

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. – DVG –

Stellungnahme des Sachverständigenausschusses zur Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Mastitisdiagnostik

Vorbemerkung

In den vergangenen Wochen sind unter den tierärztlichen Labordiagnostikern, die sich schwerpunktmäßig mit der mikrobiologischen Diagnostik von Eutererkrankungen auseinandersetzen, intensive Diskussionen über neue Technologien zur Diagnostik von Mastitis-erregern aus Milchproben geführt worden. Insbesondere hat ein Mastitis-PCR-Testkit Anlass für viele Debatten gegeben.

Der Sachverständigenausschuss „Subklinische Mastitis“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), der unlängst die überarbeiteten „Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitis-erregern“ (2. Auflage, Juni 2009) herausgegeben hat, nimmt dazu wie folgt Stellung:

Die Erzeugung qualitativ hochwertiger und gesundheitlich unbedenklicher Lebensmittel ist ein gesellschaftspolitisches Anliegen. Der Begriff Qualität ist allgemein definiert als die Summe aller Eigenschaften eines Objektes in Bezug auf seine Eignung für bestimmte Zwecke. Auf das Lebensmittel Milch übertragen bedeutet dies, Rohmilch muss eine substanziiell physiologische Beschaffenheit aufweisen und frei von pathogenen Mikroorganismen, mikrobiellen Toxinen, chemischen Kontaminanten und Rückständen sein.

In diesem Sinn hat die Bekämpfung von Eutererkrankungen auf der Grundlage einer qualifizierten Diagnostik einen hohen Stellenwert. Zur Identifizierung von Mastitis-erregern stehen neben konventionell bakteriologischen Verfahren auch moderne molekularbiologische Verfahren zur Verfügung. Insbesondere die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat revolutionäre Entwicklungen in der Diagnostik von Infektionskrankheiten ausgelöst.

Seit Mitte der 1990er Jahre sind in der internationalen wissenschaftlichen Literatur Arbeiten zum Nachweis von Mastitis-erregern mittels dieser Methode veröffentlicht worden [Jayarao et al. 1996; Forsman et al. 1997; Zschöck et al. 1999; Kim et al. 2001; Riffon et al. 2001; Daly et al. 2002; Meiri-Bendek et al. 2002; Phuektes et al. 2001; Zschöck et al. 2003; Gillespie and Oliver 2005; Graber et al. 2007; Graber et al. 2008; Kosinen et al. 2009; Taponen et al. 2009]. Auch in Deutschland wird das Verfahren seit einigen Jahren bei entsprechender Indikation von einigen Arbeitsgruppen bzw. Diagnostik-labors, wenn auch nicht unbedingt in der Routinediagnostik, angewandt.

Grundsätzlich ist bei der Auswahl diagnostischer Verfahren zu berücksichtigen, dass die

Mastitisbekämpfung im jeweiligen Betrieb eine ganzheitliche Betrachtung des Infektionsgeschehens und somit eine Bestandsdiagnostik erfordert. Dabei geht es primär um eine Feststellung der Leitkeime, um geeignete Bekämpfungsmaßnahmen festzulegen. Insbesondere sind auch Erreger subklinischer Mastitiden in die ätiologische Diagnostik einzubeziehen. Ein Nachweis des Mastitis-erregers in jeder Viertelgemelksprobe unter Einbeziehung aufwändiger Verfahren ist nicht zwingend erforderlich. Da es sich im Rahmen von Bekämpfungsprogrammen in der Regel um ein langfristiges Gesundheitsproblem des Gesamtbestandes handelt, ist kein unmittel-

Geschäftsstelle:

Friedrichstr. 17, 35392 Gießen,
Tel. (06 41) 2 44 66, Fax (06 41) 2 53 75,
E-Mail: info@dvgn.net,
Internet: www.dvgn.net
Pressestelle: Prof. Dr. Volker Moennig,
Tierärztliche Hochschule Hannover,
Bünteweg 2, 30559 Hannover,
Tel. (05 11) 9 53-80 48,
Fax (05 11) 9 53-82 88 98,
E-Mail: volker.moennig@tiho-hannover.de
Konto: Dresdner Bank Gießen, Kto.-Nr.
882 377 700 (BLZ 513 800 40); Post giro Frankfurt,
Kto.-Nr. 126 560 609 (BLZ 500 100 60)

barer therapeutischer Interventionsbedarf gegeben.

