

Aus der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung  
(Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung: Prof. Dr. H. Zerbe)  
im Zentrum für klinische Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Modellhafte Untersuchungen zur Frühphase der Mastitis beim Rind**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Daniel Stefan Mehne  
aus Kehl am Rhein

München 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion: 13.02.2010

Gefördert aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG FOR 585, ZE414/3-1)  
durch Personal- und Sachmittel.

# **Meiner Familie**

## INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 EINLEITUNG .....	1
2 LITERATURTEIL .....	3
2.1 Die Mastitis des Rindes.....	3
2.1.1 Definition.....	3
2.1.2 Pathogenese .....	4
2.2 Experimentelle Mastitismodelle.....	7
2.3 Immunrelevante Zellen der Milch.....	9
2.3.1 Neutrophile Granulozyten .....	9
2.3.2 Makrophagen .....	12
2.3.3 Lymphozyten .....	13
2.3.4 Zellzahl und -verteilung in der Milch einer gesunden Milchdrüse.....	16
2.3.5 Zellzahl und -verteilung in der Milch nach Infektion der Milchdrüse .....	17
2.4 Milch Inhaltsstoffe.....	19
2.4.1 Fett .....	19
2.4.2 Eiweiß .....	20
2.4.3 Laktose.....	21
2.4.4 pH-Wert .....	22
2.4.5 Harnstoff.....	23
2.4.6 Milch Inhaltsstoffe in der Milch einer gesunden Milchdrüse.....	24
2.4.7 Milch Inhaltsstoffe in der Milch nach Infektion der Milchdrüse.....	25
3 GERÄTE, MATERIALIEN UND METHODEN.....	28
3.1 Geräte .....	28
3.2 Materialien .....	29
3.2.1 Klinikbedarf.....	29
3.2.2 Laborbedarf.....	30
3.2.3 Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien.....	31
3.2.4 Puffer und Lösungen.....	32
3.2.4.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA .....	32
3.2.4.2 Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz .....	33
3.2.4.3 Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	33
3.2.5 Versuchstiere .....	34
3.2.6 Modellbakterien.....	34
3.2.7 Antikörper.....	37
3.3 Methoden.....	37
3.3.1 Tierschutzantrag .....	37
3.3.2 Modellbedingungen und Voruntersuchungen der Probanden .....	37
3.3.3 Präparation der Infektionsdosis .....	38
3.3.4 Experimentelle Infektion einzelner Euterviertel.....	39
3.3.5 Gewinnung der Milchproben.....	40
3.3.6 Erhebung und Beurteilung allgemeiner klinischer Parameter.....	40
3.3.7 Erhebung und Beurteilung von klinischen Parametern am Euter.....	41
3.3.7.1 Adspektion des Euters .....	41
3.3.7.2 Palpation des Euters .....	42
3.3.7.3 Beurteilung des Eutersekrets.....	42

3.3.8	Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets.....	43
3.3.9	Bestimmung der Inhaltstoffe und des somatischen Zellgehaltes (SCC) der Milch.	44
3.3.10	Aufarbeitung der Milchproben für die durchflusszytometrische Zellcharakterisierung .....	44
3.3.11	Durchflusszytometrie.....	45
3.3.12	Vitalitätsbeurteilung und Quantifizierung der Milchzellen nach Acridin-Orange/Propidiumiodid-Färbung.....	46
3.3.13	Membranimmunfluoreszenz (MIF) .....	48
3.3.13.1	Vorbereitung der Milchproben für die Milchzellcharakterisierung mittels Membranimmunfluoreszenz .....	48
3.3.13.2	Milchzellcharakterisierung durch Membranimmunfluoreszenz .....	48
3.3.14	Klinische Labordiagnostik.....	51
3.3.15	Progesteron- und Östrogenbestimmung .....	51
3.3.16	Gewinnung von venösem Blut.....	51
3.3.17	Gewinnung von Blutplasma .....	52
3.3.18	Gewinnung von Gewebeproben .....	52
3.3.19	Statistische Verfahren.....	54
4	RESULTATE .....	56
4.1	Systemische Effekte im Rahmen der Modelle zur <i>E. coli</i> - und <i>S. aureus</i> -Mastitis .	56
4.1.1	Rektale Körpertemperatur .....	56
4.1.2	Allgemeinbefinden .....	58
4.1.3	Milchleistung .....	58
4.1.4	Blutbild .....	61
4.1.5	Klinischer Score zur Gesamtbeurteilung des Schweregrades der Mastitis .....	62
4.2	Veränderungen von Milchsekreteigenschaften im Rahmen der Modelle zur <i>E. coli</i> - und <i>S. aureus</i> -Mastitis .....	64
4.2.1	Grobsinnliche Sekretveränderungen.....	64
4.2.2	Somatischer Zellgehalt der Milch (SCC) .....	65
4.2.3	Milchkeimgehalt.....	72
4.2.4	Differentialzellbild der Milch .....	74
4.2.5	Milchinhaltsstoffe .....	79
4.2.5.1	Fett.....	80
4.2.5.2	Eiweiß.....	82
4.2.5.3	Laktose .....	86
4.2.5.4	pH-Wert.....	89
4.2.5.5	Harnstoff.....	92
4.3	Einfluss einer experimentellen Mastitis auf entzündungsrelevante Parameter des Milchdrüsenparenchyms.....	95
4.3.1	Histologische Veränderungen.....	95
4.3.2	Expression entzündungsrelevanter Gene .....	101
5	DISKUSSION .....	105
5.1	Frühe Erreger-Wirts-Interaktionen im Euter sind reproduzierbar nur im Mastitismodell darstellbar .....	105
5.2	Experimentelle <i>E. coli</i> -Infektionen führen invariant zu einer akuten Mastitis .....	108
5.3	Experimentelle <i>S. aureus</i> -Infektionen zeigen heterogene Verläufe.....	113
5.4	Schlussbetrachtungen und Ausblick.....	116
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	119

---

7	SUMMARY .....	122
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	124
9	DANKSAGUNG.....	138

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\delta, \Delta$	Delta
$\kappa$	Kappa
$\mu$	mikro (*10 <sup>6</sup> )
ANOVA	analysis of variance
<i>Aqua dest.</i>	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BPI	Bactericidal permeability inducing Protein
BSA	Bovine serum albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C3b	opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente C3
C5a	opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente C5
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony forming units (Kolonie bildende Einheiten)
Cl	Chlorid
CMT	California Mastitis Test
CpG	Cytosin-Guanosin-Motive
CTL	zytotoxische T-Zellen
CXCL8	Chemokin (Interleukin-8)
$\Delta$	Differenz
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DICC	Differential Inflammatory Cell Count
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
<i>E.c.</i>	<i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et al.ii (und andere)
ETC	Enterotoxine
FACScan <sup>®</sup>	Fluorescence-Activated Cell Scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät der Firma Becton Dickinson, Heidelberg)
Fc	fragment cristalline (kristallisierbarer Antikörperteil, carboxy-terminales Fragment von Immunglobulinen nach Papain-Spaltung)

FL-1, -2, -3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz FL-1=Grünfluoreszenz, 530±15 nm; FL-2=Orangefluoreszenz, 585±21 nm; FL-3=Rotfluoreszenz, >650 nm
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
ggr.	geringgradig
GLUT-1	Glukosetransporter-1
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
GS	Goldstandard
h	hora (Stunde)
hgr.	hochgradig
HSP	Heat Shock Protein (Hitze-Schock Protein)
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule
i.d.R.	in der Regel
i.m.	intramuskulär
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Gammaglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
K	Kalium
k	kilo
l	Liter
LGL	Large Granular Leukocytes
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPL	Lipoprotein-Lipase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
m	milli (*10 <sup>3</sup> )
MAC-1	Macrophage-1 antigen (CD11b/CD18)
Max.	Maximum
mgr.	mittelgradig
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIF	Membranimmunfluoreszenz
min.	Minute(n)
Min.	Minimum
ml	Milliliter



MLST	Multilocus Sequence Typing
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	arithmetischer Mittelwert
n	nano (*10 <sup>-9</sup> )
NAGase	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase
Na	Natrium
nm	Nanometer
n =	bei Berechnung des Mittelwertes die Anzahl der Einzelbeobachtungen
NaCl	Natriumchlorid
n.u.	nicht untersucht
o.b.B.	ohne besonderen Befund
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
PAF	platelet activating factor
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Molekulare Muster von Erregern)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
Pellet	Bodensatz; hier: durch Zentrifugation sedimentierte Zellen
PGN	Peptidoglykan
p.i.	post infectionem
PI	Propidiumiodid
PMN	Polymorphonuclear Leukocytes (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
p.p.	post partum
PRR	pattern recognition receptor (Muster-Erkennungsrezeptor)
Ref.	Referenz
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
SAK	Staphylokinase
<i>S.a.</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	subkutan
SCC	Somatic Cell Count (Somatische Zellen in der Milch)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
sog.	sogenannte(r)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan <sup>®</sup>
ST	sequence type
Stabw.	Standardabweichung
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
TLR	toll-like-receptor (Toll-ähnlicher-Rezeptor)
T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2	Bezeichnet den Phänotyp einer T-Helfer-Zelle 1 oder 2

---

TLR	Toll-like-Receptor (Toll-like-Rezeptor)
TMR	Totale Mischraktion
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tumornekrosefaktor)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VLDL	very low density lipoproteins
$\tilde{x}$	Median
$\bar{x}$	Mittelwert
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 1 Einleitung

Die Mastitis des Rindes stellt weltweit die teuerste Einzeltierkrankung in der Milchviehhaltung dar (Bradley *et al.*, 2007). Etwa 30% der Milchkühe erkranken jährlich an einer Mastitis, wodurch hohe Kosten bzw. Verdienstaufschläge entstehen (Seegers *et al.*, 2003). Zu den wichtigsten Mastitiserregern gehört *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), welcher vor allem schwer zu therapierende, subklinische bis chronische, jedoch im Verlauf milde Mastitiden verursacht. Diese Infektionen verursachen etwa 80% der wirtschaftlichen Gesamtschäden in Deutschland. Außerdem stellen *S. aureus*-Problembetriebe im Hinblick auf Antibiotika-Rückstände in der Milch ein Risiko für die Lebensmittelsicherheit dar (Tenhagen *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu werden durch *Escherichia coli* (*E. coli*) häufig akute klinische Mastitiden hervorgerufen. Sie sind oft nur unbefriedigend oder nicht therapeutisch zu beeinflussen und treten speziell im peripartalen Zeitraum auf. Mastitiden, die durch *E. coli* ausgelöst werden, verursachen in diesem Zeitraum oftmals schwere Allgemeinerkrankungen, die auch zum Tod des Tieres führen können (Smith & Hogan, 1993).

Bisher werden in der Praxis vor allem die klinische Untersuchung, die somatische Zellzahl und die elektrische Leitfähigkeit der Milch zur Mastitisdiagnostik herangezogen (Hamann, 1999). Darüber hinaus können im Labor NAGase-Aktivität, Na- und Cl-Ionenbestimmung nebst bakteriologischer Analyse vorgenommen werden, um den Verdacht auf Mastitis zu erhärten (Kruif *et al.*, 1998). Bei der bakteriologischen Untersuchung dauert es zwischen 24 und 48 Stunden bis ein Ergebnis vorliegt. In manchen Fällen werden keine Erreger nachgewiesen, obwohl klinische Anzeichen einer Mastitis vorhanden sind (Riollet *et al.*, 2000). Die elektrische Leitfähigkeit findet häufig Anwendung in der Praxis; sie wird jedoch von vielen Faktoren (Laktationsstadium, Fütterung und Rasse) beeinflusst. Daher muss die Interpretation der Ergebnisse vorsichtig vorgenommen werden.

Behandlungs- und Heilungschancen von Mastitiden hängen stark von dem verursachenden Pathogen und von gezielten Gegenmaßnahmen ab. Deshalb ist eine frühe Erkennung ausschlaggebend.

Der „differential inflammatory cell count“ (DICC) mittels Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Mastitis in der initialen Phase zu erkennen. Hierbei werden die verschiedenen Populationen von Entzündungszellen bestimmt und quantifiziert (Koess & Hamann, 2008). Der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellpopulationen ändert sich bereits bei Zellzahlen unter 50.000/ml. Ein niedriger Gehalt an somatischen Zellen kommt im gesunden, wie auch

im kranken Euterviertel vor. Die Unterscheidung der beteiligten Zellpopulationen ist deshalb sensitiver, um eine Entzündung zu erkennen (Rivas *et al.*, 2001). Hierzu wurden in der Vergangenheit Untersuchungen durchgeführt, die auf Pathogen-abhängige Veränderungen hinweisen sollten (Leitner *et al.*, 2000).

Milchinhaltstoffe, wie Fett, Eiweiß und Laktose, kommen ebenfalls für die Mastitisdiagnostik in Frage. Der Fettgehalt der Milch sinkt bei Eutererkrankungen, ebenso wie der Laktosegehalt (McFadden *et al.*, 1988). Dabei ist das Ausmaß der Veränderungen abhängig von der Dosis und der Art des Pathogens (Lohuis *et al.*, 1988).

Die vorliegende Dissertation ist Teil eines Forschungsnetzwerkes zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen im Euter (DFG-Forschergruppe FOR 585) und hatte 3 Ziele: Hauptziel dieses Dissertationsprojektes war die Etablierung zweier stark unterschiedlicher Mastitismodelle für die akute bzw. die subklinisch-chronische Verlaufsform. Hierfür wurden bezüglich der Mastitisätiologie die äußerst relevanten Erreger *E. coli* bzw. *S. aureus* ausgewählt. Diese beiden Modelle dienen als Grundlage für eigene Analysen wichtiger regulatorischer und resultierender Veränderungen bei Wirt und Erreger in der Frühphase der Mastitis. Außerdem sollten die In-vivo-Versuche auch Probenmaterial für kooperierende Institute innerhalb der Forschergruppe liefern.

Als weiteres Ziel sollte ein schnelles und einfaches Durchflusszytometrieverfahren für die Differenzierung von Milchzellsubpopulationen etabliert werden.

Ein drittes Ziel dieses Dissertationsprojektes war es, Milchinhaltstoffe und deren Veränderungen auf ihre Eignung zur Mastitis-Früherkennung zu überprüfen. Kombiniert mit den Milchzellsubpopulationen sollten erregerabhängige Muster erkannt und dem jeweiligen Pathogen zugeordnet werden.

## 2 Literaturteil

### 2.1 Die Mastitis des Rindes

#### 2.1.1 Definition

Die Mastitis des Rindes stellt eine meist infektiös bedingte Entzündung der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden, speichernden und ableitenden Teilbereiche dar. Sie gehört zu den verlustreichsten und teuersten Einzeltierkrankungen weltweit (Fourichon *et al.*, 2001). Bei einer klinischen Mastitis liegt der durchschnittliche Produktionsausfall bei 5% der Leistung einer Laktation (Seegers *et al.*, 2003). Der Verlauf der Mastitis kann in akut oder chronisch sowie klinisch oder subklinisch eingeteilt werden. Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG, 1994) hat die Eutergesundheit in vier Kategorien eingeteilt. Bei einem Zellgehalt (SCC, somatic cell count) von unter 100.000 Zellen/ml Milch und einem bakteriologisch negativen Befund der Milch ist das Sekret als normal anzusehen. Eine latente Infektion liegt vor, wenn sich die Zellzahl in der Norm bewegt, jedoch Mastitiserreger nachweisbar sind. Werden gleichzeitig Pathogene und ein erhöhter SCC (>100.000 Zellen/ml) im Viertelanfangsgemelk festgestellt, handelt es sich um eine Mastitis. Sind mehr als 100.000 Zellen/ml vorhanden und keine Erreger nachweisbar, handelt es sich um eine unspezifische Mastitis. Die Beurteilung der mikrobiologischen Befunde sowie des Zellgehaltes bezieht sich hierbei ausschließlich auf Viertelanfangsgemelksproben. Eine eindeutige Trennung zwischen einer gesunden und einer erkrankten Milchdrüse ist dennoch nicht immer möglich. Die Zellzahlgrenze beruht auf Untersuchungen von Viertelanfangsgemelken bei Erstkalbinnen mit ungeschädigten Eutern (Hess & Egger, 1969; Reichmuth, 1975; Doggweiler & Hess, 1983). Laut Hamann und Fehlings (2002) treten Mastitiden in unterschiedlichen Verlaufsformen sowie mit verschiedensten klinischen Symptomen auf. So wird eine Euterentzündung ohne äußerlich erkennbare Symptome als subklinische Mastitis bezeichnet. Die Zellzahl ist erhöht, und Mastitiserreger können nachgewiesen werden. Treten zusätzlich Flocken im Anfangsgemelk der Milch auf, handelt es sich um eine geringgradige klinische Mastitis. Weitere Entzündungssymptome am Euter und systemische Veränderungen fehlen jedoch. Bei einer mittel- bis hochgradigen klinischen Mastitis sind äußerlich sichtbare Entzündungssymptome des Euters, wie Schwellung, Schmerz und erhöhte Temperatur, gegenüber den nichtbetroffenen Vierteln festzustellen. Die Milch ist makroskopisch verändert, bakteriologisch positiv, und die Körpertemperatur der

Tiere steigt häufig an. Ein langfristiges Krankheitsgeschehen wird als chronische Mastitis bezeichnet. Oftmals kommt es zu keiner vollständigen Ausheilung.

Der klinische Verlauf einer Mastitis ist bekanntermaßen sehr unterschiedlich. Er wird durch Erreger-, Wirts- und Umweltfaktoren beeinflusst (Park *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Pathogenese

Die häufigsten Mastitiserreger sind Bakterien, gefolgt von Pilzen (vor allem Hefen) und Algen (Prothoteken) (Bradley & Green, 2001). Bei einer Mastitis passieren pathogene Mikroorganismen den Strichkanal und vermehren sich in der Milchdrüse (Bannerman *et al.*, 2004). Laut DVG (1994) werden Mastitiserreger nach ihren jeweiligen Reservoiren eingeteilt. Bei den sogenannten „Kuh-assoziierten Erregern“, wie z.B. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*) oder *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*), stellt die infizierte Milchdrüse das Reservoir dar. Eine Übertragung der Erreger erfolgt vor allem durch den Melker oder die Melkmaschine während der Melkzeit. Sie repräsentieren etwa 80-90% aller subklinischen Fälle (Tolle, 1982).

Bei „Umwelt-assoziierten Erregern“, wie z. B. *Escherichia Coli* (*E. coli*), *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) oder *Klebsiella*, stellt die direkte Umgebung der Kuh das Reservoir dar. Das Infektionsrisiko liegt hier vor allem in den Zwischenmelkzeiten.

Durch traumatische und chemische Einflüsse kann das Risiko einer Erkrankung erhöht werden, weshalb man bei der Mastitis des Rindes auch von einer multifaktoriellen Erkrankung spricht. Sie wird sowohl durch das Pathogen, als auch durch Umwelt- und Managementfaktoren beeinflusst (Hamann & Fehlings, 2002; Hogan & Smith, 2003; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Durch koliforme Keime und *Arcanobacterium pyogenes* werden hauptsächlich klinische Mastitiden verursacht (Wiesner & Ribbeck, 2000). Streptokokken und Staphylokokken sind neben den subklinischen Infektionen mit bis zu 30% auch für klinische Mastitiden verantwortlich (Lam *et al.*, 1996; Pyorala & Pyorala, 1997).

Das höchste Risiko für die Entstehung von Mastitiden stellen die Trockenstehphase und der peripartale Zeitraum dar, was auf hormonelle und metabolische Veränderungen in der peripartalen Phase zurückzuführen ist. Die Bedeutung erhöhter Plasmaketonkörper (Suriyasathaporn *et al.*, 2000a) sowie die immunmodulatorische Kompetenz der peripartal

stark veränderlichen Steroidhormone, wie Östrogene, Progesteron und Kortikosteroide, werden in diesem Zusammenhang diskutiert (Wessendorf *et al.*, 1998; Scheibl & Zerbe, 2000). In den ersten Tagen nach der Kalbung ist die Anfälligkeit für Mastitiden besonders groß und deren Verläufe besonders folgenschwer (Pyorala, 2008). Die Milchzellzahl hat ebenfalls Einfluss auf das Mastitisrisiko. So sollen niedrige Zellzahlen der Milch die Anfälligkeit des Euters gegenüber Umwelterregern erhöhen (Suriyasathaporn *et al.*, 2000b).

Die häufigsten bovinen Mastitiserreger stellen *S. aureus* und *E. coli* dar (Barkema *et al.*, 1998). *E. coli* gehört zur Familie *Enterobacteriaceae* und ist ein gram-negatives, Laktosefermentierendes, säurebildendes, stäbchenförmiges Bakterium (Hahn *et al.*, 2005). Die bei Kühen mit klinischen Mastitiden isolierten Serotypen der *E. coli*-Bakterien gehören zu einer weiten Bandbreite an serologischen Gruppen, während enteropathogene und bakteriämische Stämme eine geringe Anzahl an *E. coli*-Serotypen aufweisen. Die Serotypen, die aus Mastitismilch isoliert wurden, gleichen denen in *Faeces* (Burvenich *et al.*, 2003). Infektionen mit koliformen Erregern entstehen hauptsächlich durch das Eindringen von Keimen über den Strichkanal und die anschließende Vermehrung in den Hohlräumen der Milchdrüse. *E. coli* besitzt außerdem die Fähigkeit sich in Milch zu vermehren. Hierzu ist die Fähigkeit zur Laktoseverwertung eine wichtige Voraussetzung. Außerdem sind die Erreger in der Lage, andere Milchhaltsstoffe zu verstoffwechseln. Eine intramammäre Infektion mit *E. coli* ist weder von besonderen Virulenzfaktoren noch von einer speziellen Adhärenz am Epithel der Milchdrüse abhängig (Opdebeeck *et al.*, 1988). Die Schwere der klinischen Symptome scheint mit der Keimzahl in der Milch zu korrelieren (Hogan & Larry Smith, 2003; Wenz *et al.*, 2006). Eine hämatogene Besiedlung des Euters ist ebenfalls möglich (Wendt *et al.*, 1994). In den ersten zwei Monaten der Laktation treten ca. 65% aller koliformen Mastitiden auf. Sie sind vermutlich auf eine Infektion während der Trockenstehphase zurückzuführen (Smith *et al.*, 1985). In einer Studie von Bradley (2001) wurde sogar eine Persistenz von *E. coli* im Euter nachgewiesen. Eine Vermehrung des Erregers im Sekret einer Milchdrüse in Rückbildung kann nur begrenzt stattfinden. Es fehlt das Eisen, welches in der Trockenperiode in hohen Konzentrationen gebunden als Laktoferrin vorliegt und damit als nutritive Grundlage den Bakterien nicht mehr zur Verfügung steht (Welty *et al.*, 1976).

