit Milchsäurebakterien keine Unterschiede in der Wirksamkeit ermittelt, so dass eine derartige Therapie ein neues innovatives und nachhaltiges Instrument zur Behandlung von Mastitiden darstellen kann.

2. Inhaltsverzeichnis

1. Projektkennblatt	2
2. Inhaltsverzeichnis	4
3. Abbildungsverzeichnis	5
4. Tabellenverzeichnis	6
5. Kurzfassung des Berichts	7
6. Bericht.....	8
6.1 Anlass und Zielsetzung des Projekts	8
6.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden	9
6.3 Ergebnisse	13
6.3.1 Darstellung der tatsächlich erzielten Ergebnisse	13
6.4 Diskussion	17
6.4.1 Inwieweit wurden die verfolgten Ziele erreicht?	17
6.4.2 Woraus ergeben sich die Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse?	18
6.4.3 Wie gestaltete sich die Arbeit mit den unterschiedlichen Kooperationspartnern?	18
6.5 Öffentlichkeitsarbeit.....	18
6.5.1 Wie werden die Ergebnisse veröffentlicht?	18
6.5.2 Wer partizipiert an den Ergebnissen?.....	19
6.5.3 Wird das Vorhaben über die Projektlaufzeit weitergeführt?	19
6.6 Fazit	19
6.6.1 Hat sich die Vorgehensweise bewährt?	19
6.6.2 Werden Änderungen der Zielsetzung notwendig?	20
7. Literaturangaben.....	20

3. Abbildungsverzeichnis

Keine Abbildungen vorhanden

4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachweis von Mastitiserregern in Viertelanfangsgemelksproben von an Mastitiden erkrankten Eutervierteln (Versuchsgruppe: mit Milchsäurebakterien behandelt).....	16
---	----

5. Kurzfassung des Berichts

Bovine Mastitiden, also Entzündungen der Milchdrüse des Rindes, stellen in der modernen Milcherzeugung eine der bedeutendsten Erkrankungen dar, die den größten Anteil eingesetzter Antibiotika beim Milchrind verantworten. Verursacht werden Mastitiden vor allem durch Koagulase-negative Staphylokokken, *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, *Streptococcus* (*Sc.*) *uberis*, *Escherichia* (*E.*) *coli* und *Klebsiella* spp. Derzeit werden Mastitiden vor allem antibiotisch behandelt.

Um den Eintrag von Antibiotika in die Umwelt sowie die Milchmenge, die aufgrund von Hemmstoffen nicht in die Lieferkette gelangen darf, zu verringern und einer potenziellen Entstehung von Antibiotikaresistenzen entgegenzuwirken, war es das Ziel des vorliegenden Projektes, ein alternatives Mastitistherapeutikum mit lebenden Milchsäurebakterien als wirksamer Komponente zu entwickeln.

Insgesamt wurden 416 Milchsäurebakterien-Stämme aus 1.532 Proben (Viertelgemelksproben, Tankmilch, Gras, Gülle, Einstreumaterial) isoliert. 367 Isolate, zwei Referenzstämme und sechs Kombinationen wurden *in vitro* mit dem Well-Diffusionstest, bei dem fünf Lösungen (zellhaltige Bouillon, zellfreie, pH-eingestellte Lösung, mit Pepsin, Trypsin oder Katalase behandelte Lösungen) eingesetzt wurden, auf ihre Hemmwirkung gegenüber den euterpathogenen Mikroorganismen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *Sc. uberis*, *Sc. agalactiae* und *E. coli* gescreent. Eine Hemmung von *Sc. uberis* konnte durch 175 Stämme bzw. deren Kombinationen erzielt werden. Einzig die Kombination aus den beiden Isolaten 78/37 und 118/37 und den beiden Referenzstämmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11545 und *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 hemmte alle Testmikroorganismen. Die erzielten Ergebnisse der Untersuchungen der Wachstumsaktivitäten in Milch weisen darüber hinaus darauf hin, dass diese Isolate an Milch als Substrat angepasst sind. Das Isolat 118/37 hemmte die Endometritis-Erreger *E. coli* und *Sc. uberis*; *Trueperella pyogenes* wurde *in vitro* dagegen nicht gehemmt.