Der Nachweis der ursächlichen Erreger bei klinischen Mastitiserkrankungen ist zwar im Einzelfall für eine zielgerichtete Therapie erforderlich, wird jedoch langfristig nur bei konsequenter Durchführung und Einbeziehung in ein Gesamtkonzept, in dem vor allem auch Erreger subklinischer Mastitiden erfasst werden, zum Erfolg von Bekämpfungsprogrammen beitragen.

Tab. 1: Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Mastitisdiagnostik

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Schnelligkeit – Diagnose innerhalb von wenigen Stunden möglich • hohe Nachweisempfindlichkeit und Spezifität • vereinfachter Nachweis von schwer anzüchtbaren Erregern (z. B. <i>Mycoplasma</i> spp.) • Screening auf spezifische Erreger, die nur im Euter vorkommen (<i>Streptococcus agalactiae</i>, <i>Mycoplasmen</i>) auch in Tankmilch oder Gesamtgemelksproben bzw. Poolproben möglich • möglicher Erregernachweis bei kulturell negativen Proben, z.B. bei klinischen Mastitiden, ggf. auch nach Vorbehandlung • Identifizierung von kulturellen Isolaten • Typisierung von Isolaten für epidemiologische Zwecke, Nachweis von Virulenzfaktoren • Möglichkeit der Automatisierung 	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Kosten für Reagenzien bzw. kommerzielle Testkits, spezielle Geräteausstattung erforderlich • Möglichkeit falsch-positiver Befunde durch – Kontaminationen vor der Probenahme (Sammelproben, line and tank sampling) – Kontaminationen bei der Probenahme durch Oberflächen von Gerätschaften (z. B. Gesamtgemelksproben, Tankproben) – Kreuzkontaminationen bei der Probenaufbereitung • Möglichkeit falsch-negativer Befunde durch – geringe Sensitivität – abhängig vom Erreger – Störfaktoren im PCR-Ansatz – Erregervarianten, die Mutationen in der Zielsequenz der Primer aufweisen – Zerstörung der Ziel-Nukleinsäuren durch Kontamination der Probe mit DNAsen – Nichterfassung bestimmter Spezies durch eingeschränktes diagnostisches Spektrum • ätiologische Bedeutung nachgewiesener Erreger fraglich • Einsatz zur Überprüfung eines Therapieerfolges eingeschränkt, da auch nicht vermehrungsfähige Erreger nachgewiesen werden, nur bei ausreichendem zeitlichem Abstand möglich • Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung nur als Nachweis von Resistenzgenen bei bestimmten Spezies, phänotypische Ausprägung nicht überprüfbar • hoher Aufwand für Standardisierung und Qualitätskontrolle

PCR in der Mastitisdiagnostik

Die PCR besitzt zweifelsfrei eine Reihe von Vorteilen, wie Schnelligkeit und eine vergleichsweise hohe Nachweisempfindlichkeit und -richtigkeit (**Tab. 1**). Im Hinblick auf die Untersuchung von Viertel- bzw. Einzelgemelksuntersuchungen zur Mastitisdiagnostik sind Methoden der PCR gegenüber der konventionellen kulturellen Technik im Vorteil, da eine Diagnostik innerhalb von nur 3–4 Stunden möglich wird. Insbesondere in Fällen akuter Mastitiden ist hier ein ätiologischer Erregernachweis innerhalb kürzester Zeit möglich. Die Sensitivität wird beispielsweise vom Hersteller des Tests Pathoproof® mit 100 cfu/ml Milch (cfu = colony forming units, Koloniebildende Einheiten), die Spezifität mit 100 Prozent angegeben. Ebenfalls von Vorteil ist, dass der Krankheitserreger selbst bzw. dessen Genom nachgewiesen wird und nicht seine Produkte wie Oberflächenantigene oder Toxine bzw. Produkte der Immunantwort (Antikörper).

Auch schwer anzüchtbare Erreger wie *Mycoplasma spp.* können innerhalb dieses Zeitraums mit den Einschränkungen falsch-positiver bzw. falsch-negativer Resultate im Rahmen des durch das jeweilige Testsystem vorgegebenen Erregerspektrums nachgewiesen werden. Durch das spezielle Nachweisprinzip des Genomnachweises können auch infolge

einer antiinfektiven Therapie subletal geschädigte Erreger nachgewiesen werden.