*E. coli* verursacht fast ausschließlich akute Mastitiden mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden. Eine Endotoxinämie infolge einer schwerwiegenden intramammären Infektion mit *E. coli* kann in einzelnen Fällen zum Tod des Tieres führen. Durch die

Freisetzung von LPS kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , was wiederum eine Störung des Allgemeinbefindens zur Folge hat. In der Laktation dauert eine unbehandelte, durch *E. coli* bedingte Mastitis etwa zehn Tage (Todhunter *et al.*, 1991). Sie wird durch die Gabe von Antibiotika nicht wesentlich verkürzt (Smith *et al.*, 1985). Ebenso wie das rasche Auftreten findet aber auch oftmals eine zügige Heilung statt (Hogan & Smith, 2003). Bei wiederkehrenden Erkrankungen wurden euteradaptierte *E. coli*-Stämme sowohl gleicher Serotypen (Linton & Robinson, 1984) als auch Genotypen (Lipman *et al.*, 1995; Bradley & Green, 2001) isoliert. Nach Hill (1983) verursachen kapselproduzierende *E. coli*-Stämme länger anhaltende Euterinfektionen gegenüber den Stämmen, die keine Kapselbildung aufweisen.

*S. aureus* ist der häufigste Auslöser der Mastitis beim Rind (de Haas *et al.*, 2004). Er ist ein gram-positives, kugelförmiges Bakterium, welches häufig in Traubenform angeordnet ist (sog. Haufenkokken). Die als Komensalen auf Haut und Schleimhäuten vorkommenden Bakterien gehören zu den fakultativ pathogenen Keimen. Für die Pathogenität sind verschiedene Virulenzfaktoren verantwortlich (Blobel *et al.*, 1980; Kerro Deگو *et al.*, 2002). Eine Infektion wird durch die Bildung anti-phagozytischer Faktoren (Polysaccharidkapsel, Protein A) begünstigt (Sutra & Poutrel, 1994; Hensen *et al.*, 2000). Eine Ansteckung mit *S. aureus* kann neben der Übertragung von Tier zu Tier, über das Melkgeschirr, den Melker und auch über Wunden am Euter oder an den Zitzen stattfinden. Außerdem kann *S. aureus* den Strichkanal aktiv passieren, wodurch eine galaktogene Infektion begünstigt wird (Hoedemaker *et al.*, 2001). Die Fähigkeit, in verschiedenen Zellen zu überleben und somit dem Immunsystem zu entkommen, ist für die Persistenz der Erreger essentiell. *S. aureus* kann an Epithelzellen des Euters adhären, in diese eindringen, sich in ihnen vermehren und persistieren (Cifrian *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 1996; Hensen *et al.*, 2000). Außerdem besitzt *S. aureus* die Fähigkeit in Makrophagen zu überleben (Hebert *et al.*, 2000). Eine Erkennung von *S. aureus* durch Zellen des Immunsystems wird mit Hilfe eines Fibrinwalls, welcher durch Koagulase und den Clumpingfaktor ausgebildet wird, verhindert. Mittels der Hyaluronidase, DNase, Lipase und dem Hämolyisin ist *S. aureus* im Stande interzelluläres Bindegewebe und Parenchymzellen zu lysieren und invasiv in den Wirtsorganismus vorzudringen. Zelluläre Bestandteile der Immunantwort (Granulozyten und Makrophagen) werden mit Hilfe von Leukozidinen geschädigt. Weitere Pathogenitätsfaktoren sind Leukolysine sowie die Zellwandbestandteile Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PGN) (Morath *et al.*, 2002a). Obwohl der Wirkmechanismus einzelner Virulenzfaktoren



bereits bekannt ist, sind ihr Zusammenspiel und ihre Regulation bisher wenig verstanden (Novick, 2003).

Im Gegensatz zur intramammären Infektion mit *E. coli* verlaufen die durch *S. aureus* hervorgerufenen Mastitiden meist weniger schwer, führen jedoch sehr häufig zu chronischen, bisweilen lebenslangen Infektionen (Sutra & Poutrel, 1994). In diesen Fällen kommt es nicht selten zu subklinischen Mastitiden, die im Gegensatz zu den klinisch manifesten Verlaufsformen nicht durch eine grobsinnliche Symptomatik, jedoch durch bakteriologisch positive Befunde und erhöhte Milchzellzahlen gekennzeichnet sind (Hamann & Fehlings, 2002). Betroffene Tiere stellen somit ein ständiges Erregerreservoir in der Herde dar (Roberson *et al.*, 1994).

## 2.2 Experimentelle Mastitismodelle

Schon seit mehreren Jahrzehnten werden modellhafte Untersuchungen zu pathogenetischen Fragestellungen und Erfolgsaussichten prophylaktischer sowie therapeutischer Ansätze bei der Mastitis des Rindes durchgeführt (Schalm *et al.*, 1964). In einem Modell können Ausgangsbedingungen bewusst vorgegeben werden, die beim spontan erkrankten Patienten nur schwer zu interpretieren und kontrollieren sind. Die Modellgrenzen sind für die Qualität des Tiermodells entscheidend.

Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der Tiere und der Euterviertel stellt die Zellzahl in der Milch dar. In der Praxis ist der SCC ein wichtiger Indikator für die Eutergesundheit (Pyorala, 2002). Die Angaben über präexperimentelle SCC-Werte variieren von <20.000 bis <600.000 somatischen Zellen/ml für *S. aureus* (Hensen *et al.*, 2000; Ebling *et al.*, 2001) und <30.000 bis <500.000 für *E. coli* (Scaletti *et al.*, 2003; Bannerman *et al.*, 2004). Üblicherweise liegt die obere Grenze jedoch zwischen <150.000 und <250.000 somatischen Zellen/ml (Lohuis *et al.*, 1990; Kremer *et al.*, 1993; Kornalijnslipjer *et al.*, 2003; Persson Waller *et al.*, 2003; Vangroenweghe *et al.*, 2004), zum Teil fehlen aber auch jegliche Angaben (Barrett *et al.*, 1997; Tomita *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 2004). Bereits ab einem Wert von >100.000 Zellen/ml ist von einer entzündlichen Reaktion auszugehen (Hess & Egger, 1969; Reichmuth, 1975; Doggweiler & Hess, 1983). Petzl (2005) beobachtete bereits bei einem SCC-Wert <100.000 Zellen/ml interindividuelle Unterschiede im Differentialzellbild der Milch. Auch Koess (2004) konnte feststellen, dass sich das Differentialzellbild in der Milch bereits ab 50.000 Zellen/ml zugunsten der PMN verschiebt.

Auch zu Bakterienstamm und Infektionsdosis sind unterschiedliche Angaben zu finden. Die Wahl des Bakterienstammes für die experimentelle *E. coli*-Mastitis scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen, da es sich hier um ubiquitär vorkommende Umweltkeime handelt, die über die *Faeces* der Tiere ausgeschieden werden und als Opportunisten eine Infektion jederzeit möglich machen. Die Infektionsdosis betrug in den bisherigen Mastitis-Modellen zwischen 30 und 10.000 CFU/Euterviertel (Kornalijnslijper *et al.*, 2003; Vangroenweghe *et al.*, 2004). In den meisten Modellen wurde die natürliche Barriere des Strichkanals umgangen und direkt intrazisternal infiziert. Es sind entsprechend der Fragestellungen jedoch auch Versuchsanordnungen bekannt, bei denen die Erreger lediglich mit der Zitzenhaut in Berührung gebracht wurden (Boddie & Nickerson, 2002; Leslie *et al.*, 2005). In den meisten Untersuchungen wird angegeben, dass die eingesetzten Euterviertel bei ein- oder mehrmaliger Voruntersuchung frei von den gängigen bakteriellen Mastitiserregern waren. In dem von Petzl (2005) etablierten Mastitis-Modell wurde auch nach der Infektion eine bakteriologische Analytik der Milch der infizierten Milchdrüse mitgeführt.

Die Angaben über Infektions- und Beobachtungsdauer differieren von 72 Stunden bis zu 48 Tagen für *S. aureus* (Shoshani *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2004) und von 96 Stunden (Kornalijnslijper *et al.*, 2003) bis zu 21 Tagen (Lohuis *et al.*, 1990) für *E. coli*.

Die Resultate verschiedener Mastitismodelle sind nur bedingt vergleichbar. Außerdem fällt bei der Analyse bisheriger Modelluntersuchungen auf, dass die Voruntersuchung und Auswahl der Tiere auf sehr unterschiedlichem Niveau stattfand. In den selteneren Fällen wurden die Versuchstiere streng nach Laktationszeitpunkt, Anzahl bisheriger Laktationen, niedrigen SCC-Zahlen und wiederholt bakteriologisch negativen Befunden ausgewählt (Schukken *et al.*, 1999). Meist wurde nur ein Parameter oder ein Teil der genannten Kriterien berücksichtigt.

Die eingesetzten Mastitismodelle wurden zur Bearbeitung unterschiedlichster Problemstellungen herangezogen, wie bspw. Effekte auf die Milchleistung, den klinischen Verlauf der Erkrankung, die Bakterienvermehrung und die SCC-Zahlen. Dazu kommt eine ganze Reihe von Messparametern auf der Ebene humoraler oder zellulärer Immunkomponenten in der Milch und im peripheren Blut, wie die Funktionalität und der Immunphänotyp von Blut- und Milchleukozyten als auch Zytokinprofile und Enzymaktivitäten in Serum und Milch. Mastitismodelle dienen weiterhin zur Evaluierung von Vakzinierungs- (Tomita *et al.*, 1998) und Therapiekonzepten (Kutilla *et al.*, 2003; Persson

Waller *et al.*, 2003) sowie zur Analyse von genetischen Einflüssen auf das Mastitisrisiko (Schukken *et al.*, 1994).

### **2.3 Immunrelevante Zellen der Milch**

Zwei ineinander greifende komplexe Systeme bilden die Grundlage der Abwehr in der Milchdrüse. Sie werden als „unspezifisch/angeboren“ und als „spezifisch/erworben“ bezeichnet. Das Zusammenspiel dieser Systeme gewährleistet eine effektive Neutralisation und Elimination der Pathogene. Das angeborene Immunsystem ist darauf ausgerichtet, Erreger zu beseitigen. Die entsprechenden Zellen benötigen keine vorausgehende Erregerexposition, um aktiviert zu werden. Pathogene können dabei über zellständige oder lösliche Rezeptoren erkannt werden (Holländer, 2006). Eine große Anzahl an Erregern wird anhand ihrer konservierten Muster (PAMPs, engl.: pathogen associated molecular patterns) erkannt. Zu diesen Mustern gehören unter anderem Zellwandbestandteile, Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan (PGN) oder auch Lipoteichonsäure (LTA) (Goldammer *et al.*, 2004). Mit Hilfe der PAMPs ist das angeborene Immunsystem in der Lage, mit einem vergleichsweise limitierten Repertoire an wirtsspezifischen Erkennungsmechanismen auf ein breit gefächertes Erregerspektrum zu reagieren (Bannerman *et al.*, 2003). Im Bedarfsfall werden auch antigenspezifische Effektorzellen des spezifischen Immunsystems rekrutiert. Bei bakteriellen Infektionen kommt den Zelltypen der Immunabwehr, welche das Pathogen erkennen und nach dessen Bindung modulierende Signale aussenden, große Bedeutung zu (dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Epithelzellen). Durch diese Signalgebung werden maßgebliche Effektorzellen rekrutiert, von denen neben Makrophagen die neutrophilen Granulozyten die wichtigste Population im Falle einer Infektion des Euters darstellen.

#### **2.3.1 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten (PMN, engl.: polymorphonuclear cells) werden im Knochenmark aus Stammzellen gebildet und durchlaufen verschiedene Entwicklungsstufen (Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, mikrobielle Erreger zu phagozytieren und abzutöten. Sie gelten als Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems bei bakteriellen Infektionen der Milchdrüse (Paape *et al.*, 2003). Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, wie Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin-3 und Granulozyten-Kolonie-stimulierender

Faktor (G-CSF), sind für die Bildung und Entwicklung der neutrophilen Granulozyten nötig. Anfangs besitzen sie einen länglichen Zellkern, der nicht segmentiert ist und werden stabkernige neutrophile Granulozyten genannt. Mit zunehmender Reifung der Zelle teilt sich der Zellkern in mehrere über Chromatinstege verbundene Segmente (Liebich, 1993). Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren die PMN im Blutstrom, wobei sie besonders im Kapillargebiet engen Kontakt zum Endothel haben. Dieser Kontakt zu Endothelzellen wird über Adhäsionsmoleküle vermittelt.

Bovine neutrophile Granulozyten sind denen anderer Spezies sowohl morphologisch als auch funktionell ähnlich, jedoch nicht identisch. Sie bilden mit 25-45% neben den Lymphozyten die zweitstärkste Fraktion des Differentialblutbildes (Tizard, 2004). Sie sind 9-16 µm groß und durch ihren gelappten Zellkern aus zwei bis fünf untereinander verbundenen Segmenten gekennzeichnet. Diese Lappung gestattet den Granulozyten schnell durch endotheliale Barrieren zu migrieren (Paape *et al.*, 2003). Das Zytoplasma enthält drei unterschiedliche Typen von Granula, welche Proteine zur Tötung von Bakterien enthalten. Die als azurophile Granula bezeichneten primären Granula enthalten Enzyme wie Hydrolasen, Lysozym, Proteinasen, Myeloperoxidasen und Histaminasen. Diese Moleküle besitzen alle eine mikrobizide Wirkung (Rausch & Moore, 1975). Die sekundären Granula werden auch spezifische Granula genannt und entstehen in der myelozytären Phase (Jain, 1967; Bainton *et al.*, 1971). Sie enthalten zudem noch Lactoferrin und Kollagenasen. Zusätzliche Granulainhaltsstoffe stellen Indolicin und  $\beta$ -Defensin dar (Selsted *et al.*, 1992b; Selsted *et al.*, 1992a). Bei den domestizierten Wiederkäuern, wie Schaf, Ziege und Rind, ist noch ein weiterer Typ von Granula vorhanden (Gennaro *et al.*, 1983). Diese Granula sind deutlich größer als die beiden anderen Typen und stellen beim Rind den größten Anteil dar (Baggiolini *et al.*, 1985). Sie enthalten unter anderem anti-mikrobielle Proteine (z.B. Lactoferrin) und kationische Polypeptide, sogenannte Baktenezine (Romeo *et al.*, 1988). Zusätzlich sind in diesen Granula sauerstoffunabhängige bakterizide Substanzen wie  $\beta$ -Defensine enthalten. Ihr Wirkspektrum umfaßt sowohl gram-positive, gram-negative und anaerobe Bakterien sowie Pilze und Viren (Savoini *et al.*, 1984).

Granulozyten sind die Immunzellen, die als erste am Ort eines Infektionsgeschehens erscheinen. Durch Entzündungsmediatoren (u.a. Chemokin (CXCL8), Leukotrien B4 (LTB<sub>4</sub>), Komplementkomponente (C5a)) werden auf den Gefäßendothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert und neutrophile Granulozyten chemotaktisch angelockt. Im

Entzündungsgebiet wird die Geschwindigkeit der PMN im Blutstrom bei der Annäherung an aktiviertes Endothel abgebremst (Margination). Die darauffolgende Extravasation setzt eine Interaktion zwischen verschiedenen Adhäsionsmolekülen von PMN und den Zellen des Gefäßendothels voraus (Smith & Anderson, 1991). Bei der Transmigration durchstoßen die PMN die Basalmembran mit Hilfe proteolytischer Enzyme und gelangen entlang eines Konzentrationsgradienten von Entzündungsmediatoren in das betroffene Gewebe. PMN erkennen Pathogene in erster Linie über Toll-like-Rezeptoren (TLR). Bei den TLR handelt es sich um so genannte Mustererkennungsmoleküle (PRR, engl.: pattern recognition receptors) des natürlichen Immunsystems. Bei einer Infektion werden diese Rezeptoren auf der Oberfläche oder im Zytoplasma exprimiert und stimulieren die Zelle zur antimikrobiellen Abwehr. PMN können prinzipiell alle TLR exprimieren, außer TLR3 (O'Mahony *et al.*, 2008). In Folge einer Bindung von Antigen an TLR werden Gene exprimiert, welche direkt bei der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Hierzu gehören TNF- $\alpha$ , IL-1, CXCL8, IL-12, E-Selektin (CD62E) und unterschiedliche Proteine, die beim Abtöten von intrazellulär gelegenen Mikroorganismen eine wesentliche Rolle spielen.

Aktivierte Granulozyten im Blut können jeweils bis zu zwanzig Bakterien töten und phagozytieren. In der Milch hingegen ist diese Leistung herabgesetzt, da die Zellen 38% weniger Glykogenreserven haben als Blut-PMN (Newbould, 1973). Zudem benötigen sie für die Phagozytose eine große Membranfläche zur Bildung von Pseudopodien, die die Bakterien fangen und umschließen sollen. Durch die Aufnahme von Milchfettglobuli und Kasein wird die Membran internalisiert und somit die Phagozytoseleistung reduziert (Paape *et al.*, 1975; Paape & Guidry, 1977). Pathogene werden mit Hilfe reaktiver Sauerstoffmetaboliten und bakterizider lysosomaler Enzyme nach Verschmelzung der Phagosomen mit den Lysosomen zu Phagolysosomen inaktiviert (Karnovsky & Badwey, 1986; Belaouaj *et al.*, 1998). Ein großer Teil der Metaboliten, welcher von bovinen Granulozyten gebildet wird, gelangt durch Exozytose auch in das umliegende Gewebe (Leino & Paape, 1993). Eine längere Exposition durch Neutrophile resultiert in erheblichen Schäden am sekretorischen Epithel, welche zur dauerhaften Reduktion der Milchproduktion führen (Sordillo & Babiuk, 1991). Deswegen ist eine rasche Elimination der PMN nach erfolgter Neutralisation der Bakterien durch die Makrophagen sehr wichtig, um die Schäden in der Milchdrüse zu minimieren.

### 2.3.2 Makrophagen

In der Literatur werden in der gesunden involuten und laktierenden Milchdrüse Makrophagen als dominierende Zellpopulation beschrieben (Jensen & Eberhart, 1981; Sordillo *et al.*, 1987a). Bei den Makrophagen handelt es sich in der Regel um organständige Effektorzellen. Sie sind in vielen Geweben angesiedelt und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zu phagozytieren aus. Die im Knochenmark gereiften Monozyten gelten als Vorläuferzellen der Makrophagen. Sie wandern in die Blutgefäße und zirkulieren mit dem Blutstrom durch den Körper. Bei Infektionen sind sie in der Lage, in das betroffene Gewebe einzuwandern. Dort differenzieren sie sich unter Einfluss von Zytokinen und Erreger-Substanzen in Makrophagen (Tizard, 2004). Makrophagen enthalten eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, wie Lysozym,  $\beta$ -Glucuronidase, saure Phosphatase, Kathepsin, Hydrolasen, Esterproteasen, neutrale Proteasen, Ribonucleasen und Lipasen. Diese können als Antwort auf verschiedenen Signale an den Fc- und Komplement-Rezeptoren sezerniert werden. Makrophagen besitzen spezifische Rezeptoren für IFN- $\gamma$ , IL-4, GM-CSF und TNF- $\alpha$ . Makrophagen selbst sind in der Lage proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, CXCL8, GM-CSF und TNF- $\alpha$ ) zu sezernieren. Diese fördern die Mobilisation von Neutrophilen aus dem Knochenmark und deren Anlockung. Außerdem bewirken diese Zytokine die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, die am Infektionsort die Opsonisierung und die Elimination der Erreger fördern.

Makrophagen sind aktiv phagozytierende Zellen der Milchdrüse (Sordillo & Streicher, 2002). Makrophagen sind in der Lage PAMPs über Mannose-Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren, CD14 und Toll-like-Rezeptoren zu erkennen. Die Expressionsstärke der TLRs kann über Zytokine (z.B. IFN- $\gamma$ , GM-CSF) deutlich gesteigert werden (O'Mahony *et al.*, 2008). Für die indirekte Erkennung von Erregern verfügen Makrophagen über Komplement- und Fc-Rezeptoren. Die Phagozytoseleistung der Makrophagen kann durch opsonierende Antikörper und nach Komplementaktivierung bedeutend erhöht werden (Sordillo & Streicher, 2002). Makrophagen sind in der Lage, Zelldebris und Milchkomponenten zu verdauen (Sordillo *et al.*, 1987a). Allerdings wird durch die Aufnahme von Fett, Kasein und anderen Milchkomponenten die Erreger-Phagozytose verringert (Paape *et al.*, 1975; Paape & Guidry, 1977). Im peripartalen Zeitraum sind die phagozytotische und die bakterizide Leistung herabgesetzt (Weber *et al.*, 1983). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die opsonisierende Aktivität dieses Milchserums herabgesetzt ist (Waller, 2000). Die Anzahl der Makrophagen im Infektionsgeschehen ist sehr gering, so dass ihnen eine geringere Bedeutung als den Neutrophilen bei der Phagozytose in der Milchdrüse zukommt. Wahrscheinlich hat die

Fähigkeit, die Migration und bakterizide Aktivität der neutrophilen Granulozyten zu fördern, eine größere Bedeutung (Van Kampen & Mallard, 1997; Kehrli *et al.*, 1999).

Als weitere wichtige Funktionen der Makrophagen sind die Elimination von gealterten, zerstörten sowie apoptotischen körpereigenen Zellen und die Gewebeheilung durch Narbenbildung (Granulationsgewebe) und Angiogenese zu nennen.

### 2.3.3 Lymphozyten

Es gibt bereits viele Studien über zelluläre Reaktionen nach intramammärer Infektion. Bisher fokussierten sich diese Arbeiten vor allem auf die unspezifische Immunabwehr in der Milchdrüse. Im Vordergrund stand die Funktion von Neutrophilen und Makrophagen. Die Funktion von Lymphozyten zum Schutz der Milchdrüse gegen Infektionen wurde bisher selten untersucht. In der Milchdrüse und Milch von Wiederkäuern sowie in den Sekreten von Trockenstehern kommen Lymphozyten in signifikanter Anzahl vor (Sordillo & Nickerson, 1988; Park *et al.*, 2004). Lee *et al.* (1970) konnten zeigen, dass die Größe dieser Zellpopulation entscheidend für die Entwicklung einer effektiven Immunantwort nach intramammärer Infusion von Bakterien war.

$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten exprimieren einen T-Zellrezeptor der aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette besteht. Beim Rind exprimieren reife T-Zellen entweder den Co-Rezeptor CD4 oder CD8 (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen). CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gelten funktionell in der Regel als T-Helferzellen und besitzen einen Rezeptor, welcher Antigene im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen von speziellen Antigen-präsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) erkennt. Aktivierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen fungieren als zytotoxische T-Zellen. Obwohl diese funktionelle Unterscheidung weitestgehend zutrifft, kennt man ebenso zytotoxische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Helferzellen (Holländer, 2006).

T-Helferzellen zeigen eine funktionelle Dichotomie, indem sie nach Aktivierung eher pro- oder eher anti-inflammatorische Zytokine sezernieren (Brown *et al.*, 1998).

T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$  und IL-2. Dadurch werden Makrophagen aktiviert, und die MHC-Klasse-II-Expression wird gesteigert. Diese Zytokine fördern die Bildung zytotoxischer T-Zellen und die Produktion von Antikörper-Isotypen, die besonders gut Komplement fixieren können. Gleichzeitig hemmen diese Zytokine eine T<sub>H</sub>2-Antwort. Zur Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen kommt es im Rahmen der Antigenpräsentation dann, wenn dendritische Zellen bei der Antigenpräsentation IL-12 sezernieren. Darüber hinaus sind T<sub>H</sub>1-Zellen in der Lage,

Infektionen zu bekämpfen, die durch Bakterien hervorgerufen werden, welche sich in den Vesikeln von Makrophagen vermehren.