Um eine möglichst hohe Lagerstabilität der zu applizierenden Milchsäurebakterien zu erzielen, werden diese gefriergetrocknet und direkt vor der Applikation in einer Ringer-Lösung resuspendiert, um dann durch den Zitzenkanal in ein Euterviertel eingebracht zu werden. Klinische Unverträglichkeiten konnten nicht festgestellt werden. Zur ersten Überprüfung der Wirksamkeit wurden abschließend in einer randomisierten positiv kontrollierten Feldstudie 100 klinische Mastitiden entweder mit Milchsäurebakterien

oder konventionell evidenzbasiert behandelt. Die Gruppe der mit Milchsäurebakterien behandelten Mastitisfälle war in Bezug auf übliche Confounder (Laktationsnummer, Tage in Milch, verursachende Mastitiserreger) von der konventionell behandelten Gruppe nicht signifikant unterschiedlich. Auch in den Zielvariablen „bakteriologische Heilung“ und „Neuinfektion“ konnten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

6. Bericht

6.1 Anlass und Zielsetzung des Projekts

Die entzündliche Reaktion der bovinen Milchdrüse zählt zu den bedeutendsten Erkrankungen hochleistender Milchkühe in Deutschland. Verursacht werden diese sogenannten Mastitiden vor allem durch pathogene Mikroorganismen, die zumeist von außen durch den Zitzenkanal in das Euter eindringen (IDF 1987). Aufgrund der Milchleistungseinbußen, der erhöhten Remontierungsraten und der Therapiekosten wird der bundesweite jährliche ökonomische Verlust auf 1,4 Milliarden € geschätzt (DVG 2012).

Wichtige Mastitiserreger sind neben Koagulase-negativen Staphylokokken und *Staphylococcus (S.) aureus*, *Streptococcus (Sc.) uberis*, *Escherichia (E.) coli* und *Klebsiella* spp. (Krömker 2007, Tenhagen 2009). In den letzten Jahren konnte aufgrund der Etablierung neuer Managementkonzepte eine Verringerung der Infektionen mit vor allem kuhassoziierten Erregern (*Sc. agalactiae*, *S. aureus*), die sehr gut an die Milchdrüse angepasst sind, und eine Zunahme der Infektionen mit umweltassoziierten Erregern (*Sc. uberis*, coliforme Bakterien), die vor allem in der Umgebung der Tiere vorkommen, beobachtet werden.

Im Mittel erkrankt jede zweite Kuh pro Jahr an einer klinischen Mastitis (Krömker 2007). Viele klinische Mastitiden werden aufgrund von schnellem Handlungsbedarf derzeit vorwiegend antibiotisch behandelt. Schaeren (2006) ermittelte für die Milcherzeugung 83 Antibiotikabehandlungen pro 100 Tiere und Jahr. Es wird davon ausgegangen, dass die Anwendung von Antibiotika in der Tierhaltung die Resistenzentstehung begünstigen kann (Diez-Gonzalez 2007), zum anderen können durch die direkte Ausscheidung durch die behandelten Tiere oder die Ausbringung von Gülle und Mist Antibiotika in die Umwelt gelangen (Küster et al. 2013).

Im Rahmen dieses Vorhabens soll ein alternatives Therapeutikum entwickelt werden, welches lebende Mikroorganismen als aktive Komponente enthält. Hierfür sollen Milchsäurebakterien, die auch natürlicherweise im Umfeld der Milcherzeugung vorkommen, in ein Präparat eingebunden werden, um so den Einsatz von Antibiotika

in der Milcherzeugung zu reduzieren. Im Fokus des Vorhabens stehen dabei zwei wesentliche Ziele der Umweltentlastung:

1. Durch den verminderten Einsatz von Antibiotika in der Milcherzeugung soll deren Eintrag in die Umwelt (Boden, Oberflächenwasser, Grundwasser) reduziert werden. Derzeit ist davon auszugehen, dass die Verminderung des Antibiotikaeinsatzes a) mit einer positiven Entwicklung der Bodenmikroflora vor allem landwirtschaftlicher Nutzflächen, auf denen Gülle als Dünger ausgebracht wird, und b) mit einer Reduzierung der Entstehung von Metaboliten, die möglicherweise auch in das Grundwasser übergehen können und deren Wirkungen derzeit nur unzureichend bekannt sind, einhergeht.
2. Die Menge der Milch, die aufgrund von Hemmstoffen und den daraus folgenden Wartezeiten nicht in die Lieferkette gelangen darf, soll vermindert werden.

Zusätzlich kann der Entstehung von Antibiotikaresistenzen vor allem euterpathogener Mikroorganismen und Zoonose-Erreger entgegengewirkt werden.

6.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Screening und Charakterisierung der Stämme

Die wesentlichen Arbeitsschritte und Ergebnisse des Screenings geeigneter Milchsäurebakterien-Isolate sowie deren weiterer Charakterisierung wurden publiziert in u.a. (vollständige Liste der Publikationen unter Gliederungspunkt 6.5.1):

Diepers, A.C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J.H. 2017. *In vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 5: 84-92.

Diepers, A.C. 2017. Isolierung von Milchsäurebakterien mit hemmender Wirkung gegenüber Euterpathogenen und orientierende Untersuchungen zur intramammären Anwendung an der bovinen Milchdrüse. Dissertation, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Wallis, J., Krömker, V., Paduch, J.H. 2018. Biofilm formation and adhesion to bovine udder epithelium of potentially probiotic lactic acid bacteria. *AIMS Microbiology* 4: 209-224.