Allerdings gibt es auch Nachteile des Verfahrens (**Tab. 1**). So ist die Durchführung des Verfahrens gegenüber den konventionellen mikrobiologischen Untersuchungstechniken nach wie vor mit vergleichsweise hohen Kosten verbunden, was sich durch die prinzipielle Möglichkeit der Automatisierung möglicherweise in Zukunft ändern wird.

Falsch-positive Ergebnisse sind möglich und können u. a. verursacht sein durch eine Kontamination bereits vor oder bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials bzw. eine Kontamination während der Durchführung der PCR selbst, hauptsächlich durch bereits amplifizierte Reaktionsprodukte. Im Allgemeinen wird die Kontaminationsgefahr bei der Testdurchführung mit dem Real-time-PCR-Verfahren als geringer eingeschätzt, da es sich hier im Vergleich zur konventionellen PCR um ein geschlossenes System handelt.

Wie bei jeder mikrobiologischen Untersuchungsmethode sind auch falsch-negative Untersuchungsergebnisse möglich. Diese können u. a. verursacht sein durch eine zu geringe Anzahl von Krankheitserregern in der Probe, Inhibitoren der DNA-Polymerase in der Probe, Erreger-Varianten, die aufgrund einer veränderten Nukleotidsequenz eine Amplifikation mit

den verwendeten Primern nicht zulassen und/oder die ungewollte Zerstörung der Erreger-Nukleinsäure durch eingeschleppte DNAsen.

Zudem werden durch kommerziell verfügbare PCR-Testsysteme nicht alle relevanten Erreger mit einem Test nachgewiesen. So werden beispielsweise vom Hersteller Finnzymes Diagnostics unter dem Namen Pathoproof® zwei Testsysteme vertrieben. Mit einem Test lassen sich speziesspezifische DNA-Sequenzen von elf verschiedenen Mastitiserregern bzw. -erregerguppen sowie das Beta-Lactamase-Gen für die Penizillinresistenz (blaZ) bei Staphylokokken nachweisen. Ein weiteres Testsystem dieses Herstellers ermöglicht einen Nachweis von drei Vertretern sogenannter „major pathogens“.

Dagegen werden verschiedene Erreger, die über eine niedrige Prävalenz verfügen, nicht nachgewiesen, wie einige Streptokokken-Spezies (z. B. der zu den kontagiösen Erregern gehörende *Streptococcus [S.] canis*), Nonfermenter, einige *Enterobacteriaceae*, Hefen und Prototheken. Eine parallel durchzuführende, kulturelle Untersuchung ist daher unabdingbar und schränkt somit die Anwendbarkeit der Tests auf mit der Mastitisdiagnostik vertraute Labors ein.

Schließlich sollte nicht unerwähnt bleiben, dass der alleinige qualitative Nachweis von erregerspezifischer Nukleinsäure im Untersuchungsmaterial nicht per se die Ätiologie einer

Erkrankung beweist. Durch die Verwendung der Real-time-PCR ist gleichzeitig eine Quantifizierung des Genoms möglich, sodass indirekt Rückschlüsse auf die Erregermengen in der Probe möglich sind. Dies soll zur Beurteilung der ätiologischen Bedeutung nachgewiesener Erreger beitragen.

Grundsätzlich können Milchproben als Tankmilchproben, auf Tierebene als Gesamtgemelk einer Milchdrüse oder auf Viertelebene als Anfangs-, End- oder Gesamtviertelgemelk gewonnen und einer mikrobiologischen Untersuchung zugeführt werden. Von den mittels kommerzieller Testkits nachweisbaren Mastitiserregern gehören *S. agalactiae*, *Staphylococcus (St.) aureus* und *Mycoplasma spp.* zu den so genannten Kuh-assoziierten (kontagiösen) Mastitiserregern, d. h. deren natürliches Habitat ist die infizierte Milchdrüse. Streng genommen trifft dies eigentlich nur für *S. agalactiae* zu, da *St. aureus* auch auf der äußeren Haut und der Zitzenhaut nachgewiesen werden kann. Alle übrigen, mittels kommerzieller PCR-Tests nachweisbaren Mastitiserreger sind so genannte Umwelt-assoziierte Erreger, die in der Umwelt der Milchkuhe vorkommen und somit eine Probe auch kontaminieren können.