T<sub>H</sub>2-Zellen sezernieren vorwiegend TNF- $\beta$ , IL-4 und IL-10. Diese Zytokine hemmen die Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen. Sie fördern besonders den Isotypwechsel bei Antigen-aktivierten B-Zellen und führen zur Bildung vorwiegend neutralisierender Antikörper. Überdies hemmt IL-10 die Aktivierung von Makrophagen.

Die Aktivität CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen (CTL) richtet sich im Allgemeinen gegen infizierte Zellen, Tumorzellen und histoinkompatible Transplantate. Werden zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Bindung an eine MHC-I-tragende Zelle, welche ein fremdes Antigen präsentiert, aktiviert, so schütten sie Perforine und Granzyme aus. Diese induzieren in den MHC-I-tragenden Zellen die Apoptose. Zudem produzieren und sezernieren aktivierte CTL auch IFN- $\gamma$ , welches in vielen anderen Zellen vor allem anti-virale Wirkungen entfaltet und sowohl Makrophagen als auch neutrophile Granulozyten aktiviert.

$\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren einen Antigenrezeptor mit schwach polymorphen  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten. Diese sogenannten  $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen neben den  $\alpha\beta$ -T-Zellen und den B-Zellen die dritte Lymphozytenfraktion dar, die bei Vertebraten nachgewiesen werden konnte. Manche  $\gamma\delta$ -T-Zellen werden anhand ihrer Morphologie als „Large Granular Leukocytes“ (LGL) identifiziert. In ihrem Zytoplasma kommen viele Granula vor. Ungeachtet dieser morphologischen Eigenheiten ist der größte Teil der  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten durch ihre Zellform und Größe von konventionellen Lymphozyten nicht zu unterscheiden. Obwohl  $\gamma\delta$ -T-Zellen viele zellständige Moleküle und Effektorfunktionen, einschließlich der Zytokinproduktion und der zytotoxischen Aktivität, mit den  $\alpha\beta$ -T-Zellen gemeinsam haben, gibt es bezüglich der biologischen Eigenschaften etliche bemerkenswerte Unterschiede zwischen diesen beiden Zellgruppen.  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten dienen generell der Überwachung epithelialer Oberflächen (Holländer, 2006). Im Vergleich zu anderen Spezies weisen Rinder einen hohen Gehalt an  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten auf. Im juvenilen Organismus stellen sie bis zu 60% der T-Zellen. Zudem weisen Rind und Schaf eine hohe  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptordiversität auf (Tizard, 2004). Eine Migration dieses Zelltyps, speziell zu epithelialen Geweben wie Haut, Darmmukosa und Milchdrüse, konnte in hoher Frequenz (bis zu 50% der Leukozyten) festgestellt werden (Allison & Havran, 1991; Mackay & Hein, 1991). Besonders bei Wiederkäuern findet man  $\gamma\delta$ -T-Zellen in Milchdrüsensekreten und Milchdrüsengeweben in höheren Anteilen als im Blut (Shafer-Weaver *et al.*, 1996). In der Erkennung von Antigenen unterscheiden sich die  $\gamma\delta$ -



T-Zellen grundlegend von der Antigendetektion bei  $\alpha\beta$ -T-Zellen. Sie binden sofort eine große Vielfalt von Antigenen, ohne diese vorher zu prozessieren oder über das Präsentieren von konventionellen MHC-Molekülen zu erkennen. Sie sind in der Lage einerseits konstitutiv exprimierte Antigene auf körpereigenen Zellen und auf mikrobiellen Erregern zu erkennen. Andererseits detektieren sie induzierte Antigene, die von transformierten, geschädigten und/oder gestressten körpereigenen Zellen exprimiert werden. Hierzu gehören die ubiquitären und phylogenetisch stark konservierten Heat-shock-Proteine (HSP), welche bei Zellstress infolge von Infektionen, Entzündungen und/oder Transformation freigesetzt werden (Holländer, 2006). Sie können zum einen durch ihr zytotoxisches Potential veränderte epitheliale Zellen zerstören (Mackay & Hein, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1999). Zum Beispiel waren unter IL-2-Einfluss kultivierte  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Lage, humane maligne Mammakarzinomzelllinien zu erkennen und zu lysieren (Miescher *et al.*, 1990). Zum anderen spielen  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Abwehr von bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle. Sie vermögen Zytokine zu sezernieren, sowie  $\gamma\delta$ -T- und B-Lymphozyten zu regulieren. Die von den  $\alpha\beta$ -T-Zellen bekannte funktionelle Dichotomie in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -polarisierten Zellen gilt auch für die Population der  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Holländer, 2006).

Durch ihre bevorzugte Lage in unmittelbarer Nähe zu Epithelien sind  $\gamma\delta$ -T-Zellen befähigt, vor allem in der Mukosa eine schnelle Immunantwort gegen Erreger zu leisten. Es konnte gezeigt werden, dass in Phasen erhöhter Mastitisempfindlichkeit der Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen im mammären Parenchym signifikant reduziert war (Shafer-Weaver *et al.*, 1996). Dies lässt vermuten, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine wichtige Rolle in der mammären Infektionsabwehr spielen.

B-Lymphozyten sind als einzige Zellen in der Lage Antikörper zu bilden. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten ist der Anteil B-Zellen während der verschiedenen Laktationsstadien relativ konstant (Shafer-Weaver *et al.*, 1996). Werden B-Zellen durch Antigene aktiviert, können sie sich, entsprechende T-Zell-Hilfe vorausgesetzt, zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen differenzieren. Lösliche Antikörper fungieren als Opsonine und neutralisieren sowohl bakterielle Toxine als auch die Adhäsionsfähigkeit von Bakterien (Targowski, 1983; Concha, 1986; Sordillo *et al.*, 1997). Eine Antikörperproduktion konnte für Plasmazellen aus der Milch nachgewiesen werden (Concha, 1986).

### 2.3.4 Zellzahl und -verteilung in der Milch einer gesunden Milchdrüse

Ein SCC unter 100.000 Zellen pro ml Milch wird als physiologischer Zellgehalt angesehen (Hamann & Fehlings, 2002).

Die Angaben über die Anteile der einzelnen Zellpopulationen variieren in der Literatur sehr stark. So werden für Makrophagen Anteile von 13% bis 95% der Gesamtleukozyten in der Milch beschrieben. Bei den Granulozyten hingegen variieren die Werte zwischen 0% und 37% sowie für lymphoide Zellen zwischen 5% und 28% (Paape *et al.*, 1981; Concha, 1986; Wever & Emanuelson, 1989; Leitner *et al.*, 2000). Auch für die lymphozytären Subpopulationen in der Milch findet man sehr unterschiedliche Angaben (Paape *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004), die darüber hinaus in der peripartalen Zeit stark schwanken (Shafer-Weaver *et al.*, 1996). Die B-Lymphozyten sind in der peripartalen Phase zu 25% vertreten. Ihr Anteil fällt zum Ende der Laktation auf 7% der lymphoiden Zellen ab. Der Anteil der T-Lymphozyten liegt in der peripartalen Phase bei nur 16% der Gesamtlymphozyten und steigt zum Ende der Laktation auf 62% an. Davon repräsentieren  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nur einen kleinen Anteil der Lymphozytenfraktion (Taylor *et al.*, 1997).

$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten sind überwiegend CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Taylor *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2004). Die funktionelle Relevanz der erhöhten Zahl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milch gesunder Tiere ist noch nicht hinreichend geklärt. Es wird vermutet, dass zytotoxische T-Zellen eine das Epithel schützende Funktion besitzen, indem sie MHC-Klasse-I-vermittelt alte oder beschädigte sekretorische Zellen beseitigen (Targowski, 1983). Bisher wurde im Euter jedoch noch keine Aktivität zytotoxischer T-Zellen beobachtet (Mehrzad *et al.*, 2008). Das Verhältnis CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milch gesunder Milchdrüsen liegt bei  $0,8 \pm 0,6$ . Die immunregulatorischen Eigenschaften hängen vom Laktationsstadium ab. In der Mitte der Laktation wiesen die Tiere CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit hoher zytotoxischer Aktivität auf. In der postpartalen Phase war die zytotoxische Aktivität reduziert, während die Expression von IL-4 mRNA (als Anzeichen einer T<sub>H</sub>2-Antwort) hochreguliert war (Shafer-Weaver & Sordillo, 1997). Park *et al.* (1992) und Taylor *et al.* (1997) vermuten einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Mastitisrisiko der peripartalen Phase und dem herabgesetzten CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis. Bisher konnte ihre funktionelle Relevanz noch nicht hinreichend geklärt werden. Des weiteren befinden sich in der Milch Epithelzellen (2%), eosinophile Granulozyten, Monozyten und Plasmazellen, deren zahlenmäßiger Anteil jedoch so gering ist, dass er bei einer quantitativen Betrachtung außer Acht gelassen werden kann (Hamann, 1992).

Der Zellgehalt der Milch ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Mit steigender Laktationszahl erhöht sich auch die Zellzahl, was v.a. durch einen Anstieg an PMN verursacht wird (Burvenich *et al.*, 1994). Auch innerhalb einer Laktation nimmt die Zellzahl zu, wobei hier jedoch eine Zunahme aller Zellarten festgestellt wurde (Doggweiler & Hess, 1983). Das Melkintervall hat ebenfalls einen Einfluss auf die Zellzahl. Melkintervalle von 4 Stunden verursachen einen signifikant höheren Zellgehalt im Viertelanfangsgemelk als Melkintervalle von 12 Stunden (Hamann *et al.*, 1997). Unterschiedliche Rassen, wie Braunvieh, Simmentaler, Fleckvieh und Schwarzfleckvieh, zeigen zwar divergierende Modalwerte für den Zellgehalt, die Differenzen sind aber für die Festlegung eines Grenzwertes zwischen physiologischem und pathologischem Zellgehalt ohne Bedeutung (Doggweiler & Hess, 1983). Stress löst in gesunden Eutervierteln keinen Zellzahlanstieg aus, während in bereits vorgeschädigten Eutervierteln deutliche zytologische Reaktionen beobachtet werden können (Wegner *et al.*, 1976).

Die Bedeutung der Zellpopulationszusammensetzung vor Erregerkontakt ist noch nicht hinreichend geklärt. Ihr Vorhandensein und ihre Zusammensetzung kann als Ausdruck der Aktivität residenter Milchdrüsenepithelzellen oder Makrophagen angesehen werden, die möglicherweise über physiologische Faktoren (z.B. Hormone) gesteuert wird (Suriyasathaporn *et al.*, 2000b).

### **2.3.5 Zellzahl und -verteilung in der Milch nach Infektion der Milchdrüse**

Nachdem das Pathogen die physikalische Barriere des Zitzenkanals überwunden hat, trifft es auf die Milchdrüsenepithelzellen und auf Milch- und Gewebemakrophagen, die Mechanismen des angeborenen Immunsystems initiieren.

Die Frühphase der Immunabwehr der Milchdrüse kann in drei Abschnitte eingeteilt werden:

- 1) Sofortige Elimination des Erregers,
- 2) Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren, insbesondere Chemokine, und
- 3) die Migration von neutrophilen Granulozyten in das infizierte Eutergewebe (Suriyasathaporn *et al.*, 2000a).

Nach dem Eindringen des Erregers durch die Zitze erkennen initial vorhandene Milch- oder Gewebemakrophagen das eingedrungene Pathogen über ihre membranständigen Erregerrezeptoren, insbesondere über Toll-like-Rezeptoren. Im Falle einer Infektion mit gram-

negativen Bakterien geschieht dies über TLR4 (Beutler, 2004), gram-positive Bakterien werden über TLR2 erkannt (Morath *et al.*, 2002b). Die Bakterien werden daraufhin von Makrophagen phagozytiert.

In der gesunden Milchdrüse liegt der Zellgehalt bei <100.000 Zellen/ml Milch. Während einer bakteriellen intramammären Infektion steigt der Zellgehalt innerhalb weniger Stunden auf bis zu >1.000.000 Zellen/ml Milch an (Persson *et al.*, 1992; Kremer *et al.*, 1993). Innerhalb von 2 bis 4 Stunden steigt der Anteil von neutrophilen Granulozyten stark an, die folglich in der infizierten Milchdrüse die dominierende Zellfraktion darstellen (Kremer *et al.*, 1993; Cassatella, 1999). Angaben über Anteile an Neutrophilen erstrecken sich von 86% (Leitner *et al.*, 2000) bis über 96% (Riollet *et al.*, 2000). Von diesen Zellen hängt die Effektivität der Immunabwehr in der Milchdrüse entscheidend ab. Heynemann (1990) und Zecconi (1994) konnten zeigen, dass eine verminderte ROS-Bildungs-Leistung zu einer höheren Inzidenz von *E. coli*-Mastitiden führt. Der Schweregrad der Mastitis hängt von der Geschwindigkeit der Rekrutierung und von der Phagozytoseleistung ab (Hill, 1981). Eine ungenügende Funktion der PMN kann ebenso deutlich mit Mastitiden im peripartalen Zeitraum in Verbindung gebracht werden (Cai *et al.*, 1994). Die Anteile der Lymphozytensubpopulationen verändern sich nach Infektion mit *S. aureus* mit Ausnahme der  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Liegt das CD4+/CD8+-Verhältnis in der Milch vor der Infektion bei  $0,8 \pm 0,6$ , so steigt es in der akuten Phase auf  $2,7 \pm 3,1$  und in der chronischen Phase auf  $1,8 \pm 1,2$  (Gronlund *et al.*, 2006). Damit dominieren die CD4+-T-Zellen sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase einer *S. aureus*-Mastitis (Taylor *et al.*, 1997; Rivas *et al.*, 2000; Riollet *et al.*, 2001). Nach 24h post infectionem (p.i.) wurde ein Rückgang der CD4+- und CD8+-Populationen beobachtet. Dies könnte mit einem selektiven Zelltod der nichtspezifischen T-Zellen in der Phase der akuten Infektion zusammenhängen (Jiang *et al.*, 2003).

Obwohl der Einstrom von neutrophilen Granulozyten nach der Infektion mit *E. coli* dominiert, ist auch eine differentielle Migration von Lymphozyten zu verzeichnen (Paape *et al.*, 2000; Burvenich *et al.*, 2003). Die Anzahl von CD8+-T-Zellen steigt. Dies spiegelt sich in CD4+/CD8+-Verhältnissen wieder, die transient von 0,7 auf 0,4 abfallen und 24h p.i. wieder auf Werte von 1,5 ansteigen (Mehrzad *et al.*, 2008). Der Anteil von B-Lymphozyten hingegen steigt in akut und chronisch infizierten Eutervierteln wahrscheinlich durch stärkere Rekrutierung, da keine Teilung dieser Zellen im Parenchym zu beobachten war (Nickerson & Heald, 1982).

## 2.4 Milchinhaltsstoffe

Bei der Milchdrüse handelt es sich um eine sowohl apokrin als auch merokrin sezernierende Drüse. Die Bestandteile der Milch bzw. die zu deren Synthese benötigten Substrate stammen aus dem Blut. Die Blutflussrate im Euter beträgt bei laktierenden Kühen unter physiologischen Bedingungen etwa 15% des Herzminutenvolumens (Davis & Collier, 1985). Die Blutzufuhr erfolgt v.a. über die paarig angelegten *Arteriae pudendae externae*, der venöse Abfluss über die *Venae pudendae externae* und die *Venae epigastricae craniales superficiales*. Das Fassungsvermögen der Venen ist dabei etwa fünfzigmal größer als das der Arterien, so dass die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes im Euter stark abnimmt und so ein besserer Austausch der Substrate für die Milchbildung erfolgen kann (Nickel, 1996). Zur Produktion von einem Liter Milch müssen 400–540 Liter Blut durch das Euter fließen (Gravert, 1991; Huth, 1995; Nickel, 1996).

Die Zusammensetzung der Milch hängt stark mit der Blut-Euter-Schranke, die den “Zu- und Abfluss” von Stoffen reguliert, zusammen. Als Barriere zwischen dem Blutstrom und dem Parenchym des Euters hat die Integrität der Blut-Euter-Schranke großen Einfluss auf den Gesundheitsstatus des Euters. Sie wird aus der Wand der Alveole, bestehend aus der *Membrana propria*, den Myoepithelzellen sowie den eigentlichen Alveolarepithelzellen, und dem sie umfassenden Bindegewebe mit einem hohen Anteil von elastischen Fasern und dem darin liegenden Kapillarnetz gebildet. Die Integrität der Blut-Euter-Schranke ist für gesunde Drüsenkomplexe für die Dauer einer normalen Laktationsperiode gewährleistet. Während der Peripartalphase, deutlich verlängerten Laktationsperioden (>330 Tage) oder im Falle von sehr kurzen (4h) oder sehr langen (>18h) Melkzeitintervallen ergeben sich physiologisch bedingte Permeabilitätsänderungen (IDF, 1967; Hamann & Zecconi, 1998; Hamann & Gyodi, 2000).

### 2.4.1 Fett

Fettsäuren werden hauptsächlich von den Drüsenepithelzellen des laktierenden Euters synthetisiert oder aus den im Blut vorkommenden Lipiden extrahiert (Bauman & Davis, 1974; Neville *et al.*, 1983). Etwa die Hälfte der in der Milch vorkommenden Fettsäuren sind die kurz- und mittelkettigen (C4-C16) Fettsäuren (McGuire & Bauman, 2003). Sie werden aus Acetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat, die aus dem ruminalen Kohlenhydratstoffwechsel stammen, in der Milchdrüse *de novo* synthetisiert. Ein Großteil der langkettigen Fettsäuren (C16 – C18) stammen aus den im Plasma vorkommenden Triglyceriden (Davis & Collier, 1985). Diese werden im Plasma in Form von Chylomikronen oder an Lipoproteine (vornehmlich very low

density lipoproteins, VLDL) gebunden transportiert (Gooden & Lascelles, 1973; Puppione, 1978; Palmquist *et al.*, 1993). Die Aufnahme der Triglyceride in die Drüsenepithelzellen ist abhängig von der Aktivität der Lipoprotein-Lipase (LPL) im Kapillarendothel (Emery, 1973). Die im Plasma der Eutervene nachgewiesene Aktivität dieses Enzyms korreliert direkt mit der Sekretionsrate des Milchfetts (Emery, 1979). Die Aktivität der LPL steigt mit der Abkalbung in den Euterkapillaren um ein Vielfaches an, gleichzeitig geht sie im Fettgewebe zurück (Emery, 1973). 10% des zur Triglyceridsynthese benötigten Glycerols stammt aus dem Blut; der übrige Teil wird in den Drüsenepithelzellen aus Glukose gebildet (Gravert, 1991). Ein weiteres in den Milchdrüsenzellen vorkommendes Enzym, die  $\Delta^9$ -Desaturase, ist für die Hydrierung der langkettigen Fettsäuren verantwortlich und reguliert so den Gehalt an ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Milch (McGuire & Bauman, 2003).

#### 2.4.2 Eiweiß

Der physiologische Referenzbereich für das Gesamt-Milcheiweiß liegt zwischen 2,9–3,4% (IHTM., 1995). Das Milcheiweiß setzt sich aus den Caseinen ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Caseine und postsekretorisch entstehende  $\gamma$ -Caseine) und den Molkeproteinen (Serumalbumin,  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin, Immunglobuline) zusammen (Stelwagen, 2003b). Aus dem Blut werden Serumalbumine und Immunglobuline überwiegend merokrin in das Alveolarlumen sezerniert (Grabowski, 2000), und zwar zum Teil über aktiven Transport, zum Teil passiv per Diffusion. In den Ribosomen der Milchdrüsenepithelzelle werden die übrigen Milchproteine gebildet. Die dafür benötigten Aminosäuren werden mit Hilfe gruppenspezifischer Transportproteine aus dem Blut resorbiert (Baumrucker, 1985). Die Veränderungen im Anteil der Aminosäuren im Blutplasma in den letzten 24h ante partum entsprechen denen der Prolaktin- und Progesteronkonzentrationen im Blut, so dass ein hormoneller Zusammenhang vermutet wird (Verbeke *et al.*, 1972). Etwa 60% der Aminosäuren stammen aus der mikrobiellen Proteinsynthese im Pansen und nur ungefähr ein Drittel direkt aus den Proteinen der Futtermittel (Stelwagen, 2003b). Die nicht essentiellen Aminosäuren können auch in den Drüsenzellen u.a. aus Acetat, Propionat und Glukose neu synthetisiert werden (Kronfeld, 1982; Griinari *et al.*, 1997; Shennan & Peaker, 2000).

Mit zunehmender Laktationsanzahl nähert sich die Kuh dem genetisch festgelegten Proteingehalt der Milch an, d.h. die Kuh erreicht erst mit steigendem Alter ihre optimale Leistung (Monardes & Hayes, 1985). Protein stellt sich – abgesehen von der Fütterung – als relativ autonomer Parameter dar. Es wurden keine Korrelationen mit der Zellzahl, latenten

Euterinfektionen oder der Zugabe von Propylenglykol zum Futter als Ketose-Prophylaxe gefunden (Sordillo *et al.*, 1987b; Hogan *et al.*, 1990; Jans & Munger, 1992; Gustafson, 1993).

### 2.4.3 Laktose

Laktose stellt die wichtigste osmotisch wirksame Komponente in der Milch dar (Rook, 1979). Sie wird in den Drüsenzellen des Euters synthetisiert. Dafür werden über 70% der Glukose aus dem Blut benötigt, während der Hochlaktation sogar bis zu 85% (Bickerstaffe *et al.*, 1974; Muir, 2003; Stelwagen, 2003a). Die Glukoseaufnahme durch die Euterepithelzellen ist, im Gegensatz zu anderen Geweben, unabhängig von Insulin (Laarveld *et al.*, 1981). Der Transport der hydrophilen Glukose durch die Lipiddoppelschicht der Drüsenzellmembran erfolgt mit Hilfe eines spezifischen Transportproteins, bei dem es sich vermutlich um den Glukosetransporter GLUT-1 handelt (Shennan & Peaker, 2000). GLUT-1 wurde wiederholt im Milchdrüsenewebe laktierender Kühe nachgewiesen (Zhoa *et al.*, 1993; Zhoa *et al.*, 1996). Es gehört einer Gruppe verschiedener Transportproteine an, die alle aus jeweils zwölf hydrophoben Transmembrandomänen bestehen, jedoch gewebs- und zellspezifisch exprimiert werden (Löffler & Petrides, 1997). Der Mechanismus des Transports der Glukosemoleküle durch die Membran des Golgi-Apparates ist noch nicht ausreichend geklärt. Im Golgi-Apparat wird die Laktose mittels eines Enzymkomplexes, der Laktose-Synthase, gebildet. Die Laktose-Synthase entsteht durch die Wechselwirkung der an die Innenwand der Golgibläschen gebundenen Galaktosyltransferase mit  $\alpha$ -Lactalbumin (Gravert, 1991). In den Golgivesikeln wird die Laktose zur apikalen Zellmembran gebracht und durch Exozytose in das Lumen der Drüsenalveolen abgegeben (Shennan & Peaker, 2000).