Diepers et al. (2017) untersuchten die Hemmung der pathogenen Mikroorganismen *Escherichia (E.) coli* DSM 4230, *S. aureus* ATCC12600, *Sc. agalactiae* ATCC27956, *Sc. uberis* ATCC 700407, *S. epidermidis* 575/07 und *S. xylosus* 35/07 durch aus verschiedenen Probenmaterialien isolierte Milchsäurebakterien mit dem Well-Diffusionstest. Isolate, die eine Hemmwirkung aufwiesen, wurden auf Basis ihrer

biochemischen Eigenschaften und molekularbiologisch identifiziert. Daneben untersuchten die Autoren die Anlagerung ausgewählter Isolate an Zellen der Zitzenkanalepithels, die Bildung von Hämolysinen, das Vorhandensein von Resistenzgenen und das Wachstum in Milch. Ergänzend dazu untersuchten Wallis et al. (2018) die Fähigkeiten 13 hemmend wirkender Stämme, *in vitro* Biofilme zu bilden sowie sich an Zellen des Euterepithels anzulagern.

Die *in vitro*-Hemmung der Endometritis-Erreger *E. coli*, *Sc. uberis* und *Trueperella pyogenes* durch das Isolate 118/37 wurde vor dem Hintergrund einer geplanten Endometritis-Therapie mit Milchsäurebakterien in Anlehnung an Diepers et al. (2016) untersucht.

Zusätzlich wurden die „Haltbarmachung“ des Stammes 118/37 durch Gefriertrocknung und die Einbindung in eine geeignete Matrix untersucht.

Untersuchung von Verträglichkeit und Etablierung sowie Dosisfindung

Im Rahmen eines ersten Feldversuches wurde die Verträglichkeit der Applikation bei Milchkuhen untersucht (Diepers 2017). Für die orientierenden Untersuchungen zur Gewebereaktion und Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden nach intramammärer Applikation der Milchsäurebakterien wurden drei ältere, klinisch gesunde Kühe (> 7. Laktation) gewählt. Ausschlusskriterien waren eine klinische Mastitis, andere sichtbare Erkrankungen mit Veränderung des Allgemeinzustandes, Zitzenverletzungen, systemische oder intramammäre Behandlungen mit einem antimikrobiellen Präparat in den letzten 30 Tagen oder eine Milchleistung von weniger als 5 kg am Tag. Für den Dosisfindungsversuch wurden drei klinisch eutergesunde Tiere (keine Entzündungszeichen des Eutergewebes oder sichtbare Veränderungen im Milchsekret) bei gleichen Ausschlusskriterien ausgewählt. Die Durchführung dieses Versuchs wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter dem Aktenzeichen 33.12-42502-04-15/1909 genehmigt. Dazu wurden für die Untersuchung der Gewebereaktion jeweils 10 ml einer Suspension mit 5×10^4 und 6×10^6 koloniebildende Einheiten (KbE)/ml des Stammes 118/37 und für die Dosisfindung 1×10^6 KbE/ml, 2×10^6 KbE/ml, 3×10^6 KbE/ml in Euterviertel eingebracht. Zur erstmaligen Prüfung der Gewebeverträglichkeit und Einstufung der zellulären und klinischen Reaktion des Euters nach Applikation von Milchsäurebakterien wurden bei drei Kühen zwei unterschiedliche, niedrige Bakterienkonzentrationen angewendet. In drei Euterviertel jeder Kuh wurden einmalig entweder 10 ml einer Bakteriensuspension mit 10^4 KbE/ml, 10^6 KbE/ml *Lb. plantarum*