Wie bei der konventionellen kulturellen Diagnostik sind somit auch bei der PCR hohe Anforderungen an die Probenqualität und Probenahme unumgänglich. Während sich eine Kontamination einer Probe im konventionellen Verfahren meistens leicht feststellen lässt, ist dies bei der PCR nicht möglich, sodass antiseptisch entnommene Proben hier noch wichtiger sind. Somit ist der Einsatz dieser Methode bei unvermeidbar kontaminierten Proben, wie den Proben, die im Rahmen der Milchleistungsprüfung (MLP-Proben) oder den Tankmilchproben, die im Rahmen der monatlichen Milchgüteuntersuchung am Milchsammelwagen anfallen, auf sehr wenige Anwendungsgebiete begrenzt.

Diagnostische Lücken wie auch die Möglichkeiten falsch-positiver/falsch-negativer Resultate können zu einer Fehlinterpretation führen, die nur durch einen parallel durchgeführten, konservativ-kulturellen Ansatz vermeidbar ist.

Die PCR-Anwendung bei Proben von antibiotisch vorbehandelten Kühen bietet die Möglichkeit auch bei kulturell negativen Ergebnissen, das ursächliche Agens zu identifizieren. Die Tatsache, dass nach PCR-Diagnostik kein vermehrungsfähiger Erreger zur Verfügung steht, schränkt den Wert dieses Verfahrens aber gerade beim Vorliegen von klinischen Mastitiden, bei denen eine In-vitro-Sensitivitätstestung des ätiologisch bedeutsamen Erregers notwendig ist, ein. Mit Ausnahme des Nachweises des Penicillinase-Gens kann eine Empfindlichkeitsprüfung nicht durchgeführt werden.

Die Verwendung der PCR in Sanierungsbetrieben bzw. zur Therapiekontrolle ist aufgrund des Genomnachweises, also des Nachweises auch nicht oder nicht mehr vermehrungs-

fähiger Mikroorganismen, ebenfalls ausgeschlossen.

Große Vorteile bieten die PCR bzw. andere molekularbiologische Verfahren bei der Typisierung von speziellen Erregern, z. B. durch den Nachweis von Virulenzfaktoren. Da bei vielen Mastitiserregern bisher nicht bekannt ist, welche Faktoren zu einer Erhöhung der Virulenz beitragen, hat dies für die Routinediagnostik allerdings noch keine Bedeutung.

Standardisierung der Verfahren und Qualitätskontrollen sind notwendige Bedingungen für den Einsatz in der Routinediagnostik. Allgemeine Mindestanforderungen und Begriffe bezüglich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind z. B. in den DIN-Normen 58967 Teil 60 und 58969 Teil 61 bzw. NCCLS guidelines (1995) festgelegt und sind auch bei der Mastitisdiagnostik zu beachten.

Trotz der möglichen und bereits tatsächlich erzielten Fortschritte durch die Anwendung der PCR ist diese Methode, zumindest im Rahmen der Mastitisdiagnostik, noch nicht so ausgereift, dass sie im diagnostischen Routinebetrieb allgemein und zuverlässig eingesetzt werden kann.

Schlussfolgerungen

Aus der Sicht des Sachverständigenausschusses „Subklinische Mastitis“ ergeben sich daher bezüglich des Einsatzes der PCR bei Viertel-, Einzel- und Sammelgemelken zur Mastitisdiagnostik folgende Indikationen:

1. Ergänzende Diagnostik bei akuter klinischer Mastitis

Beim Vorliegen einer klinischen Mastitis könnte der Test aufgrund seiner vergleichsweise kurzen Bearbeitungszeit für eine frühzeitige Einleitung einer Initialtherapie verwendet werden. Unter der Prämisse einer unter strengen antiseptischen Bedingungen durchgeführten Probenahme, können gezielt Erreger nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden. Allerdings ist die parallele Durchführung einer konventionellen kulturellen Untersuchung aufgrund des eingeschränkten diagnostischen Spektrums der PCR-Verfahren und der Notwendigkeit der Anfertigung einer In-vitro-Resistenztestung unerlässlich.