Mit Ausnahme der Früh-laktation, etwa bis zum 70. Tag p.p., bleibt die Laktosekonzentration praktisch konstant auf einem Wert von 4,9% (Gebhardt, 1993). Die Blut-Euter-Schranke ist nahezu impermeabel für Laktose. Als Ausnahmen gelten folgende Umstände:

- Abkalbephase
- Beginn der Trockenstehphase
- Mastitiden

Diese können dazu führen, dass Laktose vom Blut über den Harn ausgeschieden wird. In der peripartalen Phase wird viel Laktose produziert. Hohe Konzentrationen finden sich sowohl im Harn als auch in der Milch. Ansonsten bestehen zwischen Laktose in der Milch und Laktose im Blut, ebenso wie zwischen Laktose und elektrischer Leitfähigkeit in der Milch, negative

Korrelationen ( $r = -0,26$  bei  $p < 0,05$  bzw.  $r = -0,59$ ). Des Weiteren korreliert Laktose im Harn mit der Zellzahl ( $r = 0,66$ ) und der Leitfähigkeit ( $r = 0,46$ ). Ein Laktoseabfall in der Milch bzw. der Laktoseanstieg im Harn stellen somit einen Indikator für die Permeabilität der Blut-Euter-Schranke dar (Scheler, 1985; Schulz *et al.*, 1998). Als kritischer Laktosewert zur Identifizierung von Störungen der Blut-Euter-Schranke in der Früh lactation wurde 4,74% angegeben (Hanus *et al.*, 1993). Viertelgemelke mit Laktosekonzentrationen  $< 4,6\%$  wurden in 76% der Fälle als euterkrank bestätigt (Ryniewicz & Wojcik, 1985). Ein Tiereinfluss kann ausgeschaltet werden, indem der Laktosegehalt der Milch der mastitiserkrankten Viertel den Befunden der übrigen Viertel gegenübergestellt wird, außerdem wird dadurch eine höhere spezifische Aussagefähigkeit ermöglicht (Gardzima *et al.*, 1987). Laktose kann auch in Form eines Chlorid-Laktose-Quotienten (Hanus *et al.*, 1992) einen wichtigen Mastitisindikator darstellen (Glabowna *et al.*, 1988).

Laktose wird, wie andere Kohlehydrate, von Bakterien wie z.B. *Clostridium perfringens* oder *E. coli* postsekretorisch fermentiert, was bei der Interpretation von Ergebnissen berücksichtigt werden muss (Torres Anjel *et al.*, 1976).

#### 2.4.4 pH-Wert

Der pH-Wert ist definiert als der „negative dekadische Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration“, d.h. er ist Ausdruck des Verhältnisses zwischen Basen und Säuren. Eine Schädigung der Blut-Euter-Schranke geht mit dem Verlust von Alveolarepithelzellen einher; sie stellen einen wichtigen Teil der Schranke dar. Es kommt zum Übertritt verschiedener Stoffe ins Blut und umgekehrt. Der pH-Wert verschiebt sich meistens in den alkalischen Bereich. Nur bei schweren Organschäden können auch Werte unter 6,5 auftreten. In frisch ermolkenen Milch ist der pH-Wert leicht sauer (6,6-6,8). Er fällt kurz nach dem Melkvorgang nochmals um 0,2 ab, da Kohlendioxid entweicht (ZAHTM, 1998). Während des Melkvorganges steigt der pH-Wert der Milch an. Ferner wurde ein Herdeneinfluss festgestellt (Holdaway *et al.*, 1996).

Im Krankheitsfall treten Konzentrationsänderungen außerhalb der physiologischen Norm auf (Hamann, 1999). Veränderungen des pH-Wertes treten bei Mastitiden und bei Kontamination mit Bakterien auf, die entweder die Laktose spalten und zur Azidität führen oder durch ihre Stoffwechselprodukte alkalisierend wirken (Keating, 1986).

In der Regel lassen sich diese Normabweichungen erst dann ausmachen, wenn in Sekret oder Euter schon auffällige Veränderungen bestehen.



### 2.4.5 Harnstoff

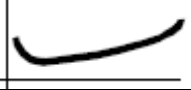
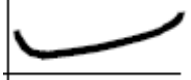
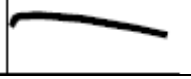
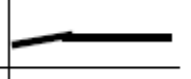
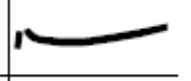
Harnstoff spielt im Metabolismus des Wiederkäuers eine große Rolle. Ein Teil entsteht beim physiologischen Eiweißstoffwechsel, der Rest im Falle eines Energiedefizits der Futtermittelration aus dem Ammoniak des Pansenstoffwechsels. Entstehender Ammoniak wird in der Leber im Harnstoffzyklus unter Verbrauch von ATP, Kohlendioxid, Wasser, freien Aminogruppen und Ornithin zu Harnstoff und Fumarat verstoffwechselt (Lenninger, 1985).

Harnstoff ist ein wasserlösliches Molekül, das aufgrund seiner geringen Größe frei durch die Drüsenepithelzellen in die Milch diffundieren kann. Dies kommt in hohen Korrelationskoeffizienten ( $r = 0,70-0,98$ ) zwischen Milch- und Blutharnstoffkonzentrationen zum Ausdruck (Piatkowski *et al.*, 1981; Jakobi *et al.*, 1985; Oltner *et al.*, 1985; Haag, 1988; Miettinen & Juvonen, 1990). Es ist davon auszugehen, dass der Milchwarnstoffgehalt die mittlere Blutharnstoffkonzentration zwischen den einzelnen Melkzeiten widerspiegelt (Piatkowski *et al.*, 1981; Kaufmann *et al.*, 1982). Der Harnstoffgehalt in der Milch hängt von vielen verschiedenen Parametern ab, wie Rasse, Jahreszeiten, Laktationsstadium, Anzahl der Laktationen, Morgen- oder Abendmelk (Godden *et al.*, 2001). So sind die Harnstoffkonzentrationen von Juli bis September und zwischen dem 60. und 150. Tag in der Laktation am höchsten, während erstlaktierende Tiere insgesamt niedrigere Konzentrationen aufweisen. Das Abendmelk hat wiederum einen höheren Harnstoffgehalt im Vergleich zum Morgemelk. Als Referenzbereich für physiologische Harnstoffkonzentrationen wird in der Literatur ein Wert zwischen 200 und 400mg/l angegeben (Bastin *et al.*, 2009).

### 2.4.6 Milchinhaltsstoffe in der Milch einer gesunden Milchdrüse

Milchmenge und Milchinhaltsstoffe unterliegen grundsätzlich laktationsbedingten Veränderungen. Ihr tendenzieller Verlauf über die Laktation sowie ihre physiologischen Referenzspannen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Mittlerer Gehalt der Inhaltsstoffe von Milch und Kolostralmilch modifiziert nach Mielke (1994) und Redetzky (2000)**

Inhaltsstoffe	Mittlerer Gehalt (Redetzky, 2000)	Tendenzieller Verlauf (Redetzky, 2000)	Kolostralmilch / Milch (Mielke, 1994)	
Fett (%)	3,8		3,3	3,5
Gesamteiweiß (%)	3,4		14,2	3,3
Laktose (%)	4,7-5,0		2,9	4,8
pH	6,6-6,7		6,2	6,6
Harnstoff (mg/dl)	25		-	-

### 2.4.7 Milchinhaltsstoffe in der Milch nach Infektion der Milchdrüse

Bei Mastitiden kommt es zu einer Schädigung der Blut-Euter-Schranke durch die Wirkung mikrobieller Toxine und Stoffwechselprodukte (Wagner *et al.*, 2009). So führte die intrazisternale Injektion von *E. coli*-Endotoxin zu einer um den Faktor 10 erhöhten Leukozytose und einem Anstieg des Milchproteins um den Faktor 5. Die Milchmengenleistung fiel um 80%, der Laktosegehalt um 50% (McFadden *et al.*, 1988). Die Schwankungen in der Zusammensetzung der Milch sind z.T. auf Veränderungen der Schranken-Permeabilität zurückzuführen. Das Ausmaß der Läsionen ist abhängig von der Dosis und der Art des verabreichten Toxins (Lohuis *et al.*, 1988). Bei einer Schädigung der Blut-Euter-Schranke kommt es zu einem Absinken von K-Ionen in der Milch, während Na- und Cl-Ionen ansteigen (Burvenich, 1983).

Zur Erforschung der Blut-Euter-Schranken-Regeneration wurden geringe Mengen (250 – 700 CFU) eines virulenten *E. coli*-Stammes in sechs Viertel (n = 3 Kühe) infundiert und die Regeneration des nicht-sekretorischen Epithels von Euter- und Zitzenzysternen beobachtet (Brooker *et al.*, 1981). Der so induzierte Gewebeschaden erstreckte sich lediglich auf das Epithel, nicht aber auf die Basalmembran. Die von Bakterien geschädigten Areale wurden mit einer Fibrinschicht abgedeckt. Die der Läsion anliegenden Epithelzellreihen reduzierten ihre Höhe, bildeten breite Lamellipoden aus und migrierten über die freigelegte Basalmembran, während sie z.T. das Fibrin phagozytierten. Die Wiederherstellung der Blut-Euter-Schranke ist bereits binnen weniger Stunden abgeschlossen. Dies könnte daran liegen, dass sich die Läsion nur auf das Epithel beschränkt. Eine Erhöhung der Mitoserate wurde nicht festgestellt (Brooker *et al.*, 1981). Die subkutane Injektion von rekombinantem bovinem Somatotropin beschleunigt die Regeneration der Blut-Euter-Schranke, forciert die Synthese bestimmter Milchinhaltsstoffe und verhindert den Leistungsabfall von nicht-infizierten Vierteln bzw. beschleunigt die Rückkehr zur physiologischen Norm (Burvenich *et al.*, 1988; Hoeben *et al.*, 1999).

Prinzipiell lassen sich nach Sandholm *et al.* (1985) für Mastitiden fünf diagnostische Kategorien von Veränderungen der Milchezusammensetzung definieren:

1. Anstieg der Anzahl somatischer Zellen
2. Übertritt von Plasmaproteinen in das Alveolarlumen
3. Veränderung der Ionenkonzentration

#### 4. Lokaler Zellschaden mit subsequentem Austritt intrazellulärer Stoffe in die Milch

#### 5. Sekretorische Insuffizienz der Epithelzellen

Als Parameter zur Diagnostik von Mastitiden werden vor allem die elektrische Leitfähigkeit (Handmessgerät) und der Zellgehalt, etwa in Form eines California Mastitis Test (CMT), genutzt (Hamann, 1999). Neuere Studien zeigen jedoch, dass die elektrische Leitfähigkeit als Mastitisindikator nicht für alle Mastitiserreger geeignet ist (Norberg *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2009). Im Labor werden darüber hinaus NAGase-Aktivität, Na- und Cl-Ionenbestimmung nebst bakteriologischer Analyse vorgenommen, um den Verdacht auf Mastitis zu erhärten (Kruif *et al.*, 1998). In den letzten Jahrzehnten wurde vor allem NAGase, aber auch Antitrypsin, Laktose und BSA zur Mastitisdiagnostik herangezogen (Sandholm & Mattila, 1985). Neuere Studien zeigen jedoch, dass NAGase bei der Erkennung von subklinischen Mastitiden gegenüber dem SCC keine echte Alternative darstellt (Guliye *et al.*, 2002). Monosaccharide scheinen zur Mastitisdiagnostik ungeeignet (Marschke & Kitchen, 1984; Kunczewicz, 1994). Der Fettgehalt der Milch sinkt bei Eutererkrankungen, weswegen dieser Parameter zur Mastitisdiagnostik geeignet ist. Je ausgeprägter die Mastitis, desto höher ist der Anteil von  $\beta$ -Carotin im Fett (3,1  $\mu\text{g/ml}$  bei gesunden, 7,3  $\mu\text{g/ml}$  bei erkrankten Vierteln (Özpınar, 1983)). In Tabelle 2 werden die in der Literatur beschriebenen Milchinhaltsstoffe, die sich im Verlauf einer Mastitis verändern, und deren Tendenzen dargestellt.

**Tabelle 2: Konzentrationsänderungen im Milchprofil bei Mastitis (Redetzky, 2000)**

Parameter	Befund	Erklärungsansatz / Bemerkungen	Quelle
<b>pH-Wert</b>	▲▲	zur Mastitis-Erkennung geeignet	(Grabowski, 2000)
	▲	Konzentrationsanstieg war nicht signifikant	(Cecil <i>et al.</i> , 1965)
<b>Laktose</b>		zur Mastitis-Erkennung geeignet	(Grabowski, 2000)
		Lockerung der Blut-Euter-Schranke	(Schulz <i>et al.</i> , 1998)
	▼▼	kritischer Wert zur Identifizierung von Störungen der Blut-Euter-Schranke: 4,74%	(Hanus <i>et al.</i> , 1993)
		scheint als Mastitisindikator geeignet zu sein	(Glabowna <i>et al.</i> , 1988)
		Änderungen sind in Abhängigkeit von den Pathogenen ausgeprägter	(Fernando <i>et al.</i> , 1985)
		Viertelgemelke mit Konzentrationen < 4,6% wurden zu 76% als mastitiskrank erkannt	(Ryniewicz & Wojcik, 1985)
<b>Fett</b>	▲▲	nach i.v.-Endotoxingabe	(Shuster <i>et al.</i> , 1991)
			(Pociecha, 1989)
	▼▼		(Barnouin & Karaman, 1986)
			(Özpinar, 1983)
<b>Eiweiß</b>	▲▲	Schädigung der Blut-Euter-Schranke durch Toxine	(McFadden <i>et al.</i> , 1988)
	▼▼	zwar nimmt der Anteil an Serumproteinen zu, aber der Kaseingehalt sinkt; Gesamtprotein fällt leicht ab	(Heeschen <i>et al.</i> , 1985)
	▲▲		(Ng-Kwai-Hang <i>et al.</i> , 1982)
	▶		(Wittkowski, 1979)
<b>Harnstoff</b>	▼▼	bei klinischen Mastitiden sinkt der Harnstoffgehalt	(Gutjahr <i>et al.</i> , 1997)

Dargestellt sind die in der Literatur beschriebenen Milchinhaltsstoffe, die sich im Verlauf einer Euterentzündung ändern. Zusätzlich sind Erklärungsansätze, Bemerkungen sowie die jeweilige Quelle angegeben. ▲ = Erhöhung, ▼ = Erniedrigung, ▶ = keine Änderung

### 3 Geräte, Materialien und Methoden

#### 3.1 Geräte

Autoklav „D65“	(Systemec, Wetttenberg)
Brutschrank „Incucell“	(MMM Medcenter, Planegg)
Bunsenbrenner mit automatischer Zündung	(Wartewig, Göttingen)
DeLaval cell counter DCC	(DeLaval, Tumba, Schweden)
Eismaschine „ZBE 70-35“	(Ziegra, Isernhagen)
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACScan <sup>®</sup> , mit angeschlossener Computereinheit	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Heißluftsterilisator „Typ ST5050“	(Heraeus, Hanau)
Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen)
Kühlzentrifuge „Rotina 420 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Laborwaage „SBC22“	(Scaltec Instruments, Heiligenstadt)
LightCycler <sup>®</sup> 2.0 System Instruments	(Fa. Roche, Mannheim)
Melkanlage „RPA 40“	(Westfalia, Oelde)
Multipette	(Eppendorf, Hamburg)
Photometer “Spectra Classic”	(Tecan, Crailsheim)
Pinzette, gebogen, anatomisch	(Eickemeyer, Tuttlingen)
Pipette, einstellbar „Transferpette <sup>®</sup> “ (2-20µl)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar (1-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl, 1-5ml )	(Biohit, Köln)
Pipettierhilfe „accu-jet <sup>®</sup> “	(Brand, Wertheim)
Reinstwassersystem „GenPure“	(TKA, Niederelbert)
Schlauchpumpe zum Absaugen von Flüssigkeiten „Rumo100“	(Heidolph, Schwabach)

Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA, Staufen)
Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“	(Kojar, Vilppula, Finnland)
Thermocycler „T1plus Thermocycler“	(Fa. Biometra, Göttingen)
Thermometer	(Microlife, Widnau, Schweiz)
Tiefkühltruhe (-80°C) „Forma ULT Freezer“	(Thermo Electron, Dreieich)
Tischzentrifuge „Universal 32 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Viertelmelkmaschine	(DeLaval, Tumba, Schweden)
Zählkammer nach Bürker	(Brand, Wertheim)
Zentrifuge „Universal 32R“	(Roth, Karlsruhe)

## 3.2 Materialien

### 3.2.1 Klinikbedarf

Applikatoren, steril	(Böttger, Bodenmais)
Dalmarelin <sup>®</sup> , Lecirelin	(Selectavet, Weyarn)
Dalmazin <sup>®</sup> , Cloprostenol-Natriumsalz	(Selectavet, Weyarn)
EDTA-Röhrchen „BD-Vacutainer <sup>®</sup> “	(Becton Dickinson, Plymouth, UK)
Einmalspritzen, 5ml „Luer steril“	(Terumo, Leuven, Belgien)
Einmalspritzen, 2ml „Luer steril“	(Terumo, Leuven, Belgien)
Einmal-Untersuchungshandschuhe “Gentle skin <sup>®</sup> sensitive“	(Meditrade, Kiefersfelden)
California-Mastitis-Test	(WDT, Garbsen)
Kanülen, 1,80 x 40mm, steril „TSK STERIJECT“	(TSK-Supra, Tochigi, Japan)
Oxytozin ad us. vet.	(aniMedica, Senden-Bösesell)

Polystyrol-Röhrchen steril	(Sarstedt, Nümbrecht)
Serum-Röhrchen 10ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Vacutainer Brand Luer Adapters	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainerröhrchen, 10ml, EDTA-K2 (18mg)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainerröhrchen, 10ml, Heparin (170IU)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainerröhrchen, 10ml, ohne Zusatz	(Becton Dickinson, Heidelberg)

### 3.2.2 Laborbedarf

Combitips, 1,25ml	(Eppendorf, Hamburg)
Combitips, 2,5ml	(Eppendorf, Hamburg)
Cryo-Freezing-Container	(Nalgen Co., Rochester, U.S.A.)
Einmal-Küvetten 2,5ml makro PMMA	(Brand, Wertheim)
Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld.	(Merck, Darmstadt)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 0,5ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5ml	(Greiner, Frickenhausen)
Drigalski-Glasspatel	(Roth, Karlsruhe)
Cryotubes, 3,5ml	(Roth, Karlsruhe)
Cryotubes, 5ml	(Roth, Karlsruhe)
Laborflaschen mit Gewinde, 500ml	(VWR international, Hannover)
Mikrobank-System Cryobank™	(Mast Diagnostika, Reinfeld)
Multipetteneinsatz	(Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitzen, weiß, gelb und blau	(Sarstedt, Nümbrecht)



Pipettenspitzen, 200µl	(Brand, Wertheim)
Polystyrolröhrchen	(Nerbe Plus, Winsen/Luhe)
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5ml	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Rundboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung; steril, 96 Vertiefungen	(Gechno Plastic Products TPP <sup>®</sup> , Trasadingen, Schweiz)
Saugpipetten, 10ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Schraubdeckeldosen „Rotilabo <sup>®</sup> “	(Roth, Karlsruhe)
Spatel	(Roth, Karlsruhe)
Zentrifugenröhrchen, 50ml aus Polypropylen (Falcons, steril)	(Corning, Wiesbaden)
Zentrifugenröhrchen, 15ml aus Polypropylen (steril)	(Sarstedt, Nümbrecht)

### 3.2.3 Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien

Acridin-Orange	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Columbia-Schafblut-Agar	(Oxoid, Wesel)
Edwards-Nährboden mit Schafblut (mod.)	(Oxoid, Wesel)
Ethanol 70%	(Roth, Karlsruhe)
FACS Clean	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Rinse	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Gassner-Agar	(Oxoid, Wesel)
“High Pure PCR Product Purification Kit”	(Fa. Roche, Mannheim)
Hirn-Herz-Boillon, brain-heart-infusion-broth (BHI)	(Oxoid, Wesel)
Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (VRB-Agar)	(Oxoid, Wesel)

Light Cycler Kit; "Fast Start DNA Master Plus SYBR green"	(Fa. Roche, Mannheim)
Natriumchlorid (NaCl)	(Sigma, Steinheim)
Propidiumiodid (PI)	(Calbiochem, Bad Soden)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Dulbecco, ohne Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup>	(Biochrom, Berlin)
RNAlater <sup>®</sup>	(Sigma, Steinheim)
Sheath-fluid für Durchflusszytometrie	(Becton Dickinson, Heidelberg)
SuperScript III <sup>®</sup> Reverse Transcriptase	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Trizol LS Reagent <sup>®</sup>	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Trypton-Soja-Bouillon, trypticase-soy-broth (TSB)	(Sigma, Steinheim)

### 3.2.4 Puffer und Lösungen

#### 3.2.4.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA

Die PBS-Trockensubstanz (siehe 3.2.3) wurde mit *Aqua tridest.* gelöst. Die Bestandteile lagen in den folgenden Konzentrationen vor:

NaCl	8,0g
KCl	1,24g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
<i>Aqua tridest.</i>	ad 1000ml

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### 3.2.4.2 Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz

bovines Serumalbumin	5,0g
Natriumazid	0,1g
PBS	ad 1000ml

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### 3.2.4.3 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem nach den Messungen mit sterilfiltriertem *Aqua tridest.*, FACS Clean und FACS Rinse gespült.

#### *Trägerflüssigkeit (Sheath fluid)*

Als Trägerflüssigkeit für die durchflusszytometrische Messung wurde sterilfiltriertes PBS (0,2µm) mit 0,1mg/ml NaN<sub>3</sub> (Natriumazid) verwendet.

#### *Propidiumiodid-Stammlösung*

Die Stammlösung von 100µg/ml Propidiumiodid, gelöst in Trägerflüssigkeit, wurde in aliquoten Teilen bei -20°C gelagert. Zum Anfärben toter Zellen wurden der Trägerflüssigkeit entsprechende Teile der Stammlösung zugesetzt, um eine Endkonzentration von 2µg/ml zu erreichen.

#### *Acridin-Orange-Stammlösung*

Eine Stammlösung von 0,5µg/ml Acridin-Orange, gelöst in Trägerflüssigkeit (siehe oben), wurde in aliquoten Teilen bei 4°C gelagert. Vor jedem Einsatz wurde sie auf das Vorhandensein von ausgefallten Anteilen überprüft und nötigenfalls verworfen. Entsprechende Teile der Stammlösung wurden den Milchzellsuspensionen zugesetzt, um eine Endkonzentration von 2,5pg/ml zu erreichen.

### 3.2.5 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden nach den Kriterien des standardisierten Tiermodells ausgewählt (siehe 3.3.2). Es wurden ausschließlich Tiere der Rasse Holstein-Friesian verwendet, die sich in der ersten Laktation (2.-6. Monat in Milch) befanden, klinisch gesund und vorberichtlich noch nie an einer Mastitis erkrankt waren. Die Milch aller 4 Euterviertel musste einen Zellgehalt von unter  $5 \cdot 10^4$ /ml Milch aufweisen und frei von Bakterien sein. Die Tiere wurden im Herkunftsbetrieb dreimal im Abstand von mindestens 7 Tagen auf diese Kriterien untersucht.