118/37 oder nur das verwendete Lösungsmittel nach der Melkung appliziert. Das verbleibende Viertel wurde als Kontrollviertel nicht behandelt. Für den Dosisfindungsversuch wurden drei Euterviertel jeder Kuh mit einer Bakteriensuspension mit 1×10^6 KbE/ml, 2×10^6 KbE/ml und 3×10^6 KbE/ml *Lb. plantarum* 118/37 behandelt. Das verbleibende Viertel wurde als Kontrollviertel nicht behandelt. Nach klinischer Untersuchung des Euters und Beurteilung des Sekretes wurden unter aseptischen Bedingungen Viertelanfangsgemelksproben gezogen und die jeweiligen Behandlungen den Eutervierteln randomisiert zugeteilt. Die gefriergetrockneten Milchsäurebakterien wurden zur Applikation zunächst resuspendiert. Nach Desinfektion der Zitzenkuppe mit 70%igem Alkohol wurden die Applikationsdosen mittels einer Spritze mit aufgesetzter Zitzenkanüle (17 mm) durch den Zitzenkanal direkt in die Zitzenzisterne verbracht. Im Anschluss wurden bei jeder Melkung eine klinische Untersuchung des Allgemeinbefindens und des Euters und eine Beurteilung des Milchsekretes durchgeführt. Das Euter wurde im Hinblick auf Verhärtungen, Schwellungen, Schmerzhaftigkeit und Wärme palpiert und das Sekret visuell auf Flocken und Farb- und Konsistenzveränderungen untersucht. Zusätzlich wurden Viertelanfangsgemelksproben gezogen. Die Milchproben wurden in Anlehnung an die DVG-Leitlinien (DVG 2009) zytomikrobiologisch untersucht. Dabei wurden die Erreger isoliert und identifiziert und deren Ausscheidungsmenge semiquantitativ bestimmt. Der Gehalt somatischer Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer Somascope Smart (Delta Instruments B.V. Drachten, Niederlande) bestimmt. Die Auszählung und Differenzierung der Leukozyten (Lymphozyten, Makrophagen und PMN) und Epithelzellen wurde mittels des mikroskopischen Referenzverfahrens nach ISO 13366-1:2008 durchgeführt. Um einen möglichen Nachweis von *Lb. plantarum* 118/37 in der Milch zu ermöglichen, wurden parallel zweimal 0,1 ml der Milchprobe zunächst auf MRS-Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland) ausgestrichen und bei 37°C für 48 h bebrütet. Vier Kolonien, die phänotypisch dem Wachstum von *Lb. plantarum* 118/37 glichen, wurden pro Ausstrich entnommen und auf Äskulin-Blutagar überführt (37°C, 48 h). Mit der RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)-Methode wurden die Bandenmuster der replizierten Fragmente dieser Isolate mit denen von *Lb. plantarum* 118/37 verglichen (Gillespie et al. 1997). Eine Übereinstimmung wurde als Nachweis angesehen. Hierfür wurde die DNA der gewonnenen Isolate mit einem einzelnen Primer amplifiziert und das entstehende Muster der DNA-Fragmente mit dem von *Lb. plantarum* 118/37

verglichen. Die DNA-Extraktion wurde mittels kommerziellen Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kits nach Herstellervorgaben durchgeführt. Das Reaktionsvolumen (25 µl) für jeden PCR-Ansatz enthielt 12,5 µl Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), 5 µl DNA-Extrakt und 1 µl (100 pmol/µl) Primer OPE-04 (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) aufgefüllt mit Wasser (Water Molecular biology degrade BC; AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Die Amplifikationen wurden in einem Stratagene Mx 3005P Thermocycler durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 120 s wurde der Thermocycler auf 95°C für 70 s, 33°C für 60 s und 72°C für 60 s eingestellt. Die Amplifikationen wurden in 35 Zyklen durchgeführt, und die Abkühlungszeit von 95°C auf 33°C betrug 150 s. Nach Färbung mit Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) wurden die PCR-Produkte mittels 1,5%iger Agarosegel-Elektrophorese (100 V, 2 h) getrennt und anschließend durch UV-Illumination mit Gene Snap (Synergene, Cambridge, UK) visualisiert.

Klinisch kontrollierte randomisierte Feldstudie zur Therapie klinischer Mastitiden

Zur Ermittlung der Effekte auf Mastitiden wurden im Rahmen einer klinisch kontrollierten randomisierten Feldstudie in einem kommerziellen Milchviehbetrieb 100 Tiere, die auf einem Viertel eine Mastitis aufwiesen, entweder mit dem entwickelten Milchsäurebakterienpräparat (Versuchsgruppe) oder im Rahmen eines konventionellen evidenzgesicherten Behandlungskonzeptes (Kontrollgruppe) behandelt. Tiere der Versuchsgruppe wurden zweimalig im Abstand von 24 h behandelt. Eine applizierte Dosis enthielt bei einem Volumen von 10 ml im Mittel $7,5 \times 10^8$ KbE des Stammes 118/37. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden wie folgt behandelt (Krömker et al., 2018): Beim Feststellen einer klinischen Mastitis wurde eine Probe gezogen und mit einem Schnelltest (mastDecide, QUIDEE GmbH), der die Unterscheidung „Gram-positiver Erreger“, „Gram-negativer Erreger“ und „kein Erregernachweis“ erlaubte, mikrobiologisch untersucht. Das Tier wurde zunächst mit einem NSAID behandelt. Leichte und mittelschweren Mastitiden (leicht: Grad 1: Milchcharakter verändert, Flocken; mittelschwer: Grad 2: zusätzlich Euterveränderungen) therapiewürdiger Tiere, die durch Gram-positive Erreger verursacht wurden, wurden lokal antibiotisch behandelt. Bei therapieunwürdigen Tieren bzw. Gram-negativen Erregern und keinem Erregernachweis erfolgte die

Therapie mit Entzündungshemmern; auf eine lokale Antibiose wurde dabei verzichtet. Im Fall schwerer Mastitiden (Grad 3: Grad 2 + gestörtes Allgemeinbefinden) wurden sofort eine systemische Antibiose und eine Flüssigkeitstherapie eingeleitet. Die weitere Behandlung erfolgte wie beschrieben in Abhängigkeit von Erregernachweis und Therapiewürdigkeit. Matchingkriterien waren die Laktation (1, >1) und der Schweregrad der Mastitis (Grade 1, 2, 3).