Dementsprechend muss der Test in einem in der Mastitisdiagnostik erfahrenen Labor durchgeführt werden. Der verantwortliche Laborleiter muss in jedem Fall umfassende klinisch-mikrobiologische und medizinische Fachkenntnisse nachweisen können.

2. Screening auf (kontagiöse Erreger) Kuh-assoziierte Mastitiserreger

Bestands- bzw. Tankmilchproben sind immer durch Umwelt-assoziierte Mastitiserreger und durch Keime aus den milchabführenden Wegen kontaminiert, sodass hier der Einsatz der PCR wenig zielführend ist. Der eingeschränkte Einsatz dieser Tests als Screening-Untersuchung auf kontagiöse Mastitiserreger insbesondere

auf den streng an das infizierte Rindereuter angepassten *S. agalactiae* in Tankmilch bzw. Gesamtgemelksproben ist aus fachlicher Sicht vertretbar. Als Voraussetzung für klinische Konsequenzen muss jedoch eine Abklärungsuntersuchung mittels konventionell-kultureller Untersuchungsverfahren erfolgen.

Eine Untersuchung von Tankmilch auf *St. aureus* mittels dieser Testsysteme ist nicht sinnvoll, da der Erreger auch außerhalb des Euters nachgewiesen werden kann und somit bei positivem Befund sehr leicht Fehlinterpretationen auftreten können, sofern nicht eine Abklärung durch konventionell-kulturelle Untersuchungsverfahren erfolgt.

3. Nachweis schwer anzüchtbarer Erreger

Beim Verdacht auf Infektionen mit schwer anzüchtbaren Erregern wie Mykoplasmen ist der Einsatz von PCR-Verfahren als Ergänzung zu kulturellen Verfahren wie auch als Screening sinnvoll, um das Stellen einer ätiologischen Diagnose zu ermöglichen.

4. Identifizierung kultureller Isolate

Beim Vorliegen kultureller Isolate aus Viertelgemelksproben als Reinkulturen kann die Bestätigung mittels biochemischer oder serologischer Verfahren zeitaufwändig sein. Der Einsatz von PCR-Verfahren kann in diesen Fällen die exakte Identifizierung beschleunigen. Da die vorliegenden Kulturen auf Kontaminanten geprüft werden können, stellt sich in diesen Fällen das Problem der Interpretation der Befunde nicht.

5. Typisierung von Isolaten

Für bestimmte Fragestellungen kann im Rahmen der Mastitisdiagnostik die Typisierung von Isolaten sinnvoll sein.

Dazu gehört der Nachweis von Virulenzfaktoren (z. B. Hämolyse, Toxinbildungsvermögen, Anheftungsfaktoren) ebenso wie die Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen. Für Letzteres sind neben PCR-Verfahren auch andere molekularbiologische Verfahren (z. B. Pulsfeld-Gel-Elektrophorese) verfügbar. Für die Routinediagnostik ist eine Typisierung von Mastitiserregern von nachrangiger Bedeutung, sodass diese Verfahren Forschungsprojekten vorbehalten sein werden.

Ausblick

Gen-Amplifikationsverfahren wie die PCR besitzen zweifellos bezüglich der Abklärung spezifischer diagnostischer Fragestellungen einen hohen Wert. Sowohl die höchstmögliche Qualität der Testdurchführung als auch die ordnungsgemäße Befundinterpretation sind wichtige Komponenten zur Vermeidung von Fehldiagnosen.

Möglicherweise lassen sich durch die Einbeziehung der Quantifizierungsmöglichkeit mittels des Real-time-PCR-Verfahrens Schwellenwerte festlegen, die zukünftig eine bessere Interpretation dieser Ergebnisse ermöglichen.