Diese Voraussetzungen wurden von allen 26 im Rahmen des Versuchs verwendeten Tieren erfüllt. Das Alter der Probanden lag bei 26 bis 40 Monaten. Alle Tiere befanden sich in der ersten Laktation und waren 74 bis 184 Tage in Milch. Die steril gewonnenen Viertelgemelksproben wurden auf Columbia-Schafblut-Agar, Edwards-Agar und VRB-Agar (siehe 3.2.3) ausgestrichen und anschließend über 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Mindestens 3 Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim in einem abgeschlossenen, 5 Kuhplätze umfassenden Stallabteil aufgestellt. Die Tiere standen auf Gummimatten mit Stroheinstreu und wurden mit TMR und Heu *ad libitum* und leistungsabhängigen Mengen an Kraftfutter und Getreideschrot gefüttert. Ab dem Tag der Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim wurde täglich zweimal die Milchleistung, die rektal gemessene Temperatur und die Futteraufnahme dokumentiert.

### 3.2.6 Modellbakterien

Die verwendeten Stämme *E. coli* 1303 und *S. aureus* 1027 waren in früheren Experimenten jeweils aus dem Eutersekret von an klinischer Mastitis erkrankten Kühen in der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover isoliert worden.

Die Stammhaltung der Bakterien in Glycerinstocks und die biochemische Charakterisierung erfolgte freundlicherweise im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Valentin-Weigand.

Der *E. coli*-Stamm wurde nach der für *Enterobacteriaceae* zusammengestellten „Bunten Reihe“ (Burkhardt, 1992) charakterisiert (siehe Tabelle 3). Die benötigten Testmedien wurden im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule hergestellt.

**Tabelle 3: Biochemisches Reaktionsspektrum des verwendeten *E. coli*-Stamms 1303**

-	Kligler (H <sub>2</sub> S-Nachweis)	+	Methylrot
+	Indolbildung	-	Voges-Proskauer-Reaktion
-	Citrat	+	Glukose
-	Urease	+	Gasbildung
-	Malonat	+	Laktose
-	Phenylalanindecaboxylase	-	Saccharose
+	Lysindecaboxylase	+	Adonit
-	Ornithindecaboxylase	+	Rhamnose
-	Gelatinase	+	Oxidativer Glukoseabbau
-	Motilität	+	Fermentativer Glukoseabbau

+ = positiver Nachweis; - = kein Nachweis

Das Isolat *E. coli* 1303 gehört zur phylogenetischen Hauptgruppe A von *E. coli* (*E. coli*-Sammlung von Referenzstämmen, ECOR-A). Ein multiplex PCR-basiertes Screening (Johnson & Stell, 2000; Muller *et al.*, 2007) nach bekannten Virulenzfaktoren von intestinal und extraintestinal pathogenen *E. coli* hat ergeben, dass es sich weder um einen klassischen EHEC, EPEC, EIEC, ETEC oder EAEC noch um einen klassischen extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stamm handelt.

Es konnten nur die Gene identifiziert werden, die Typ 1 Fimbrien, F17 Fimbrien, Antigen 43, das Eisenzitratsiderophorensystem and das EAST1-Toxin kodieren (Dobrindt, persönliche Mitteilung).

Bei dem *S. aureus*-Stamm 1027 konnte kulturell-biochemisch die Mannitspaltung, der Clumping Faktor (gebundene Koagulase) sowie die freie Koagulase (Röhrchenkoagulase) nachgewiesen werden.

Für die weitere Charakterisierung des Stammes wurden multilocus sequence typing (MLST) und DNA-Arrays an der Ernst Moritz Arndt Universität Abteilung für Mikrobiologie und Molekularbiologie in Greifswald von Frau Dr. Engelmann durchgeführt.

Einem MLST basierten Screening zufolge (Enright *et al.*, 2000) besitzt der *S. aureus* Stamm 1027 den sequence type (ST) 133. Der *agr*-type war 1. Desweiteren konnten keine Gene von

Superantigenen mittels DNA-Array (Monecke & Ehricht, 2005) nachgewiesen werden. Allerdings ist der *S. aureus* Stamm 1027 im Stande Leukocidine zu bilden, die humane und bovine Leukozyten schädigen (lukF-PV(P83)/lukM) (Engelmann, persönliche Mitteilung).

Zu den biochemischen Eigenschaften wurden zusätzlich Antibiotika-Resistenztestungen in der Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der fachlichen Anleitung von Frau Dr. Schröder durchgeführt:

**Tabelle 4: Antibiotika-Resistenzprofil der verwendeten Stämme *E. coli* 1303 und *S. aureus* 1027**

Antibiotika	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Amoxicillin/Clavulansäure	S	S
Ampicillin	S	S
Apramycin	S	-
Cefquinom	S	S
Cephalothin	R	-
Cefazolin	-	S
Cefaperazon	S	S
Colistin	S	R
Enrofloxacin	S	S
Erythromycin	R	I
Gentamycin	S	S
Neomycin	S	I
Tetracyclin/Oxytetracyclin	R	S
Trimethoprim/Sulphamethoxazol	S	S
Pirlimycin/Lincomycin	R	S
Penicillin G	R	S
Oxacillin/Cloxacillin	R	S

S = sensibel; R = resistent; I = intermediär; - = nicht untersucht

### 3.2.7 Antikörper

Für die Differenzierung der Milchleukozyten mittels Membranimmunfluoreszenz kamen die in Tabelle 5 genannten Antikörper zum Einsatz:

**Tabelle 5: Monoklonale Antikörper zur Charakterisierung zellulärer Oberflächenstrukturen**

Name	Spezifität
MouseAntiBovineCD4:Fitc*	bovines CD4
MouseAntiBovineCD8BETA:RPE*	bovines CD8
MouseAntiHumanCD14:RPE-AlexaFluor®647*	humanes CD14 (Kreuzreaktion mit bovinem CD14)
MouseAntiSheepMHCclassIIDQDRPolymorphic:Fitc*	ovines MHC Klasse II (Kreuzreaktion mit bovinem CD14)

\*AbD Serotec, Morphosys UK, Kidlington, Oxford, UK

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Tierschutzantrag

Bei dem Tierversuch handelte es sich um ein durch die Regierung von Oberbayern genehmigtes Versuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-108-05.

### 3.3.2 Modellbedingungen und Voruntersuchungen der Probanden

Für die Tierversuche wurden nur Tiere der Rasse Holstein-Friesian verwendet, die sich in der ersten Laktation, 2-6 Monate in Milch befanden, klinisch gesund und nach Vorbericht noch nie an einer Mastitis erkrankt waren. Die Milch aller vier Euterviertel musste frei von Mastitis-Erregern sein und einen Zellgehalt von unter  $5 \cdot 10^4$ /ml Milch aufweisen. Die steril gewonnene Milch wurde auf Columbia Schafblut-Agar, Edwards-Agar und VRB-Agar ausgestrichen und anschließend über 36h bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Diese Untersuchung wurde im Herkunftsbetrieb 3-mal im Abstand von einer Woche durchgeführt. Es wurden dabei nur Tiere ausgewählt, deren bakteriologische Milchuntersuchung immer negativ ausfiel.

Eine klinische Allgemeinuntersuchung wurde im Herkunftsbetrieb durchgeführt und dabei das Haarkleid, Verhalten, Ernährungszustand, Hautturgor, Bulbi, Schleimhäute, Lymphknoten, Atemfrequenz, Skleralgefäße, Venen, Harn, Euter, Abdomenform,

Bauchdeckenspannung, Darmmotorik und der Kot beurteilt. Ferner wurde die Auskultation der Atmung und des Herzens, die Lungenperkussion, die Pansenauskultation, die Schwing- und Perkussionsauskultation des Pansens, Fremdkörperproben, Leberperkussion und die rektale Untersuchung mit Beurteilung des Geschlechtsapparates, der Darmbeinlymphknoten, des abdominalen Unterdrucks, des Bauchfells, des Pansens sowie der linken Niere durchgeführt. Nur wenn alle Parameter physiologische Werte zeigten und das Tier als klinisch gesund einzustufen war, wurde es angekauft.

Nach der Aufstallung in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München wurden die Tiere während drei Wochen an das Futter, Umgebung, Melkzeug und Melker gewöhnt. In dieser Zeit wurden die Tiere auf ein 12h Melkintervall eingestellt. Einmal wöchentlich wurden Milchproben auf Mastitiserreger, sowie Milchinhaltsstoffe untersucht (siehe 3.3.9), Blutproben wurden zur Überwachung von Entzündungsparametern (siehe 3.3.14) bzw. Erstellung eines Hormonprofils (siehe 3.3.15) genommen. Während dieser dreiwöchigen Eingewöhnungsphase wurden durch zweimalige Applikation von PGF<sub>2α</sub> im Abstand von 12 Tagen alle Tiere zyklussynchronisiert, so dass drei Tage nach der zweiten Injektion alle Tiere zu Versuchsbeginn in Brunst waren. Durch die Synchronisation der Tiere sollten hormonelle Einflüsse in verschiedenen Zyklusstadien auf die Milchinhaltsstoffe sowie die verschiedenen Zellpopulationen minimiert werden.

Insgesamt wurden 4 Gruppen gebildet, wovon 5 Tiere nach der Infektion mit *S. aureus* über einen Zeitraum von 72h beobachtet wurden. 10 Tiere wurden mit *E. coli* infiziert, davon wurden 5 Tiere über einen Zeitraum von 6h und 5 Tiere über eine Periode von 24h beobachtet. Weitere 11 Tiere erhielten keine Infusion ins Euter. Sie dienten als Goldstandard.

Während des Versuchs wurde zum Versuchsbeginn sowie 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h nach Infektion (je nach Versuchsdauer) Blutproben genommen. Milchproben wurden alle 12h zu den Melkzeiten genommen, außer bei der *E. coli* 6h-Gruppe, hier wurde bereits 6h nach Infektion unmittelbar vor der Schlachtung der Tiere das Euter leergemolken.

Zum Ende der Versuchszeiträume wurden alle Tiere geschlachtet und Gewebeproben entnommen (siehe 3.3.18).

### 3.3.3 Präparation der Infektionsdosis

Die beiden Bakterienstämme (*E. coli* – Stamm 1303 und *S. aureus* – Stamm 1027), die in den Versuchen eingesetzt wurden, stammten aus dem Milchsekret klinisch an Mastitis erkrankter



Kühe (Patienten der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) (siehe 3.2.6). Die Bakterien lagen kryokonserviert auf Cryoballs vor (Mikrobank-System „Cryobank<sup>TM</sup>“). Nach dem Ausplattieren auf einem Columbia-Schafblut-Agar folgte eine Inkubation bei 37°C. Nach 24h wurden mehrere Kolonien mittels einer Öse in 10ml Hirn-Herz-Bouillon (brain-heart-infusion-broth, BHI) überführt, auf dem Vortexer gut durchmischt und 6h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem intensivem Durchmischen wurden 100µl dieser Suspension in 9,90ml Trypton-Soja-Bouillon überführt, gut durchmischt und über 18h bei 37°C inkubiert. Um eine definierte Anzahl koloniebildender Einheiten (engl: Colony forming units, CFU) zu erlangen, wurde die photometrisch bestimmte optische Dichte einer Bouillon mit der Keimzahlbestimmung durch das Spatelverfahren verknüpft. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten mit 0,9%iger NaCl-Lösung bis zu einer Stufe von  $10^{-8}$  hergestellt. 100µl der Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  bis  $10^{-8}$  wurden daraufhin als Triplikate auf Columbia Schafblut-Agar Platten mit einem Drigalski-Glasspatel ausgestrichen. Die Platten wurden daraufhin bei 37°C über 24h inkubiert. Platten, die zwischen 3 und 300 Kolonien aufwiesen, wurden ausgezählt. Diese Zahl wurde nun ins Verhältnis mit der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) der ersten Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$ ) gesetzt. Durch wiederholt reproduzierbare Werte nach Ausplattieren konnte eine Eichkurve erstellt werden, die es ermöglichte durch Ermittlung der OD der ersten Verdünnungsstufe bei einer Wellenlänge von 623nm auf die Zahl der CFU in der Bouillon zu schließen. Mit ihrer Hilfe wurde danach durch Bestimmung der OD in der Bouillon die entsprechende Bakterienkonzentration in CFU errechnet. Die angestrebte *E. coli*-Infektionsdosis von 250 CFU/ml wurde mit entsprechenden Teilen steriler 0,9%iger NaCl-Lösung eingestellt und durch Ausplattieren sowie Inkubation bei 37°C über 24h kontrolliert. Die Infektionsdosis für *S. aureus* betrug 5000 CFU/ml und wurde nach der gleichen Methode eingestellt und kontrolliert.

### 3.3.4 Experimentelle Infektion einzelner Euterviertel

Zum Melken wurde den Kühen 2ml Oxytozin i.v. injiziert, anschließend wurden diese mit der 4/4-Melkmaschine ausgemolken. Die gewonnene Milchmenge pro Viertel wurde dokumentiert. Die Zitze, insbesondere die Zitzenkuppe, des zu infizierenden Viertels wurde mit 70%igem Ethanol getränktem Haushaltspapier gründlich gereinigt. Die Infektionsdosis wurde in einem Volumen von 2ml mittels einer Einwegspritze und einer sterilen Zitzenkanüle in die Zitzenzisterne instilliert. Die Zitzenkuppe wurde dabei mit Daumen und Zeigefinger

zusammengehalten während die Zitzenkanüle aus dem Zitzenkanal entfernt wurde, um ein Zurücklaufen der Infektionsdosis zu verhindern. Bei verschlossenem Zitzenkanal wurde dann mit der anderen Hand der Inhalt in der Zitzenzisterne 5-mal Richtung Drüsenzisterne ausgestrichen und anschließend das Drüsengewebe 30 Sekunden lang durchmassiert, um eine Verteilung der Infektionsdosis zu erreichen. In ein weiteres Viertel wurde nach dem gleichen Vorgehen 2ml Pyrogen-freie 0,9%ige NaCl-Lösung infundiert. Diese Viertel dienten als Placebo-Viertel und wurden mit einem weiteren Viertel, was keine Behandlung erhielt, verglichen (Kontrollviertel).

### **3.3.5 Gewinnung der Milchproben**

Vor Beginn des Melkens wurden per Hand etwa 2ml Milch in die Vertiefungen einer California Mastitis Test (CMT)-Schale gemolken. Anschließend wurde die Milch grobsinnlich beurteilt und der CMT durchgeführt. Die Zitzen wurden dann nass von groben Verschmutzungen gereinigt und die Zitzenkuppen mit 70%igem Ethanol getränktem Zellstoff gründlich desinfiziert. Danach wurden aus jedem Viertel ca. 5ml Milch steril entnommen und zur bakteriologischen Untersuchung umgehend ins Labor gebracht. Nach kurzem manuellen Anrühren des Euters wurde die 4/4-Melkmaschine ans Euter angesetzt. Nach Beendigung des Melkakts wurde die Milchmenge pro Viertel gemessen und Milch zur Untersuchung auf Inhaltstoffe und Zellgehalt (siehe 3.3.9), zur Zellcharakterisierung und -quantifizierung (siehe 3.3.10) entnommen.

### **3.3.6 Erhebung und Beurteilung allgemeiner klinischer Parameter**

Der klinische Status der Tiere wurde zu folgenden Zeitpunkten überprüft:

#### ***Gruppe E. coli 6h (E.c.6h, n = 5):***

Dreimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer der LMU München, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor Infektion, zu den Zeitpunkten 3h und 6h nach Infektion. Die rektale Körpertemperatur wurde im Infektionsversuch stündlich gemessen und dokumentiert.

**Gruppe *E. coli* 24h (*E.c.24h*, n = 5):**

Dreimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer der LMU München, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor Infektion, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h und 24h nach Infektion. Die rektale Körpertemperatur wurde im Infektionsversuch stündlich gemessen und dokumentiert.

**Gruppe *S. aureus* 72h (*S.a.72h*, n = 5):**

Dreimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer der LMU München, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor Infektion, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h nach Infektion. Die *S. aureus*-Tiere wurden über einen längeren Zeitpunkt beobachtet, um eine subklinische Infektion zu verifizieren.

**Gruppe Goldstandard (*GS*, n = 11):**

Dreimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer der LMU München, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor Versuchsbeginn, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h und 24h nach Versuchsbeginn (n = 6). 5 Tiere wurden darüberhinaus noch zu den Zeitpunkten 36h, 48h, 60h und 72h nach Versuchsbeginn untersucht.

Zu den Beobachtungszeitpunkten wurde die rektale Körpertemperatur, die Herzfrequenz, die Schleimhautfarbe, die Pansenmotorik, die Futteraufnahme, die Körperhaltung und das Verhalten der Tiere festgestellt, dokumentiert und hinsichtlich des Grades einer Störung bewertet (siehe Tabelle 8).

**3.3.7 Erhebung und Beurteilung von klinischen Parametern am Euter****3.3.7.1 Adspektion des Euters**

Die Adspektion des Euters wurde ab Versuchsbeginn und zu jedem Beobachtungszeitpunkt nach der Infektion ausgeführt und dabei das infizierte Euterviertel vergleichend zu den nicht infizierten Eutervierteln beurteilt. Beschrieben wurden dabei die Farbe der Euterhaut und die Abweichung in der Größe in den Abstufungen geringgradig, mittelgradig und hochgradig vergrößert.

### 3.3.7.2 Palpation des Euters

Die manuelle Palpation des Eutergewebes als Hinweis auf entzündliche Veränderungen wurde ab Versuchsbeginn jeweils am ausgemolkenen Euter zu jeder Melkzeit (alle 12 Stunden) durchgeführt. Die in Tabelle 6 dargestellte Einteilung diente dazu, den Grad der Veränderungen in Stufen einzuteilen. Eine Veränderung des Palpationsbefundes von bspw. Grad II zu V würde 3 Stufen entsprechen.

**Tabelle 6: Dokumentation des Euterpalpationsbefundes (Rosenberger, 1990)**

<b>o.b.B.</b>	Insgesamt feinkörnig und weich (ausgemolken)
<b>I</b>	Insgesamt grobkörnig, aber weich
<b>II</b>	Allgemein grobkörnig-derb mit einzelnen Knoten
<b>III</b>	Allgemein grobknotig
<b>IV</b>	Grobknotig mit einzelnen diffusen Verhärtungen
<b>V</b>	Insgesamt diffus verhärtet
<b>VI</b>	Akut geschwollen, vermehrt warm und schmerzhaft, Ödem

### 3.3.7.3 Beurteilung des Eutersekrets

Zu jeder Melkzeit während der Beobachtungszeit wurde in einer schwarzen Viertelgemelksschale die Beschaffenheit des Eutersekrets beurteilt und dokumentiert. Tabelle 7 zeigt die Einteilung der Eutersekretbefundung.

**Tabelle 7: Einteilung des Eutersekretbefundes (Rosenberger, 1990)**

<b>o.b.B.</b>	normaler Milchcharakter ohne besonderen Befund
<b>A</b>	Milchcharakter erhalten, wässrig ohne Flocken
<b>B</b>	Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken
<b>C</b>	Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken
<b>D</b>	Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken
<b>E</b>	Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken
<b>F</b>	Milchcharakter völlig aufgehoben

Zur Zusammenfassung der wichtigsten klinischen Parameter wurde ein „klinischer Score“ genutzt (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Punkteschema zur Feststellung der Ausprägung ausgesuchter klinischer Parameter nach experimentell induzierter Mastitis (klinischer Score)**

<b>Punkte</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
	<b>(keine Veränderung)</b>	<b>(ggr. Veränderung)</b>	<b>(mgr. Veränderung)</b>	<b>(hgr. Veränderung)</b>
<b>Rektale Temperatur (°C)</b>	37,8-39,2	39,3-40	40-41	>41
<b>Sekret</b>	o.B.	Milchcharakter erhalten, einige kleine bis wenige grobe Flocken	Milchcharakter erhalten, viele kleine und grobe Flocken	Verlust des Milchcharakters
<b>Veränderungen des Euterpalpationsbefundes<sup>1</sup></b>	0	1	2-3	>4
<b>Verlust der Milchleistung</b>	<20%	21-40%	41-80%	>80%
<b>Allgemeinbefinden</b>	o.B.	ggr. gestört	mgr. gestört	hgr. gestört
Summe der Bewertungen:	0-3	4-7	8-11	12-15
<b>Klinische Beurteilung:</b>	<i>Keine Veränderungen</i>	<i>ggr. Veränderungen</i>	<i>mgr. Veränderungen</i>	<i>hgr. Veränderungen</i>

Bewertet wurde jeweils die maximale Ausprägung einer klinischen Veränderung pro Tier während einer 24- oder 72-stündigen Versuchsdauer. <sup>1</sup> graduelle Abweichung vom Palpationsbefund vor der Infektion. Abkürzungen: o.B. = ohne Befund, ggr. = geringgradig, mgr. = mittelgradig, hgr. = hochgradig

### 3.3.8 Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets

Die unter antiseptischen Bedingungen entnommene Milch wurde unmittelbar nach der Entnahme auf Eis gelagert. Aus jeder Milchprobe wurde mittels einer sterilen Impföse (Durchmesser 5mm) durch einmaliges Eintauchen die nochmals resuspendierte Milch entnommen und jeweils auf Columbia Schafblut-Agar, Edwards-Nährboden mit Schafblut und Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (siehe 3.2.3) ausgestrichen. Vom Eutersekret aus den infizierten Vierteln wurden zusätzlich die Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt und jeweils 100µl auf den o.g. Nährböden ausgestrichen, um die bakterielle Kontamination (CFU/ml) des Eutersekrets quantifizieren zu können. Die Agarplatten wurden anschließend über 12-24h bei 37°C im Brutschrank bebrütet und die Kolonien ausgezählt. Anschliessend wurden die Platten über weitere 24-36h (insgesamt 48h) bebrütet und erneut ausgewertet.

### 3.3.9 Bestimmung der Inhaltstoffe und des somatischen Zellgehaltes (SCC) der Milch

Die in spezielle Gefäße, in denen das Konservierungsmittel Acidiol vorgelegt war, überführten Milchproben wurden an das Zentrallabor des Milchprüfings Bayern in Wolnzach gesandt. Die Bestimmung des SCC erfolgte durch fluoreszenzoptische Zählung somatischer Zellen (1000/ml) in Rohmilch mit dem Fossomatic<sup>®</sup>-5000. Die Untersuchung der Rohmilch auf Fett- und Eiweißgehalt (%) erfolgte mit einer Infrarot-spektroskopischen Methode mit dem MilcoScan-FT-6000. Die Untersuchung auf den Laktosegehalt (%) und Harnstoffgehalt (mg/l) erfolgte ebenfalls mit dem MilcoScan-FT-6000 nach einer Hausmethode der Firma FOSS Deutschland, Hamburg.

Zusätzlich zur fluoreszenzoptischen Zählung beim Milchprüfung Bayern wurde der SCC stets parallel in der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim mit einem DeLaval cell counter DCC bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt dabei durch fluoreszenzoptische Messung ( $1 \cdot 10^3/\text{ml}$ ).