Am Tag der Feststellung der Mastitis sowie 14 ± 2 Tage (Zeitpunkt K1) und 21 ± 2 Tage (Zeitpunkt K2) nach Behandlungsende wurden in Anlehnung an die Leitlinien der DVG (2009) und Mansion-de Vries et al. (2014) Viertelanfangsgemelksproben aseptisch gezogen und zytomikrobiologisch untersucht. Eine Probe wurde als kontaminiert eingestuft, wenn mehr als zwei unterschiedliche Erreger isoliert werden konnten. Die Analyse der Daten erfolgte mit verallgemeinerten linearen Modellen. Zielvariablen waren „mikrobiologische Heilung“ (ja/nein) und „Neuinfektion“ (ja/nein), unabhängige Variablen waren die Laktationsnummer (1, > 1), die Tage in Milch (< 100, 101-200, >200), die Gruppe des verursachenden Erregers, der Mastitisgrad und die Gruppe (Versuchsgruppe [mit Milchsäurebakterien behandelt], Kontrollgruppe).

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Darstellung der tatsächlich erzielten Ergebnisse

Screening und Charakterisierung der Stämme

Insgesamt konnten 416 Milchsäurebakterien-Isolate aus 1.532 Proben (Viertelanfangsgemelksproben, Tankmilchproben, Gras, Gülle, Einstreumaterial) isoliert werden. 367 Isolate, zwei Referenzstämme (*Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* ATCC 7469) und sechs Kombinationen wurden mit dem Well-Diffusionstest auf ihre Hemmwirkung gegenüber *Staphylococcus (S.) aureus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *Streptococcus (Sc.) uberis*, *Sc. agalactiae* und *Escherichia (E.) coli* untersucht. 170 Isolate hemmten das Wachstum von *Sc. uberis*, 78 von *S. epidermidis*, 37 von *S. aureus*, 36 von *S. xylosus*, 14 von *E. coli* und 13 von *Sc. agalactiae*. Nur die Kombination der Wildstämme 78/37 und 118/37 und der beiden Referenzstämme hemmte das Wachstum aller sechs Indikatorkeime. Alle vier Stämme waren in der Lage, in Milch zu wachsen.

Die Untersuchung des Biofilmbildungsvermögens und der Adhäsion an Euterepithelzellen der Wildstämme *Lb. plantarum* 2/37, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 33/30, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 35/37, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*

42/37, *Lb. brevis* 46/30, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 78/37, *Lb. brevis* 104/37, *Lb. plantarum* 118/37, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 123/37, *Lb. buchneri* SX.A.2 und *Lb. plantarum* 6E sowie die Referenzstämme *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 und *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 ergab, dass vor allem *Lb. plantarum* 2/37, *Lb. brevis* 104/37, *Lb. plantarum* 118/37, *Lb. plantarum* 6E, *Lb. brevis* 46/30, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 123/37 und *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 zur Biofilmbildung bzw. Adhäsion an Drüsenepithelzellen fähig sind.

Aufgrund der vorhandenen Antibiotikaresistenzen und eines potenziellen Transfers der Resistenzgene auf andere Mikroorganismen bzw. der Einstufung in die Risikogruppe 2 wurden, vor dem Hintergrund der angestrebten zukünftigen Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren, der Referenzstamm *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 und der Stamm 78/37 (*Lactobacillus paracasei*) bzw. der Stamm *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 aus den weiteren Untersuchungen (Hemmung von Endometritis-Erregern, Feldversuchen) ausgeschlossen. So konnten bei dem Wildstamm 78/37 das Gen *ermC* und bei *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 das Gen *ermB* nachgewiesen werden.

Der Stamm 118/37 war in der Lage, *in vitro* alle eingesetzten Isolate (jeweils sechs Isolate) der Endometritis-Erreger *E. coli* und *Sc. uberis* zu hemmen. Die zellfreien und pH-eingestellten bzw. zusätzlich enzymatisch behandelten Bouillons führten nur bei *Sc. uberis* zu einer Hemmung des mikrobiellen Wachstums. Die sechs *Trueperella pyogenes*-Isolate wurden dagegen durch keine der eingesetzten Lösungen gehemmt. Um die Milchsäurebakterien für die weiteren Feldversuche lagern zu können, wurden diese gefriergetrocknet. Dabei kam folgendes allgemeines Protokoll zur Anwendung:

- 1.) 0,1 ml *Lb. plantarum* (118/37) in 10 ml MRS-Bouillon (17h, 37°C)
- 2.) Standardisierung der Keimzahl durch Zugabe von Ringer-Lösung
- 3.) Zentrifugation (2000 n/min, 10min), Überstand entfernen
- 4.) mit 10 ml Ringer-Lösung waschen
- 5.) Zentrifugation (2000 n/min, 10min), Überstand entfernen
- 6.) Auffüllen auf 50 ml mit folgender Lösung:
Volumen 200 ml: 50 ml Ringer-Lösung (Infusionslösung hum. med.) mit 5 % Laktose, verdünnt mit 150 ml pyrogen-freiem Wasser
- 7.) je 1 ml Abfüllen in Rollrandgefäße
- 8.) Gefäße mit Gummistopfen für Gefriertrocknung luftdurchlässig verschließen
- 9.) Einfrieren bei -80 °C für mindestens 3 h

- 10.) Gefriertrocknen (0,7 m bar, -24°C, 23 h)
- 11.) Gefäße dicht verschließen
- 12.) Lagerung bei -20°C

Die Resuspendierung erfolgte direkt vor der Applikation mit 10 ml steriler ¼starker Ringer-Lösung.

Untersuchung von Verträglichkeit und Etablierung sowie Dosisfindung

In Untersuchungen zur Gewebeverträglichkeit wurden 10 ml einer Suspension von *Lb. plantarum* 118/37 in den Keimdichten 5×10^4 und 6×10^6 KbE/ml in die bovine Milchdrüse verbracht. Es konnten keine Störungen des Allgemeinbefindens oder sichtbare Beeinträchtigungen des Eutergewebes festgestellt werden. Ein moderater Anstieg der somatischen Zellzahl in der Milch konnte in allen Eutervierteln ermittelt werden. Bei einer Dosierung von 6×10^6 KbE/ml kam es zu einer kurzzeitigen Sekretveränderung in Form von Flockenbildung. *Lb. plantarum* 118/37 konnte bis zu 36 h nach Applikation aus Milchproben isoliert und mittels RAPD-PCR im Milchsekret nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Dosisfindung wurden an drei weiteren, klinisch eutergesunden Kühen durchgeführt. Die gewählten Dosierungen waren $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$ und $3,0 \times 10^6$ KbE/ml *Lb. plantarum* 118/37. Unabhängig von der infundierten Menge der Milchsäurebakterien waren keine Störungen des Allgemeinbefindens oder sichtbare Veränderungen des Eutergewebes feststellbar. Flockenbildung im Milchsekret wurde kurzzeitig bei der höchsten Dosierung in zwei Vierteln festgestellt. Die Behandlung mit der Lebendkultur verursachte in allen Vierteln einen signifikanten Zellzahlanstieg 12 h nach Applikation. 12 h nach Applikation von $3,0 \times 10^6$ KbE/ml wurden in zwei Eutervierteln Flocken festgestellt, welche 24 h nach Applikation nicht mehr zu finden waren. Die niedrigeren Dosierungen verursachten keine Sekretveränderungen, allerdings war die Immunantwort hier verzögert. Während bei der Dosierung von $3,0 \times 10^6$ KbE/ml der Zellzahlhöhepunkt nach 12 h und die Rückkehr zum Anfangszellgehalt nach 24-36 h erreicht wurde, war diese Reaktion bei den niedrigeren Dosierungen um 12 bis 24 h verschoben.

Dem Zellzahlanstieg lag eine Rekrutierung phagozytotischer Zellen zugrunde, vor allem polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyten. Für eine Etablierung in der Milchdrüse gibt es keine Hinweise, da *Lb. plantarum* 118/37 unabhängig von der angewandten Dosierung nicht länger als 36 h im Milchsekret identifizierbar war.

Feldstudie zur Therapie klinischer Mastitiden

Insgesamt wurden 50 Mastitisfälle mit Milchsäurebakterien behandelt. Im Median befanden sich die Tiere in der 4. Laktation (Minimum: 1. Laktation, Maximum: 9. Laktation). Drei Fälle traten in der ersten Laktation, 47 Fälle in höheren Laktation auf. 36 Fälle wurden als leicht (Grad 1), 11 Fälle als mittelschwer (Grad 2) und drei Fälle als schwer (Grad 3) eingestuft.

Bei 15 (Versuchsgruppe) bzw. 14 Fällen (Kontrollgruppe) wurden Erreger nachgewiesen. Als häufigste Erreger wurden aus Proben, die zum Zeitpunkt des Auftretens der Mastitiden gezogen wurden, *Streptococcus (Sc.) uberis*, *Escherichia (E.) coli* und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) isoliert (Tabelle 1). Die Erregerverteilung unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen (Versuchsgruppe, Kontrollgruppe; Chi-Quadrat-Test, $P > 0,05$).