Bezogen auf die Routine-Mastitistestdiagnostik muss zukünftig im Kontext mit den konventionell-kulturellen Verfahren der Stellenwert der PCR genauer definiert werden. Eine gründliche klinisch-mikrobiologische Evaluation zur Präzision des diagnostischen Wertes dieser Untersuchungstechnik ist dringend erforderlich. Dazu gehört eine multizentrische Bestimmung der positiven/negativen prädiktiven Werte, eine quantitative Standardisierung im Falle der Real-time-PCR sowie der Aufbau einer angemessenen Qualitätskontrolle, jeweils bezogen auf die entsprechende diagnostische Fragestellung im Mastitislabor. Zum direkten Nachweis von Mastitiserregern aus der Viertelanfängsgemelksprobe oder anderen in den Leitlinien definierten Probenarten auf Kuh- oder Euterebene galten und gelten aufgrund der hier dargestellten Aspekte weltweit konventionelle mikrobiologische Methoden als Gold-Standard.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass den PCR-Verfahren zurzeit nur im Rahmen der vorgenannten Indikationen ein gewisser Stellenwert für die Routine-diagnostik von Mastitiserregern zukommt, wobei zur Interpretation der Befunde auf eine parallel durchgeführte konventionell-kulturelle Untersuchung nicht verzichtet werden kann.

Die Mitglieder des

Sachverständigenausschusses

„Subklinische Mastitis“ der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG),

Dr. Michael Zschöck, Dr. Karin Knappstein,

Prof. Dr. Klaus Fehlings, Prof. Dr. Martina

Hoedemaker, Dr. Wolfram Klawonn,

Prof. Dr. Rolf Mansfeld, Prof. Dr. Axel Sobiraj,

Dr. Martin Spohr, Dr. Franz Uhlenbruck,

Dr. Gerhard Wittkowski

Literatur

– Daly, P., Collier, T. and S. Doyle (2002): PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. *Let. Appl. Microbiol.* 34:222–226.

– Forsman, P., Tilsala-Timisjärvi, A. and T. Alatossava (1997): Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143, 3491–3500.

– Gillespie B. E. and S. P. Oliver (2005): Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Dairy Sci.* 88, 3510–3518.

– Graber, H. U., M. G. Casey, J. Naskova, A. Steiner and W. Schaeren (2007): Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. *J. Dairy Sci.* 90:4661–4669

– Graber, H. U., E. Studer, W. Schaeren, J. Naskova, H. Pfaeffli, T. Kaufmann, M. Kirchhofer and A. Steiner (2008): A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain

reaction-based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Dairy Sci.* 91:1893–1902

– Jayarao, B. M., Gillespie, B. E. and S. P. Oliver (1996): Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. *J. Food Prot.* 59, 615–620.

– Kim, C.-H., Khan, M., Morin, D. E., Hurley, W. L., Tripathy, D. N., Kehrl, M., Jr., Oluoch, A. O. and I. Kakoma (2001): Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 84, 74–83.

– Koskinen, M. T., J. Holopainen, S. Pyörälä, P. Bredbacka, A. Pitkälä, H. W. Barkema, R. Bexiga, J. Roberson, L. Sølverød, R. Piccinini, D. Kelton, H. Lehmusto, S. Niskala and L. Salmikivi (2009): Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 92:952–959

– Leitlinien: Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern (2009): Deutsche Veterinärmedizinische Ge-

sellschaft e. V. (DVG), Fachgruppe „Milchhygiene“, Sachverständigenausschuss „subklinische Mastitis“, Juni 2009, 2. Auflage.

– Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedman, A., Leitnen, G., Saron, A., Friedman, S. and Y. Kashii (2002): A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *J. Dairy Sci.* 85, 1717–1723.

– National Committee for Clinical Laboratory Standards (1995): Molecular diagnostic methods for infectious diseases; approved guideline. NCCLS Document MM3-A

– Phuektes, P., Mansell, P. D. and G. F. Browning (2001): Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84, 1140–1148.

– Riffon, R. K., Sayasith, H., Khalil, P., Dubreuil, M., Drolet, P. and J. Lagace (2001): Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2584–2589.

– Taponen S., L. Salmikivi, H. Simojoki, M. T. Koskinen and S. Pyörälä (2009): Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.* 92: 2610–2617.

– Zschöck, M. (1999): Aktuelle Aspekte zur Diagnostik von Mastitiserregern – Stand und Entwicklungstendenzen – Tagung des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ der DVG am 27. und 28. 5. 1999 in Hannover

– Zschöck, M., B. Kloppert und W. Wolter (2003): Die Anwendung molekularbiologischer Verfahren in der bakteriologischen Mastitistestdiagnostik. Tagung des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ der DVG am 3./4. 4. 2003, Kiel