### 3.3.10 Aufarbeitung der Milchproben für die durchflusszytometrische Zellcharakterisierung

Die Aufarbeitung der Milchproben erfolgte stets auf Eis und unmittelbar nach ihrer Gewinnung, um verfälschte Ergebnisse durch absterbende Zellen zu vermeiden. Für die Durchflusszytometrie wurden 10ml Milch aus dem Hauptgemelk in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben, in dem bereits 40ml PBS vorgelegt waren. Die Suspension wurde zentrifugiert (400 x g, 10min., 4°C, ohne Bremse). Der Rahm, der sich am oberen Rand des Gefäßes abgesetzt hatte, wurde vorsichtig mit einem Spatel gelöst und mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt; danach wurde der flüssige Überstand ohne abzusetzen dekantiert. Das verbleibende Zellpellet wurde in 50ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (400 x g, 10min., 4°C, ohne Bremse). Der Überstand wurde erneut verworfen und das wieder in 50ml PBS resuspendierte Zellpellet noch einmal abzentrifugiert (400 x g, 10min., 4°C, ohne Bremse). Die Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert, nachdem der Überstand erneut verworfen worden war. Von dieser Suspension wurden 100µl auf ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen eingestellt und in ein FCM-Röhrchen gegeben, in das 200µl Trägerflüssigkeit (4µg/ml Propidiumiodid) und 15µl Acridin-Orange-Lösung vorgelegt worden waren.

### 3.3.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Partikeln nach Größe und Oberflächenbeschaffenheit. Mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit werden Einzelzellen in einem Probenführungssystem an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei wird gestreutes Licht einer speziellen Wellenlänge (hier 488 nm) in Richtung des Strahls als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) oder im 90°-Winkel dazu als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) erfasst. Die Partikelgröße und dessen Refraktionsindex werden dabei durch die Vorwärtsstreuung, die Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) eines Partikels durch die Seitwärtsstreuung charakterisiert. Die Streuung des Laserlichts wird mittels Photodiode (FSC) oder Photomultiplier (SSC) erfasst und an einen angeschlossenen Computer weitergeleitet, mit dessen Hilfe auch die Geräteeinstellungen kontrolliert werden. Im Computer werden ebenso die Messereignisse erfasst und gespeichert (Ormerod, 1990; Radbruch, 1992).

Bei diesen Versuchen kam ein FACScan<sup>®</sup>-Durchflusszytometer (mit einem Argonlaser mit einer Lichtemission einer Wellenlänge 488nm) zum Einsatz. Mit entsprechenden Detektoren erfasst das Gerät Fluoreszenzlicht-Emissionen in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen: FL-1 = Grünfluoreszenz der Wellenlänge 515-545nm; FL-2 = Orangefluoreszenz der Wellenlänge 564-606nm; FL-3 = Rotfluoreszenz der Wellenlänge >650nm. Durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3) wird damit jedes Messereignis charakterisiert.

Die computergestützte Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FCS Express V3. Ergebnisse wurden mehrparametrisch als korrelierte Punkte- oder Dichtediagramme dargestellt. Die Werte der einzelnen Parameter hängen stark von den Einstellungen für FSC, SSC und die Fluoreszenzdetektoren ab. Um die einzelnen Messungen vergleichbar zu machen, wurden alle durchgeführten Messungen deshalb stets mit identischen Geräteeinstellungen erfasst (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Geräteeinstellungen am FACScan®-Durchflusszytometer zur Vitalitätsbeurteilung und Quantifizierung der Milchezellen nach Acridin-Orange/Propidiumiodid-Färbung**

Detector	Voltage	Amp / Gain	Mode	Threshold
FSC	E00	1,15	Lin	90
SSC	400	1,00	Lin	-
FL-1	358	-	Log	-
FL-3	350	-	Log	-

Abkürzungen: FSC = Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), SCC = Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), FL-1 = Grünfluoreszenz, FL-3 = Rotfluoreszenz, Lin = linear, Log = logarithmisch, Amp = Amplifikation (Verstärkung)

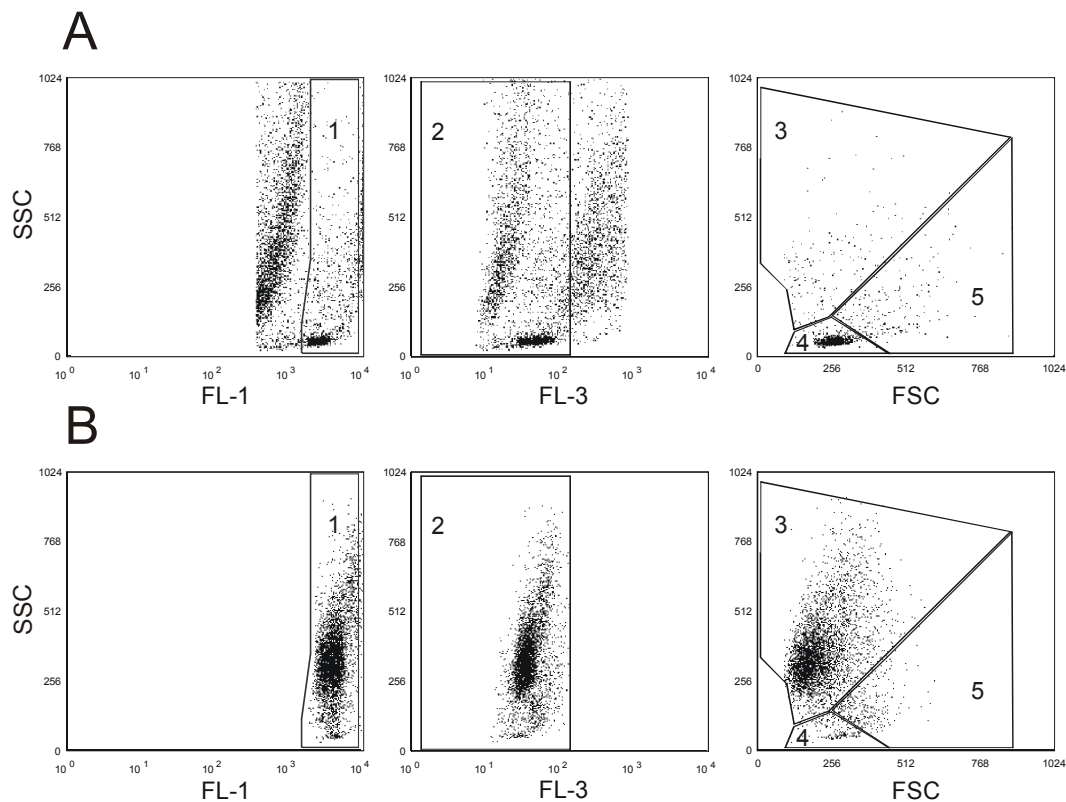
### 3.3.12 Vitalitätsbeurteilung und Quantifizierung der Milchezellen nach Acridin-Orange/Propidiumiodid-Färbung

Die Vitalität der Zellen wurde beurteilt, indem die Zellsuspensionen mit einer Acridin-Orange-Lösung versetzt wurden. Acridin-Orange dringt in die Zelle ein und interkaliert mit der doppelsträngigen DNA. Der Kern erscheint unter UV-Anregung dann grünfluoreszierend. Bei Schädigungen der Zellmembran kann das Fluorochrom Propidiumiodid (PI) in die Zelle eindringen und mit der DNA interkalieren. Tote Zellen sind nach durchflusszytometrischer Analyse im FL-3-Kanal (Rotfluoreszenz) erfassbar und können dadurch von ungeschädigten Zellen unterschieden werden.

Nach der Messung wurden softwaregestützt elektronische „Fenster“ (sog. „Gates“) gesetzt, um einzelne Untergruppen der Messereignisse („Events“) zu definieren und zum Teil mehrere Fenster logisch miteinander zu verknüpfen. Dazu wurden die Proben zunächst im Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen Grünfluoreszenz (FL-1) erfasst, um nicht kernhaltige Ereignisse von der Erfassung auszuschließen und ein Fenster („live-gate“) auf die grünfluoreszierenden, Acridin-Orange-positiven Ereignisse gesetzt. Nachdem diese Ereignisse erfasst waren, wurde im FL3/SSC-Punktediagramm ein Fenster auf Propidiumiodid-negative Ereignisse gesetzt und davon die morphologisch als Zellen erkennbaren Ereignisse in einem weiteren Fenster identifiziert. Wie bei Petzl (2005) beschrieben können im Punktediagramm FSC/SSC einzelne Zellsubpopulationen, wie PMN, lymphoide Zellen und Makrophagen oder Epithelzellen, anhand ihrer morphologischen Charakteristika identifiziert und durch die



Zählung der Ereignisse auch quantitativ erfasst werden (siehe Abbildung 1). Durch die Zahl der somatischen Zellen (SCC) in jeder Milchprobe, die auch erfasst wurde (siehe 3.3.9), konnten so die absoluten Zahlen der einzelnen Zellsubpopulationen pro ml Milch errechnet werden.



**Abbildung 1: Durchflusszytometrische Analyse einzelner vitaler Milchezellpopulationen anhand ihrer Anfärbbarkeit und Morphologie in niedrig- und hochzelliger Milch**

Dargestellt sind Punktediagramme nach Erfassung von 20.000 Ereignissen niedrig- (A) wie hochzelliger (B) Milch im Durchflusszytometer. FL-1: (Grünfluoreszenz gegen Komplexität) Identifizierung Fluoreszenz-positiver, kernhaltiger Ereignisse (Region 1). FL-3: (Rotfluoreszenz gegen Komplexität) Identifizierung der PI-negativen Ereignisse (Region 2 = vitale Zellen) FSC: Darstellung der Morphologie (Größe gegen Komplexität): PMN (Region 3), Lymphozyten (Region 4), Makrophagen und Epithelzellen (Region 5).

### 3.3.13 Membranimmunfluoreszenz (MIF)

#### 3.3.13.1 Vorbereitung der Milchproben für die Milchezellcharakterisierung mittels Membranimmunfluoreszenz

Von den Viertelgemelken wurden jeweils 25ml Milch in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben und gekühlt. Die Milch wurde mit PBS 1:2 verdünnt und bei 400 x g, 10min. und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Der abgesetzte Rahm wurde anschließend vorsichtig mit dem Spatel vom Gefäßrand gelöst und mittels Wasserstrahlpumpe entfernt. Der flüssige Überstand wurde unter Schonung des Zellpellets dekantiert. Das Zellpellet wurde in 50ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (400 x g, 10min., 4°C, ohne Bremse). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 800µl PBS resuspendiert und mittels Bürker-Zählkammer die Zellsuspensionsdichte bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden auf ca.  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml PBS eingestellt.

#### 3.3.13.2 Milchezellcharakterisierung durch Membranimmunfluoreszenz

Die Membranimmunfluoreszenz (MIF) ist ein Verfahren zum Nachweis der Expression von Oberflächenstrukturen auf Zellen. Spezifische Fluorochrom-markierte Antikörper binden hierbei an diese Strukturen. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Identifizierung lymphoider Zellen und Makrophagen in der Milch genutzt.

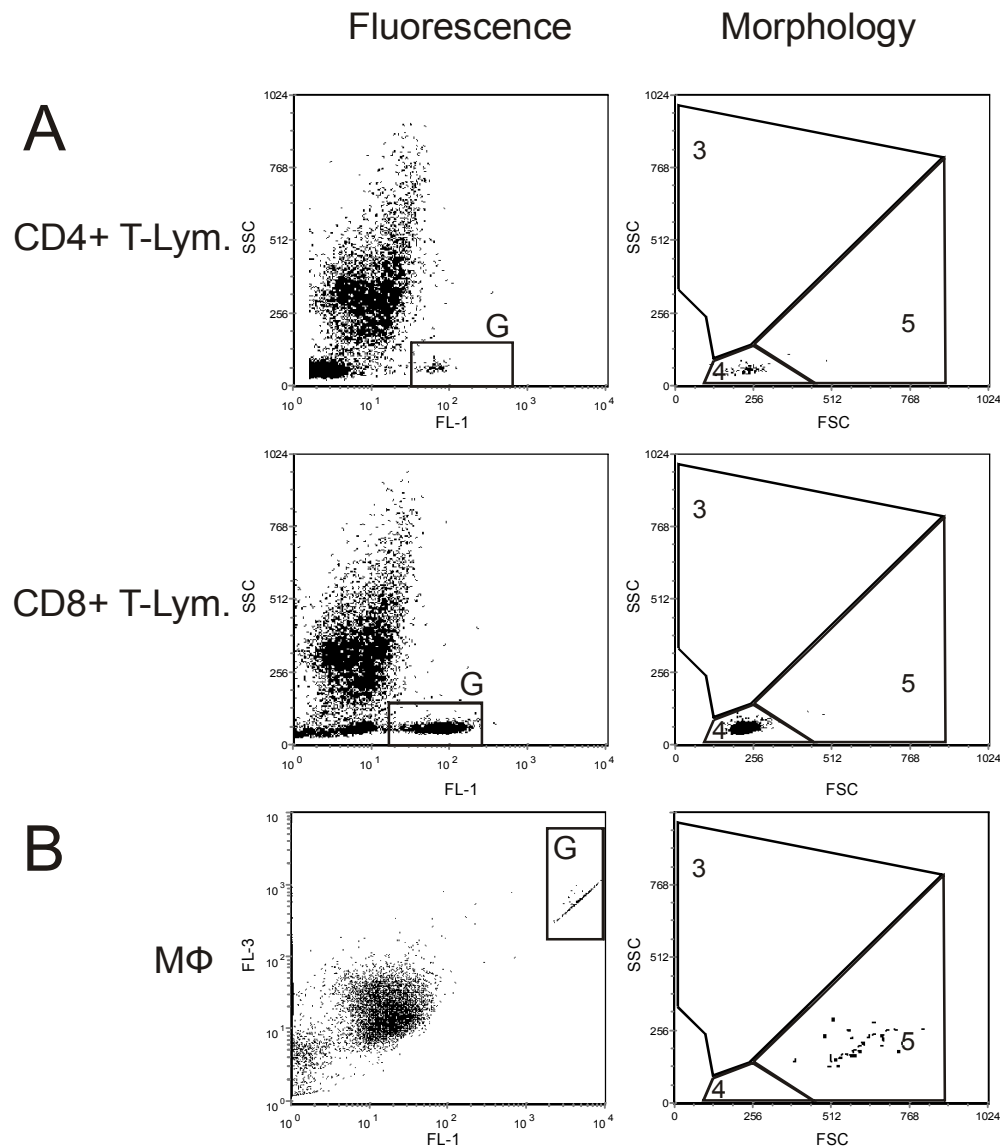
Die Aufarbeitung der Milchezellproben erfolgte auf Eis und unmittelbar nach ihrer Gewinnung. Für die MIF wurden für jeden Antikörperansatz  $3 \cdot 10^5$  Zellen der separierten Zellen in Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben und bei 260 x g, 4min. und 4°C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und das Zellpellet auf dem Rüttler resuspendiert. Es folgte ein Waschschrift mit 150µl MIF-Puffer (4°C). Nach Zentrifugation bei 260 x g und 4°C über 4min. wurden die Zellpellets resuspendiert. Es wurden jeweils 2µl von MouseAntiBovineCD4:FitcAntikörperlösung oder MouseAntiHuman CD14:RPE-AlexaFluor® 647Antikörperlösung oder 10µl von MouseAntiBovine CD8BETA:RPE Antikörperlösung oder von MouseAntiSheep MHCclassIIDQDR-Polymorphic:Fitc Antikörperlösung in die jeweiligen Vertiefungen gegeben und 30min. bei 4°C auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen zweimal mit 150µl gekühltem MIF-Puffer gewaschen und nach dem Resuspendieren in FCM-Röhrchen überführt, in denen 100µl Trägerflüssigkeit vorgelegt war. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Erfassung.

Zunächst wurden die Proben im Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen Vorwärtsstreulicht (FSC) erfasst und ein Fenster (*live-gate*) gesetzt, das leukozytäre Zellen anhand ihrer Morphologie definiert. Einzelne Zellsubpopulationen wurden anhand der Grünfluoreszenz im Kanal FL-1 erfasst und relativ quantifiziert. Aus der Verrechnung mit der SCC-Zahl wurden die absoluten Zahlen der einzelnen Zellpopulationen pro ml Milch ermittelt.

Zur Ermittlung der T-Zellsubpopulationen wurde anhand morphologischer Kriterien (in FSC/SSC-Dotplots) die Fraktion der lymphoiden Zellen identifiziert. Unter diesen wurden die Anteile der Zellen bestimmt, die sich mit den Primärantikörpern gegen CD4 und CD8 anfärben ließen (siehe Abbildung 2, oben, Mitte).

Da bovine PMN in Milch bekanntermaßen wie Makrophagen den LPS-Corezeptor mCD14 exprimieren, mussten Makrophagen in der Milch anhand einer Doppelfärbung dargestellt werden. Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen exprimieren sie neben mCD14 ebenfalls MHC Klasse II. Ereignisse, die sich in der MIF für beide Moleküle anfärben ließen, wurden als Makrophagen identifiziert (siehe Abbildung 2, unten).

Die Membranimmunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit in erster Linie dafür eingesetzt, die Gates in der Acridin-Orange- und Propidiumiodid-Färbung zu verifizieren.



**Abbildung 2: Durchflusszytometrische Bestimmung vitaler lymphoider Zellen und Makrophagen in der Milch nach indirekter Membranimmunfluoreszenz.**

Punktediagramme nach durchflusszytometrischer Erfassung von 20.000 Ereignissen. Erste Spalte FL-1: (Grünfluoreszenz gegen Komplexität) Identifizierung Fluoreszenz-positiver, Ereignisse (G=Gate). Zweite Spalte FSC: Darstellung der Morphologie (Größe gegen Komplexität). A = SSC gegen FL-1, B = FL-3 gegen FL-1. Von den Populationen wird in der zweiten Spalte der Anteil an CD4+-T-Lymphozyten (Lym), CD8+-T-Lymphozyten und Makrophagen (MΦ) nach direkter Membranimmunfluoreszenz mit spezifischen Primäantikörpern (siehe Tabelle 5) bestimmt. Die Bestimmung des Anteils der jeweiligen Zellpopulation erfolgte durch Setzen eines Fensters (4= Lymphozyten, 5= Makrophagen).

### 3.3.14 Klinische Labordiagnostik

Das Differentialblutbild und das rote Blutbild wurden im klinischen Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München angefertigt. Das rote Blutbild wurde mittels eines Sysmex pocH100i angefertigt. Für das Differentialblutbild wurde ein Blutausschrieb nach Pappenheim gefärbt und mikroskopisch differenziert. Die Tiere wurden zunächst unmittelbar nach der Aufstallung und im Versuch zu den Zeitpunkten 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h p.i. (je nach Versuchsdauer) untersucht.

### 3.3.15 Progesteron- und Östrogenbestimmung

#### *Progesteronbestimmung im Blutplasma*

Für das Monitoring der Zyklussynchronisation wurde im Hormon-Labor der Klinik für Wiederkäuer der Gehalt an Progesteron im Blutplasma bestimmt. Hierfür wurde ein Enzym-Immuno-Assay (EIA), wie bei Prakash (1987) beschrieben, verwendet. Zum Einsatz kam ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Antigen: Progesteron-7 $\alpha$ -BSA; Marker: Progesteron-6 $\beta$ -HRP). Die Nachweisgrenze der Progesteronmessung „signifikant verschieden zu 0“ war 0,2pg pro Well. Alle Intra- und Interassayvariationen waren < 9,5%. Der Progesterongehalt wurde zu den Zeitpunkten 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h p.i. (je nach Versuchsdauer) untersucht.

#### *Gesamtöstrogenbestimmung im Blutplasma*

Die Bestimmung des Gesamtöstrogengehaltes im Blutplasma erfolgte nach Hydrolyse (0,4% Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*) und Ether-Extraktion nach der von Meyer (1997) beschriebenen Methode mittels eines EIA. Zum Einsatz kam ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Antigen: 17 $\beta$ -Estradiol-17HS-BSA; Marker: 17 $\beta$ -Estradiol-17HS-HRP). Die Intra- und Interassayvariation betrug 12%. Die Nachweisgrenze der Östrogenmessung „signifikant verschieden zu 0“ lag bei 0,03pmol/ml.

### 3.3.16 Gewinnung von venösem Blut

Das Blut wurde durch Punktion der *Vena jugularis* unter antiseptischen Kautelen nach Fixierung des Tieres und manueller Stauung des Gefäßes gewonnen. Zur Blutentnahme wurde das Vacutainersystem (mit EDTA) für die Gewinnung von Blutleukozyten und Blutplasma eingesetzt.

### 3.3.17 Gewinnung von Blutplasma

Das mit EDTA-Vacutainern entnommene Blut wurde bei Raumtemperatur 10min. stehengelassen. Die Röhrchen wurden anschließend bei 2000 x g über 10min. bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde vorsichtig mit einer Eppendorfpipette abgesaugt. Dabei war zu beachten, dass der Blutkuchen nicht aufgeschwemmt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Plasma bei 4°C kühl gehalten oder bei -20°C eingefroren.

### 3.3.18 Gewinnung von Gewebeproben

Die Teilsektion der Versuchstiere wurde in der Pathologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim durch Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Hafner-Marx durchgeführt. Die Tiere wurden je nach Versuchsdauer 6h, 24h oder 72h nach Versuchsbeginn durch Betäubung mit Bolzenschuss und anschließenden Blutenzug getötet. Innerhalb von 20min. nach der Tötung wurden Eutergewebe- und Lymphknotenproben unter sterilen Bedingungen entnommen.

Gewebeproben für die pathologisch-histologischen Untersuchungen wurden in 4%iger Formalin-Lsg. fixiert. Für die PCR wurden die Proben in 3,6ml Cryotubes mit vorgelegten 2,5ml RNALater<sup>®</sup> aufgenommen und nach 24stündiger Lagerung bei 4°C auf -80°C heruntergefroren und bis zur Aufarbeitung und Analyse tiefgefroren gelagert.

Für die Gewinnung von Milchdrüsengewebe wurde ein 5 x 5 x 5 cm großes Stück aus einem zentral gelegenen Teil des Drüsenkörpers ca. 7 cm dorsal der Drüsenzisterne entnommen. Ein weiteres 5 x 5 x 5 cm großes Stück wurde ca. 5 cm über der ersten Lokalisation entnommen, um eventuelle Effekte unterschiedlicher Erregerverteilungen erfassen zu können. Nach Wechseln des Präparationsbestecks wurde unter antiseptischen Bedingungen zentrale Gewebestücke (2 x 2 x 2 cm) für die Transkriptom- und Kandidatengenanalyse und zur Anfertigung von Gewebeschnitten herauspräpariert.

Für die Gewinnung von Lymphknotengewebe wurden die *Lnn. mammarii* (Euterlymphknoten) und die *Lnn. cervicales superficiales* (Buglymphknoten) frei präpariert. Hier wurde ebenfalls jeweils ein 2 x 2 x 2 cm großes Stück für die Transkriptom- und Kandidatengenanalyse und zur Anfertigung von Gewebeschnitten herauspräpariert.

Die Herstellung der Gewebeschnitte wie auch die pathologisch-histologischen Untersuchungen wurden in der Pathologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und

Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim durch Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Hafner-Marx durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Gewebeproben und Durchführung der PCR erfolgte freundlicherweise im Labor von Prof. Hans-Martin Seyfert des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf.

Die PCR wurde wie bei Petzl *et al.* (2008) beschrieben durchgeführt. Zusammengefasst erfolgten die Aufarbeitung und die Analyse wie folgt: Die in RNALater<sup>®</sup> (3.2.3) überführten Proben wurden mit Trizol<sup>®</sup> Reagenz (3.2.3) homogenisiert (1 ml Trizol<sup>®</sup> je ~100mg Gewebe), Inkubation des Homogenates für 5min. bei Raumtemperatur sowie Abtrennung des Zelldetritus durch Zentrifugation (12.000 x g; 5min., 4°C).