Tabelle 1: Nachweis von Mastitiserregern in Viertelanfangsgemelksproben von an Mastitiden erkrankten Eutervierteln (Versuchsgruppe: mit Milchsäurebakterien behandelt)

Befund	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
o.b.B. ¹	35	36
<i>Sc. uberis</i>	6	4
<i>E. coli</i>	2	2
andere coliforme Bakterien	1	1
KNS ²	2	3
sonstige Erreger	2	2
Mischinfektion	1	1
kontaminiert ³	1	1

¹: ohne besonderen Befund

²: Koagulase-negative Staphylokokken

³: Nachweis von mehr als zwei Erregern

Zwei Tiere aus der Versuchsgruppe wurden gemerzt (Merzungsgründe: 1 x Eutergesundheit, 1 x anderer Grund), so dass keine Kontrollproben gezogen werden konnten. In jeweils zwei Fällen wurde der Erreger, der zum Zeitpunkt der Mastitis nachgewiesen wurden, bei beiden Nachkontrollen festgestellt (Versuchsgruppe: *Sc. uberis*, sonstige Streptokokken; Kontrollgruppe: *Sc. uberis*, KNS). In der Versuchsgruppe wiesen 46 Viertel zum Zeitpunkt K1 und 42 zum Zeitpunkt K2 und in

der Kontrollgruppe 45 Viertel zum Zeitpunkt K1 und 39 Viertel zum Zeitpunkt K2 einen somatischer Zellgehalt der Milch von über 100.000 Zellen/ml oder ein sinnfälliger verändertes Sekret auf.

Die statistische Analyse der Daten ergab, dass keine signifikanten Unterschiede der Heilung und der Neuinfektion zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe bestanden (jeweils $P > 0,05$). Die Gruppen unterschieden sich nicht in der Laktationsnummer, dem Laktationsstadium, der Verteilung der verursachenden Mikroorganismen und dem Mastitisgrad (jeweils $P > 0,05$).

6.4 Diskussion

6.4.1 Inwieweit wurden die verfolgten Ziele erreicht?

Im Rahmen der Untersuchungen konnten aus verschiedenen Probenmaterialien (u.a. Milch, Gras, Gülle) Milchsäurebakterien isoliert werden, die

1. längerfristig kultivierbar sind,
2. *in vitro* hemmend auf euterpathogene Mikroorganismen wirken,
3. an Euterepithelzellen binden und
4. in Milch wachsen/überleben

und damit potenziell für die Anwendung in der Milchdrüse geeignet sind. Eine Matrix zur Einbindung der Milchsäurebakterien konnte erfolgreich entwickelt werden. Unverträglichkeiten wurden in dem sich anschließenden Feldversuch keine festgestellt. Allerdings konnten Effekte auf die Immunreaktion beobachtet werden.

Die Ergebnisse des Feldversuches haben deutlich gemacht, dass eine Mastitistherapie mit Milchsäurebakterien ein geeignetes und nachhaltiges Instrument darstellen kann. Weitere Untersuchungen sind allerdings erforderlich, um die Wirksamkeitsdaten auf eine breitere Basis zu stellen und um z.B. mögliche Lager- und Applikationsformen zu prüfen. Aufgrund der tierschutzrechtlichen Gegebenheiten war die erste klinische Feldstudie so angelegt, dass mit der kleinstmöglichen Untersuchungsstichprobe die grundsätzliche Nichtunterlegenheit der neuen Therapie gegenüber konventionellen Therapieformen geprüft wurde. In einem weiteren Schritt ist eine größere klinische Studie erforderlich.

6.4.2 Woraus ergeben sich die Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse?

Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse traten nicht auf. Die Aufnahme geeigneter Tiere für die Feldversuche verzögerte sich, so dass das Projekt kostenneutral verlängert wurde.

6.4.3 Wie gestaltete sich die Arbeit mit den unterschiedlichen Kooperationspartnern?

Die Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern war sehr gut. Mit dem Partner Dr. Windmann Pharma GmbH fand ein regelmäßiger Austausch über neue Erkenntnisse und weitere Maßnahmen in Projekttreffen, telefonisch oder schriftlich statt. Herr Prof. Dr. med. vet. Heuwieser hat Stämme von *Sc. uberis*, *E. coli*, *Trueperella pyogenes* und *Fusobacterium* spp. für weitere Untersuchungen bereitgestellt, die bei bovinen Endometritiden isoliert wurden.

6.5 Öffentlichkeitsarbeit

6.5.1 Wie werden die Ergebnisse veröffentlicht?

Die Ergebnisse des Projektes wurden in zahlreichen Publikationen veröffentlicht:

Diepers, A.C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J.H. 2016. Milchsäurebakterien – Untersuchung hemmender Eigenschaften gegenüber euterpathogenen Mikroorganismen in-vitro. Vortrag, Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover, Hannover, 01.04.2016.

Diepers, A.C., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Pan, L., Paulsen, K., Paduch, J.H. 2017. *In vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. Sustainable Chemistry and Pharmacy 5: 84-92.