Zur RNA-Aufreinigung wurden anschließend 0,2 Volumenanteile (Vol) Chloroform zugesetzt und die Proben gründlich durchmischt. Zur Phasentrennung wurde die Probe im Anschluss abzentrifugiert (12.000 x g; 15min., 4°C) und die RNA-haltige wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt. Hieraus wurde die RNA anschließend durch Zusatz von 0,5Vol Isopropanol präzipitiert. Nach 10min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA abzentrifugiert (12.000 x g, 10min.), einmal mit 75% Alkohol gewaschen und nach kurzer Trocknung in sterilem, redestilliertem, RNase-freiem Wasser gelöst.

Die RNA-Konzentration wurde im Spektralphotometer bestimmt. Gemessen wurden die Absorptionen bei 260nm, 280nm und 320nm. Zur Mengenbestimmung wurde davon ausgegangen, dass RNA in einer Konzentration von 50µg/ml bei einer Messwellenlänge von 260 nm eine Absorption von 1 Einheit verursacht, wenn die Schichtdicke 1cm beträgt.

Zur Bestimmung der Qualität der gewonnenen RNA wurde eine Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt.

#### *Reverse Transkription der RNA in cDNA*

1,5µg der gewonnenen RNA wurde mithilfe der RT-PCR SuperScript III<sup>®</sup> Reverse Transkriptase (3.2.3) nach dem Protokoll der Firma Invitrogen in cDNA umgewandelt.

#### *Aufreinigung der cDNA*

Eine anschließende Aufreinigung der cDNA geschah mithilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche (3.2.3) entsprechend der Anleitung des Herstellers.

### *Quantifizierung der cDNA mittels Realtime RT-PCR*

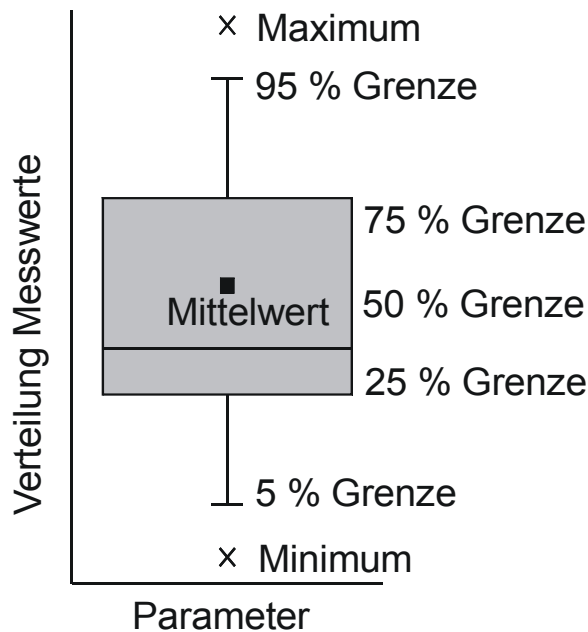
Im Gegensatz zur semiquantitativen PCR kann bei der Real-Time PCR der gesamte Amplifikationsprozess verfolgt werden. Mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunimmt, kann so direkt auf die enthaltene Menge einer Nukleotidsequenz geschlossen werden. Es wurde das einfarbige Detektionssystem SYBR green<sup>®</sup> [“Fast Start DNA Master Plus SYBR green”; siehe 3.2.3] eingesetzt. SYBR green<sup>®</sup> wird zur Fluoreszenz durch Einlagerung in neusynthetisierte Doppelstränge befähigt, was mit dem Amplifikationsprozess korreliert. So kann der Prozess verfolgt werden. Alle Gene wurden mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen, die Mess-Temperatur wurde entsprechend den Primereigenschaften angepasst.

### **3.3.19 Statistische Verfahren**

Die Daten wurden mit Excel (2007, Microsoft), Origin (Version 8) und SAS (Version 9.1) ausgewertet.

Einige Daten werden im Ergebnisteil in Form von Boxplots dargestellt. Der Boxplot dient der Darstellung statistischer Auswertungen der Messwertverteilung. Abbildung 3 zeigt einen exemplarischen Boxplot zur Erläuterung. Das untere Kreuz zeigt den Minimalwert an, und das untere Ende der vertikalen Linie bezeichnet die 5%-Grenze. Die untere Begrenzung der Box markiert die 25%-, die mittlere Linie die 50%- und die obere Begrenzung die 75%-Grenze. Innerhalb der Box liegen also 50% aller gemessenen Werte. Das Quadrat gibt das arithmetische Mittel aller Messwerte an. Das obere Ende der vertikalen Linie bezeichnet die 95%-Grenze. Das obere Kreuz zeigt den maximalen Messwert an.  $\bar{x}$  55 (20-65) im Textteil bedeutet Median 55, 1. Quartil 20 und 3. Quartil 65.





**Abbildung 3: Exemplarischer Aufbau eines Boxplots mit statistischen Kennzahlen**

Boxplots wurden für kontinuierliche Parameter erstellt, die zwischen verschiedenen Gruppen verglichen wurden. Nachdem nicht alle Daten normalverteilt waren, kamen nicht-parametrische Tests zur Anwendung. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt mit anschließenden paarweisen Mann-Whitney-U-Tests, bei denen zusätzlich noch eine Bonferroni-Korrektur angewandt wurde. Für einige Parameter wurden die Differenzen zu den Ausgangswerten oder zu den Werten der vorherigen Messung berechnet und statistisch verglichen.

Der Variationskoeffizient ( $\text{Stabw}/\text{MW} \cdot 100$ ) wurde für die Leukozytenzahl aus den Messungen vor Versuchsbeginn errechnet. Nachdem die Leukozytenzahl normalverteilt war, wurde diese mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließenden Tukey-post-hoc-Tests auf Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht.

Der Temperaturverlauf und die Zellzahlen der Milch wurden mittels Mixed Model (Proc Mixed in SAS) ausgewertet, dabei wurde für wiederholte Messungen korrigiert und das Tier als zufälliger Effekt eingegeben. Eine Bonferroni-Korrektur wurde für die post-hoc-Tests angewandt. Als statistische Signifikanzgrenze wurde  $p=0,05$  angesetzt.

Der Zusammenhang der Werte der somatischen Zellzahlen zwischen den beiden Messmethoden (Fossomatic und DCC) wurde mittels dem Pearson'schen Korrelationskoeffizienten bewertet.

## 4 Resultate

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines streng definierten Mastitismodells für das Rind. Es sollte vor allem die frühe Phase einer akuten klinischen (*E. coli*) sowie einer subklinisch bis chronischen (*S. aureus*) Mastitis simuliert werden. Mit Hilfe des erarbeiteten Modellsystems konnten frühe Wirtseffekte nach einem Erregerkontakt, insbesondere klinische Symptome sowie Veränderungen der Milchzellpopulationen und der Milchinhaltsstoffe erfasst werden.

### 4.1 Systemische Effekte im Rahmen der Modelle zur *E. coli*- und *S. aureus*-Mastitis

Zur Beurteilung des Schweregrades der klinischen Ausprägung einer experimentellen Euterinfektion in Abhängigkeit vom Keim wurden regelmäßig die rektale Körpertemperatur, das Allgemeinbefinden, das Differentialblutbild, die Milchleistung, der Euterpalpationsbefund, die Sekretbeschaffenheit und die somatische Zellzahl erhoben und dokumentiert.

Nach der Inokulation von *E. coli* und *S. aureus* lassen sich jeweils spezifische Effekte beobachten: Während bei den *E. coli* 24h-Tieren (*E.c.24h*) invariant 12h p.i. systemische klinische Symptome zu sehen waren, zeigten die *S. aureus* 72h-Tiere (*S.a.72h*) eine sehr starke Heterogenität in der Ausprägung der systemischen Effekte.

Im Folgenden sind die systemischen Auswirkungen der verschiedenen Infektionsmodelle dargestellt. Die Goldstandard-Tiere (GS) dienten als Kontrolle.

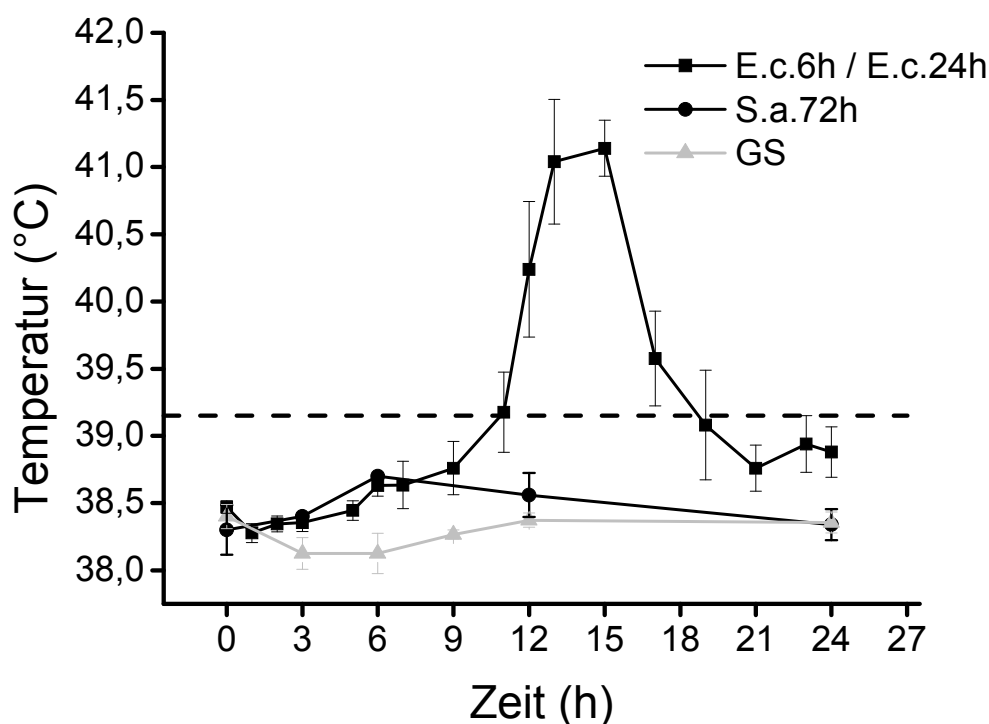
#### 4.1.1 Rektale Körpertemperatur

Bei den *E.c.24h*-Tieren wurde die rektale Körpertemperatur stündlich erfasst. Alle Probanden die über einen Zeitraum von 24h beobachtet wurden ( $n = 5$ ), zeigten zwischen 12h und 15h nach Infektion eine Erhöhung der Körpertemperatur (siehe Abbildung 4). Das Temperaturmaximum lag bei durchschnittlich  $41,04 \pm 0,46^\circ\text{C}$ . Zur Stunde 21 lag die Temperatur bei allen Tieren wieder im Normalbereich und blieb bis Versuchsende unterhalb der Fiebergrenze von  $39,2^\circ\text{C}$ . Bei der *E. coli* 6h-Gruppe (*E.c.6h*,  $n = 5$ ) wurde zu keinem Zeitpunkt die Fiebergrenze überschritten. Sie wurden aufgrund der gleichen Behandlung mit der *E.c.24h*-Gruppe bis zum Zeitpunkt 6h *post infectionem* (p.i.) zusammengefasst.

Bei der *S.a.72h*-Gruppe ( $n = 5$ ) wurde nach Versuchsbeginn zu den Zeitpunkten 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h p.i. die rektale Körpertemperatur bestimmt. Zu keinem der

Versuchszeitpunkte überschritt die Körpertemperatur die Fiebergrenze. In Abbildung 4 sind die ersten 24h dargestellt. Es gab signifikante Unterschiede zwischen der *E.c.24h*- und *S.a.72h*-Gruppe im Temperaturverlauf zu den verglichenen Zeitpunkten ( $p < 0,05$ , mixed model).

Die Gruppe GS ( $n = 11$ ) wurde nach Versuchsbeginn zu den Zeitpunkten 0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h je nach Versuchsdauer gemessen (siehe 3.3.6). Zu keinem Zeitpunkt überschritt die Körpertemperatur die Fiebergrenze. In Abbildung 4 sind nur die ersten 24h dargestellt.



**Abbildung 4: Verlauf der rektalen Körpertemperatur nach intramammärer Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus***

Dargestellt ist der Verlauf der Körpertemperatur ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) nach intramammärer Infektion, mit 500 CFU *E. coli* oder 10.000 CFU *S. aureus* in ein Euterviertel während der ersten 24h p.i. Die *E.c.*-Gruppen wurden in den ersten 6h zusammengefasst ( $n = 10$ ); im weiteren Verlauf sind nur noch  $n = 5$  Tiere dargestellt. In der *S.a.72h*-Gruppe beträgt die Tierzahl  $n = 5$ . Die Gruppe GS ( $n = 11$ ) erhielt keine Behandlung. Signifikante Unterschiede gab es zwischen der *E.c.24h*- und *S.a.72h*-Gruppe im Temperaturverlauf zu den verglichenen Zeitpunkten ( $p < 0,05$ , mixed model). Die gestrichelte Linie stellt die Fiebergrenze bei 39,2°C dar.

#### 4.1.2 Allgemeinbefinden

Zur Beurteilung des Schweregrades der Störung des Allgemeinbefindens während der Mastitis wurde zu den oben beschriebenen Zeitpunkten das Verhalten, die Herzfrequenz, Pansenmotorik, Schleimhautfarbe sowie die Futteraufnahme dokumentiert (siehe 3.3.6).

In den Gruppen *E.c.6h* und *S.a.72h* zeigte kein Tier Störungen des Allgemeinbefindens. Alle Tiere zeigten normale Futteraufnahme und physiologische Werte der untersuchten klinischen Parameter (siehe oben) während des jeweiligen Versuchszeitraums.

In der Gruppe *E.c.24h* hingegen zeigten alle Tiere 12h p.i. ein gestörtes Allgemeinbefinden. Die Futteraufnahme nahm bei allen 5 Tieren 12h p.i. stark ab oder sistierte für ca. 2-3h, sowohl die Pansenmotorik als auch die sensomotorische Erregbarkeit (Verhalten) waren geringgradig bis mittelgradig reduziert. Die Herzfrequenz sowie die Farbe der Schleimhäute blieben unverändert und die Episkleralgefäße waren fein gezeichnet. Der Allgemeinzustand war insgesamt mittelgradig gestört (siehe auch Tabelle 10), Sepsis wurde jedoch nicht diagnostiziert.

#### 4.1.3 Milchleistung

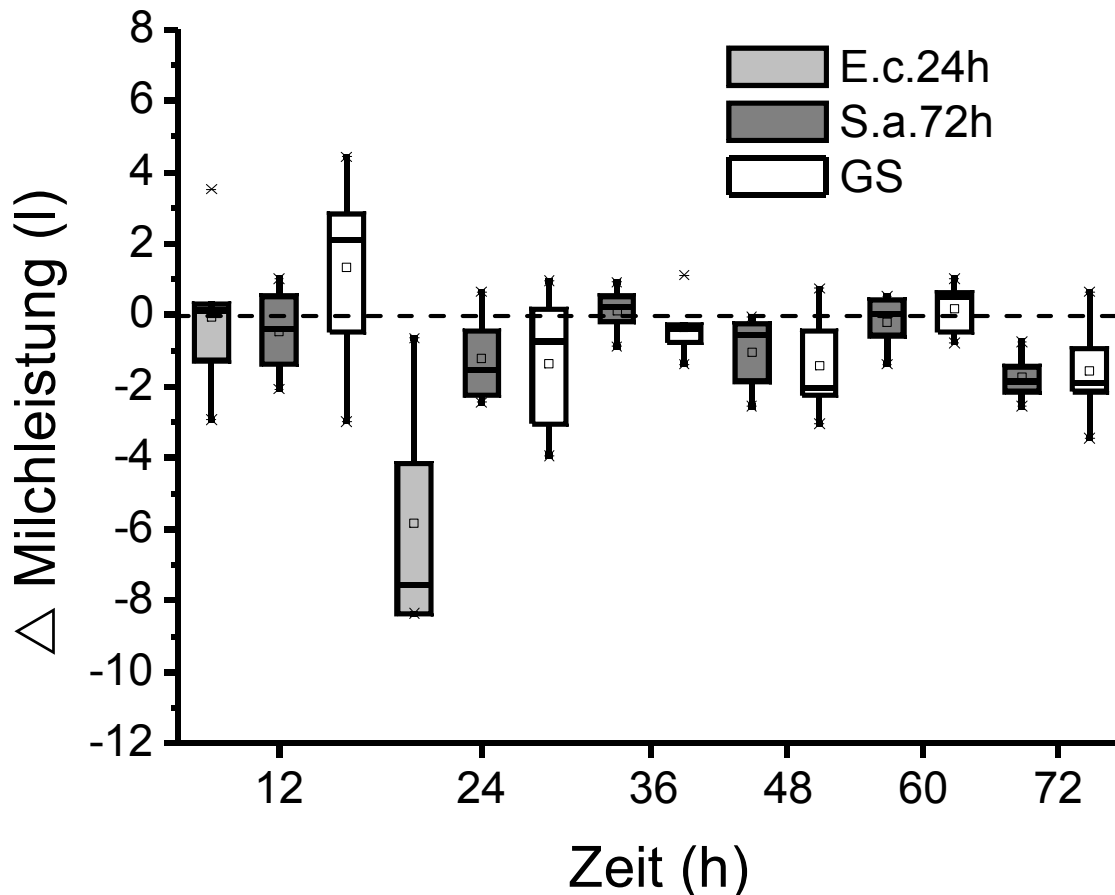
Die Milchleistung wurde während des Versuchs auf Viertelebene gemessen. Vor dem Versuch wurde die Leistung als gesamte Milchmenge pro Melkzeit zweimal täglich aufgezeichnet. Als Ausgangswerte wurden die Mittelwerte der Milchleistungen aus den dem Versuchsbeginn vorausgehenden fünf Morgengemelken ( $\bar{x}$  13,75  $\pm$  2,08 l) und Abendgemelken ( $\bar{x}$  11,48  $\pm$  1,61 l) berechnet. Anschließend wurde innerhalb des Versuchs die Differenz der Abendgemelke zum Durchschnitt der vorausgegangenen Abendgemelke und die Differenz der Morgengemelke zum Durchschnitt der vorausgegangenen Morgengemelke errechnet. Abbildung 5 zeigt die Entwicklung der Milchmenge nach Versuchsbeginn.

Alle Tiere wurden zu Versuchsbeginn (0h) mit Oxytozin behandelt (siehe 3.3.4). Der 0h-Wert wurde wegen der deutlich höheren Milchleistung nicht berücksichtigt. Ein Vergleich innerhalb der Gruppen ist dennoch möglich, da alle Gruppen die gleiche Behandlung erhalten haben.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Milchmenge zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion im Vergleich zu den Ausgangswerten festgestellt werden (siehe Abbildung 5). Schwankungen in der Milchleistung entsprachen

normalen Tagesschwankungen. Zum Zeitpunkt 24h p.i. zeigt die Gruppe *E.c.24h* eine deutliche Tendenz für einen Milchleistungsabfall, der sich aufgrund der interindividuellen Schwankungen jedoch als nicht signifikant erwies. Die Gruppe *S.a.72h* zeigt den gleichen Verlauf wie die Gruppe GS.

Die Gruppe *E.c.6h* wurde nicht dargestellt, da das Melkintervall deutlich verkürzt und daher keine Korrelation zu den letzten Gemelken möglich war.



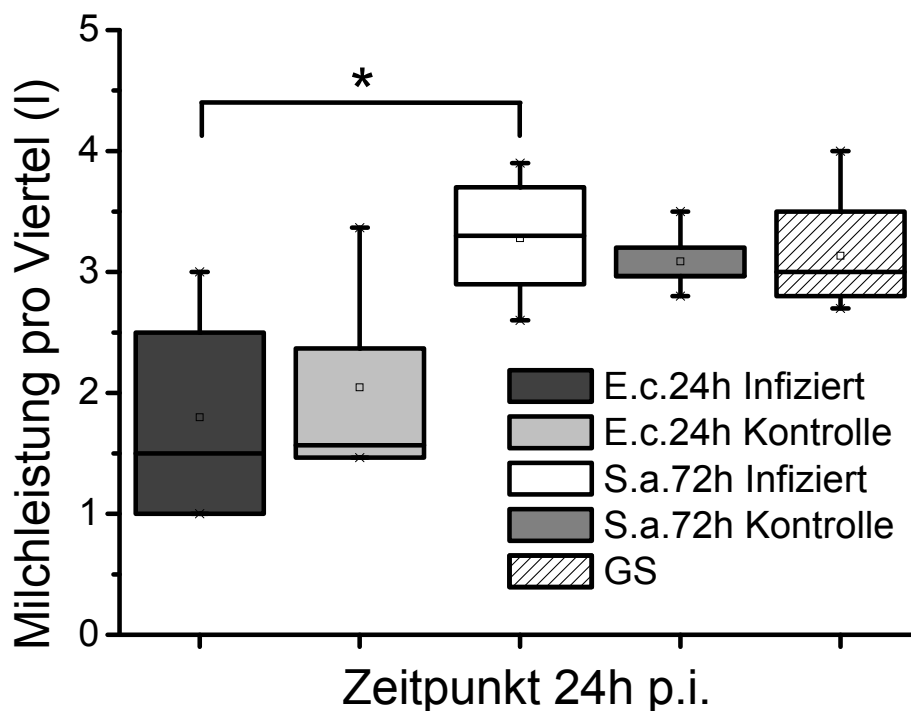
**Abbildung 5: Veränderung der Milchleistung während der experimentellen Mastitis**

Dargestellt ist die Differenz ( $\Delta$ ) der Milchmenge auf Viertelebene der verschiedenen Gruppen in den ersten 72h nach Versuchsbeginn. Die Werte beziehen sich auf jeweilige Durchschnittsmengen der vorausgegangenen 5 Tage. Es wurde der Mittelwert der Milchleistungen der Abendgemelke der letzten 5 Tage vor dem Versuch ( $\bar{x}$  11,48  $\pm$  1,61) und der Mittelwert der Morgengemelke der letzten 5 Tage vor dem Versuch ( $\bar{x}$  13,75  $\pm$  2,081) errechnet. Daraufhin wurden jeweils der Durchschnitt der Abendgemelke von der Milchleistung von 12, 36 und 60h und der Durchschnitt der Morgengemelke von 24, 48 und 72h abgezogen. Positive Werte stellen also höhere Milchleistungen zu Zeitpunkten nach Versuchsbeginn verglichen mit den Referenzzeitpunkten und negative Werte niedrigere Milchmengen zu den Zeitpunkten nach Versuchsbeginn dar. Boxplots: Median (—); MW ( $\blacksquare$ ); Interquartilbereich (Box), 5. ( $\perp$ ), 95. ( $\top$ ) Perzentil. Es gab zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede.

Während des Versuchs wurde das Gemelk der Tiere auf Viertelebene getrennt gewonnen, so dass bei der Auswertung zwischen der Gemelkmenge infizierter und nicht infizierter Euterviertel unterschieden werden konnte.