Wallis, J. 2018. *In vitro* Biofilmbildung von Milchsäurebakterien mit probiotischem Potential. Vortrag, Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover, Hannover, 17.03.2017.

Diepers, A.C., Paduch, J.H., Krömker, V. 2017. Milchsäurebakterien – Entwicklung eines innovativen Therapeutikums zur lokalen Mastitistherapie. Vortrag, 42. Leipziger Fortbildungsveranstaltung „Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung“, Leipzig, 16.06.2017.

Diepers, A.C. 2017. Isolierung von Milchsäurebakterien mit hemmender Wirkung gegenüber Euterpathogenen und orientierende Untersuchungen zur intramammären

Anwendung an der bovinen Milchdrüse. Dissertation, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Wallis, J. 2018. Adhäsionsfähigkeit biofilmbildender Milchsäurebakterien an das Drüsenepithel des bovinen Euters. Vortrag, Mastitisnachmittag der Hochschule Hannover, Hannover, 02.03.2018.

Wallis, J. 2018. Adhäsionsfähigkeit biofilmbildender Milchsäurebakterien an das Drüsenepithel des bovinen Euters. Vortrag, DVG-Kongress, Berlin, 23.03.2018.

Wallis, J., Krömker, V., Paduch, J.H. 2018. Biofilm formation and adhesion to bovine udder epithelium of potentially probiotic lactic acid bacteria. AIMS Microbiology 4: 209-224.

Weitere Veröffentlichungen (u.a. zur Feldstudie) befinden sich zum Zeitpunkt der Berichterstellung in Vorbereitung.

6.5.2 Wer partizipiert an den Ergebnissen?

Das Projekt liefert wesentliche Erkenntnisse für die Entwicklung probiotischer Kulturen für die Anwendung bei Nutztieren, so dass vor allem veterinärpharmazeutische Unternehmen von diesem Projekt profitieren. Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anwendung von Milchsäurebakterien bei bovinen Endometritiden, die durch *E. coli* und *Sc. uberis* verursacht werden, eine geeignete therapeutische Maßnahme darstellen kann. Milchsäurebakterien erwiesen sich als geeignet für die Therapie von Mastitiden.

6.5.3 Wird das Vorhaben über die Projektlaufzeit weitergeführt?

Das Vorhaben soll über die Projektlaufzeit hinaus fortgeführt werden. Die Entwicklung des Therapeutikums bis zur Marktreife wird durch das Projektkonsortium angestrebt. Weitere Anwendungsgebiete (z. B. Therapie von Endometritiden) sollen darüber hinaus erschlossen werden. Allerdings ist trotz guter Ergebnisse der Prozess bis zur Marktreife noch erheblich risikobehaftet, sodass weitere öffentliche Förderung erschlossen werden muss.

6.6 Fazit

6.6.1 Hat sich die Vorgehensweise bewährt?

Aufgrund der engen Anlehnung der Untersuchungen an das bestehende Wissen und an das in der Literatur beschriebene Vorgehen hat sich das Vorgehen bewährt. Aus

den Untersuchungen sind zahlreiche Publikationen hervorgegangen, die für weitere Entwicklungsschritte essentiell sind.

6.6.2 Werden Änderungen der Zielsetzung notwendig?

Änderungen der Zielsetzung waren nicht erforderlich.

7. Literaturangaben

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG). 2009. Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung von Mastitiserregern. DVG, Gießen 2009.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG). 2012. Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. DVG, Gießen 2012.

Diez-Gonzalez, F. 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 8: 15-24.

Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., Oliver, S.P. 1997. Identification of *Streptococcus* species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting. *J. Dairy Sci.* 80: 471-476.

International Dairy Federation (IDF). 1987. Bovine mastitis – Definition and guidelines for diagnosis. International Dairy Federation.

Krömker, V. 2007. Euterkrankheiten. In: Krömker, V. (editor). *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Parey, Stuttgart, 47-74.

Krömker, V., Schmenger, A., Kock, J., Klocke, D., Paduch, J.-H., Leimbach, S. 2018. Aspekte einer modernen Mastitistherapie. *Der Praktische Tierarzt* 99: 180-189.

Küster, A., S. Lehmann, A. Hein, J. Schönfeld. 2013. Antibiotika in der Umwelt – Wirkung mit Nebenwirkung. *UMID: Umwelt und Mensch – Informationsdienst* 1/2013: 18-28.

Mansion-de Vries, E.M., Knorr, N., Paduch, J.-H., Zinke, C., Hoedemaker, M., Krömker, V. 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.

Schaeren, W. 2006. Antibiotikaverbrauch 2003 und 2004 in der Milchproduktion. *Agrarforschung* 13: 234-239.

Tenhagen, B.A., I. Hansen, A. Reinecke, W. Heuwieser. 2009. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *J. Dairy Res.* 76: 179-187.