Die *E.c.24h*-Gruppe zeigte auf den infizierten Vierteln über den Versuchszeitraum einen Abfall der Milchleistung um  $\bar{x}$  2,4 (1,5-3,4)l (siehe Abbildung 6). Bei den Tieren der *S.a.72h*-Gruppe sank die Milchleistung auf dem infizierten Viertel 24h nach der Infektion um  $\bar{x}$  0,6 (0,3-1,1)l.

Bei der statistischen Auswertung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Infektionsmodellen ( $p < 0,05$ ), allerdings nur zwischen den infizierten Vierteln zum Zeitpunkt 24h p.i.. Es war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollvierteln und den infizierten Vierteln der jeweiligen Gruppe vorhanden. Im weiteren Verlauf zeigte sich die *S.a.72h*-Gruppe konstant, mit den tagesüblichen Schwankungen.



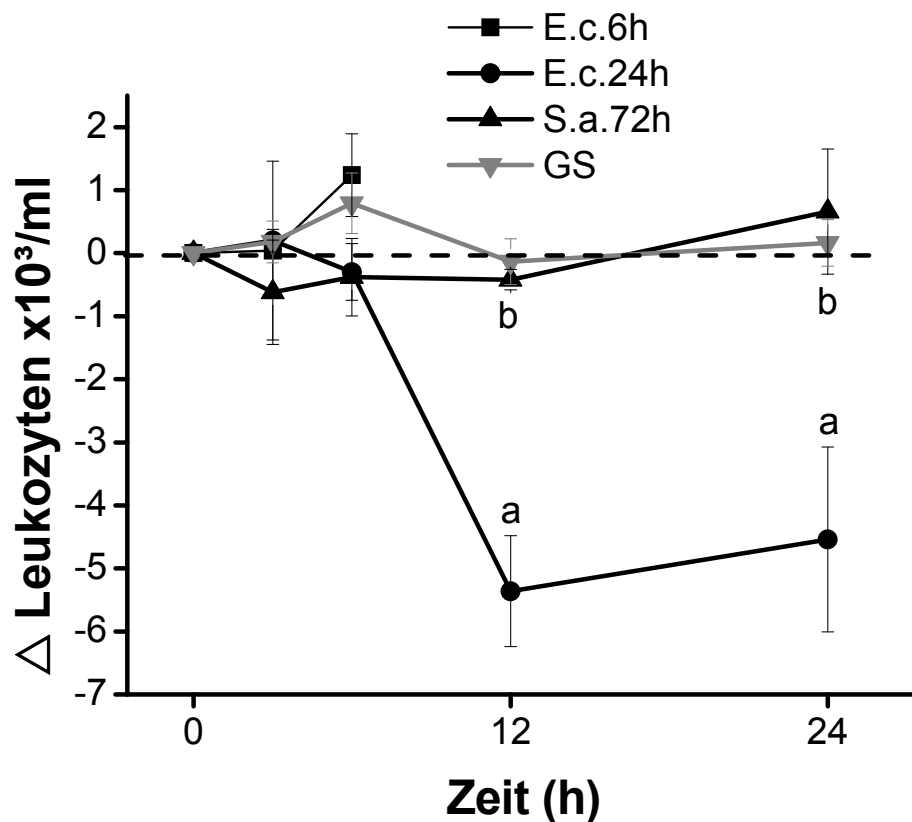
**Abbildung 6: Milchleistung auf Viertelenebene zum Zeitpunkt 24h p.i.**

Dargestellt ist der Abfall der Milchleistung in den infizierten Vierteln der Gruppen *E.c.24h* ( $n = 5$ ) und *S.a.72h* ( $n = 5$ ) vergleichend mit den Kontrollvierteln (je Gruppe  $n = 10$ ) der jeweiligen Versuchsgruppe zum Zeitpunkt 24h p.i.. Verglichen wurden die Kontrollviertel und die infizierten Viertel der beiden Infektionsmodelle sowie die infizierten Viertel mit den Kontrollvierteln innerhalb eines Infektionsmodells. \* $p < 0,05$  Boxplots: Median (—); MW (■); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊤) Perzentil.

#### 4.1.4 Blutbild

Zur Erfassung der systemischen Auswirkungen nach experimenteller Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* wurde bei allen infizierten Tieren der Gehalt an zirkulierenden Leukozyten im venösen Blut gemessen (Zeitpunkte 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h p.i. je nach Versuchsdauer). Die Ausgangswerte der Tiere zeigten über einen Zeitraum von 3 Wochen relativ konstante (durchschnittlicher Variationskoeffizient bei 12,5%,  $n=17$ ), jedoch interindividuell unterschiedliche Leukozytengehalte im Blut (Max.:  $12,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ; Min.:  $4,9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $\bar{x}$  von  $7,65 \cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ), daher wurden über den Versuchszeitraum die Differenzen dargestellt. Dazu wurden die 0h Werte jeweils von den weiteren Zeitpunkten abgezogen. Die Gruppen *S.a.72h* und GS zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Leukozytengehalte im Blut. In der Gruppe *E.c.24h* hingegen konnte bereits 12h nach Pathogen-Inokulation eine deutliche, statistisch signifikante Leukopenie

festgestellt werden ( $p < 0,001$ ), die auch 24h p.i. nachweisbar war ( $p < 0,01$ ; siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Leukozytenzahl im Blut bei experimenteller Mastitis durch *E. coli* und *S. aureus***

Dargestellt ist der Verlauf der Mittelwerte der Differenzen ( $\Delta$ )  $\pm$  Stabw. der Leukozytengehalte im Blut ab Stunde 0 (Zeitpunkt der Infektion). Negative Werte bedeuten eine Abnahme des Leukozytengehaltes im Blut, positive Werte eine Zunahme des Leukozytengehaltes. Die Anzahl der Tiere beträgt bei der GS-Gruppe  $n = 11$ , in den anderen Gruppen jeweils  $n = 5$ . Verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Zeitpunkten zwischen *E.c.24h* und *S.a.72h* ( $p < 0,01$ ).

#### 4.1.5 Klinischer Score zur Gesamtbeurteilung des Schweregrades der Mastitis

Die Veränderungen des Allgemeinbefindens wurden zusammen mit der Körpertemperatur sowie Sekret- und Palpationsbefunden in einer Tabelle, nach Versuchsgruppen getrennt, zusammengefasst (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11). Es wurden jeweils die am stärksten veränderten Befunde, die während des Versuchs festgestellt wurden, berücksichtigt. Während mit *S. aureus* inokulierte Tiere keine bis geringgradige Veränderungen zeigten, waren die Veränderungen des klinischen Scores bei der *E.c.24h*-Gruppe signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht.



**Tabelle 10: Veränderungen klinischer Parameter bei Experimenteller Mastitis durch *E. coli* über einen Zeitraum von 24h p.i.**

<b>Tier</b>	<b>M-6-08</b>	<b>M-6-15</b>	<b>M-6-19</b>	<b>M-6-12</b>	<b>M-6-16</b>
Körpertemperatur	3	3	2	3	3
Eutersekretbefund	1	3	3	2	3
Euterpalpationsbefund	3*	3*	3*	3*	2*
Milchleistungsabfall	2	1	2	1	2
Störung des Allgemeinbefindens	1	1	1	1	1
<b>Klinischer Score</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>11</b>

**Tabelle 11: Veränderungen klinischer Parameter bei Experimenteller Mastitis durch *S. aureus* über einen Zeitraum von 72h p.i.**

<b>Tier</b>	<b>M-7-20</b>	<b>M-7-28</b>	<b>M-7-29</b>	<b>M-7-23</b>	<b>M-7-30</b>
Körpertemperatur	0	0	0	0	0
Eutersekretbefund	2	0	0	2	0
Euterpalpationsbefund	2	0	0	1	0
Milchleistungsabfall	1	1	1	1	0
Störung des Allgemeinbefindens	0	0	0	0	0
<b>Klinischer Score</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>

Ausgesuchte klinische Parameter wurden im Verlauf der experimentellen Mastitis erhoben und zur Einschätzung der Schwere der Erkrankung nach dem unter 3.3.7 beschriebenen Schema bewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse bei experimenteller Mastitis durch *E. coli* und *S. aureus* über 24h bzw. 72h (klinischer Score: 0-3 = keine klinischen Veränderungen, 4-7 = geringgradige klinische Veränderungen, 8-11 = mittelgradige klinische Veränderungen, 12-15 = hochgradige klinische Veränderungen \* = Euterödem).

## 4.2 Veränderungen von Milchsekreteigenschaften im Rahmen der Modelle zur *E. coli*- und *S. aureus*-Mastitis

### 4.2.1 Grobsinnliche Sekretveränderungen

Während des Versuchs wurde zu jeder Melkzeit jeweils die Sekretbeschaffenheit der Viertelanfangsgemelke beurteilt (siehe 3.3.7.3). Die Veränderungen, ausgedrückt in Prozent der zum jeweiligen Zeitpunkt beurteilten Sekrete, sind in Abbildung 8 dargestellt. Alle Viertel zeigten zu Versuchsbeginn grobsinnlich beurteilt eine ungestörte „Milchsekretion“.

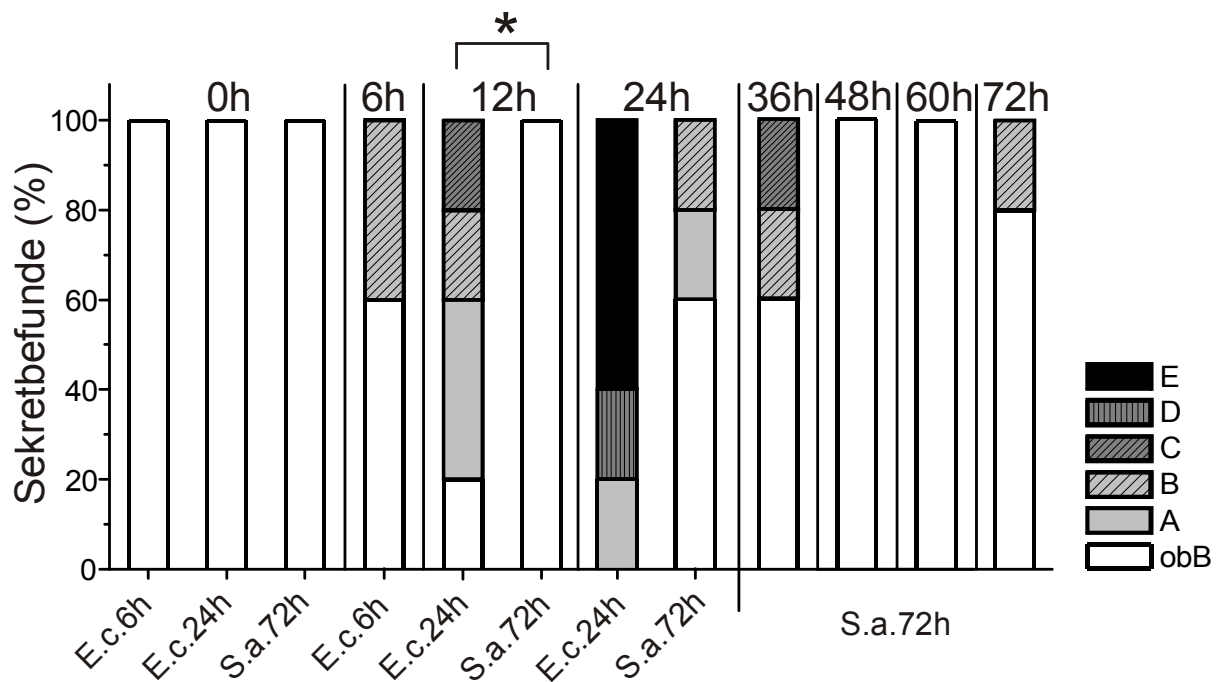
In der Gruppe *E.c.6h* zeigten zum Zeitpunkt 6h p.i. 40% der Viertelgemelke geringgradige Veränderungen der Sekretbeschaffenheit (Flockenbildung). 60% der Tiere zeigten eine normale Sekretion (siehe Abbildung 8).

Zum Zeitpunkt 12h zeigte der überwiegende Anteil (80%; 4 von 5 Tieren) der *E.c.24h*-Gruppe geringgradige bis mittelgradige makroskopische Veränderungen im Milchsekret. Ein Tier zeigte eine normale Sekretion auf dem infizierten Viertel. 24h nach intramammärer Infektion mit *E. coli* zeigten alle Probanden veränderte Sekretbeschaffenheit mit teilweisem Verlust des Milchcharakters (siehe Abbildung 8).

In der *S.a.72h*-Gruppe war 12h nach Infektionsbeginn bei keinem Tier eine Störung in der Sekretion zu erkennen. Die Milch stellte sich makroskopisch völlig normal dar. 24h und 36h nach Versuchsbeginn zeigten 40% (2 von 5 Tieren) gering- bis mittelgradige Sekretveränderungen, z.T. mit Flockenbildung, während 60% der Probanden eine ungestörte Sekretion aufwiesen. Zu den Zeitpunkten 48h und 60h p.i. konnten keine makroskopischen Veränderungen im Milchsekret der Versuchstiere mehr festgestellt werden (siehe Abbildung 8). Lediglich 20% der Tiere (1 von 5) zeigten am Versuchsende (72h p.i.) geringgradige Flockenbildung.

Zum Zeitpunkt 12h p.i. zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ): Während bei der Gruppe *E.c.24h* Sekretveränderungen mit Flockenbildung festzustellen waren, konnte bei der *S.a.72h*-Gruppe eine normale Sekretion festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 24h p.i. war lediglich eine Tendenz erkennbar. Die Ausprägung der Sekretveränderungen bei den *E.c.24h*-Tieren hat sich bei allen Probanden verstärkt bis hin zur völligen Aufhebung des Milchcharakters. Dagegen war bei den *S.a.72h*-Tieren nur zum Teil leichte Flockenbildung zu beobachten. Aufgrund der geringen Gruppengröße von  $n = 5$  waren diese Veränderungen jedoch nicht signifikant.

Die GS-Gruppe sowie die nicht infizierten Viertel der anderen drei Gruppen sind in Abbildung 8 nicht dargestellt. Keines der Viertel wies zu irgendeinem Zeitpunkt eine Veränderung des normalsekretorischen Milchcharakters auf.



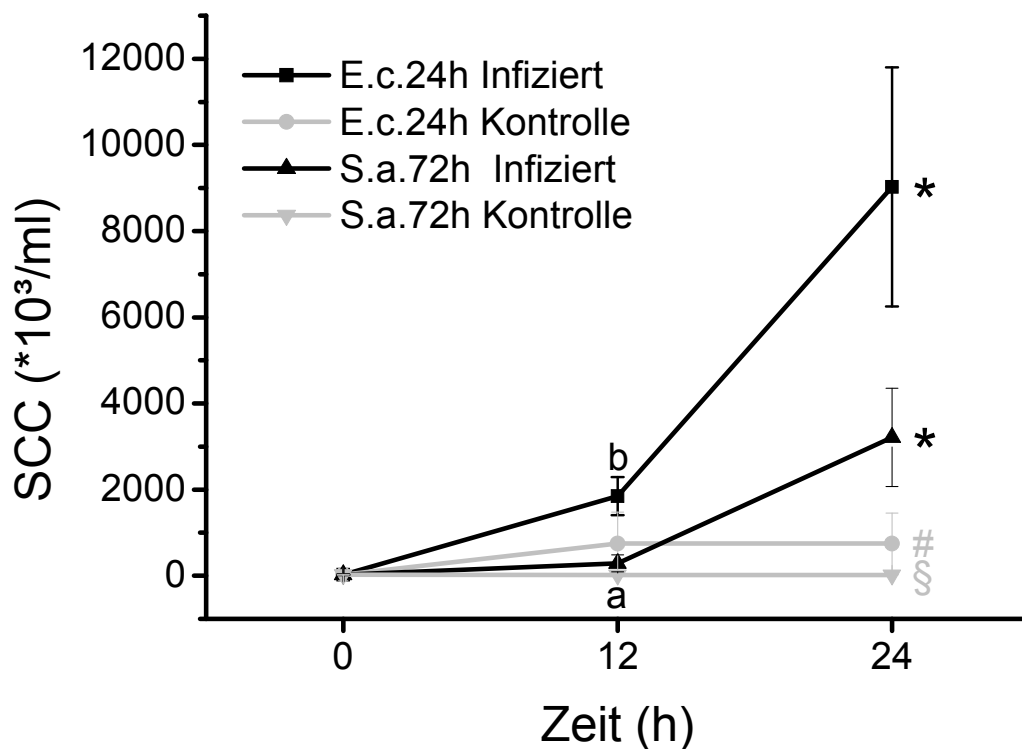
**Abbildung 8: Veränderungen des Milchsekrets nach Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus***

Dargestellt sind der prozentuale Anteil von infizierten Eutervierteln mit veränderter Sekretbeschaffenheit zum Zeitpunkt 0-72h p.i. (je nach Versuchsdauer). o.b.B. = keine makroskopischen Veränderungen, A = Milchcharakter erhalten, wässrig ohne Flocken, B = Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken, C = Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken, D = Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken, E = Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken. ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Somatischer Zellgehalt der Milch (SCC)

Der Ausgangszellgehalt der Viertelgemelke lag, wie im Tiermodell gefordert, unter  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml Milch und betrug im Schnitt  $\bar{x} 3,0 (2,2-3,5) \cdot 10^4$ /ml. Zu den Zeitpunkten 0h sowie 12h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h p.i. (je nach Versuchsdauer) nach der Inokulation von 500 CFU *E. coli* oder 10.000 CFU *S. aureus* wurde der SCC des Gesamtgemelks auf Viertelebene bestimmt (siehe 3.3.5). Höchste SCC-Werte von  $\bar{x} 8,2 (7,02-9,99) \cdot 10^6$  wurden in der *E.c.24h*-Gruppe zum Zeitpunkt 24h p.i. gemessen (siehe Abbildung 9). In der *S.a.72h*-Gruppe kam es ebenfalls zu einem starken Anstieg des Zellgehaltes. Zum Zeitpunkt 24h p.i. konnten Zellgehalte von  $\bar{x} 4,7 (0,4-5,2) \cdot 10^6$ /ml gemessen werden. Es konnten signifikante Unterschiede (mixed model,  $p < 0,05$ ) zwischen dem SCC-Verlauf der jeweiligen infizierten Viertel und den dazugehörigen Kontrollvierteln sowie zwischen den Kontrollvierteln der

beiden verschiedenen Infektionsmodelle (*E. coli* vs. *S. aureus*) festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 12h p.i. war ebenfalls zwischen den infizierten Vierteln ein signifikanter Unterschied zu erkennen (Mann-Whitney-U-Test) (siehe Abbildung 9). Die infizierten Viertel waren gegenüber den Kontrollvierteln erhöht und die infizierten Viertel der Gruppe *E.c.24h* waren gegenüber den infizierten Vierteln der *S.a.72h*-Tiere zum Zeitpunkt 12h p.i. erhöht. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zum Zeitpunkt 24h p.i. zwischen den infizierten Vierteln der beiden Pathogene.

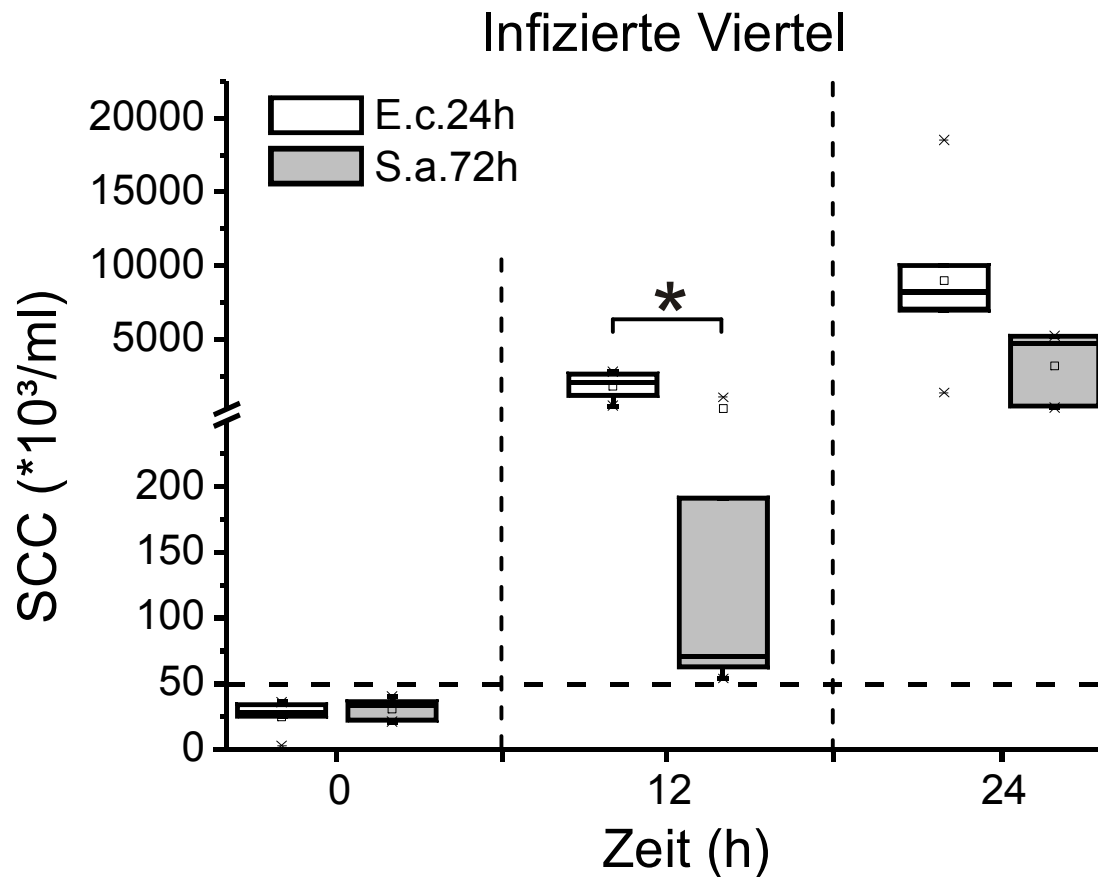


**Abbildung 9: Verlauf der Somatischen Zellzahl (SCC) nach intramammärer Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus***

Dargestellt ist der SCC ( $\bar{x} \pm 1.$  und 3. Quartil) aus Vierteileinzelgemelken im Verlauf von jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 24h nach Inokulation von 500 CFU *E. coli* oder 10.000 CFU *S. aureus* in ein Euterviertel zum Zeitpunkt 0h. Zusätzlich sind die Kontrollviertel der jeweiligen Gruppe dargestellt. Verschiedene Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zu den jeweiligen Zeitpunkten. Unterschiedliche Symbole beschreiben signifikante Unterschiede über den gesamten zeitlichen Verlauf.

Die Zellgehalte in den Gemelken der einzelnen Viertel wurden getrennt nach infizierten Vierteln und nicht infizierten Vierteln ausgewertet (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Bei der *E.c.24h*-Gruppe konnte eine starke Zunahme der Milchzellzahl im infizierten Viertel festgestellt werden. Der Ausgangszellgehalt von  $\bar{x}$  2,8 (2,5-3,4)\*10<sup>4</sup> Zellen/ml Milch entwickelte sich über  $\bar{x}$  2,07 (1,19-2,26)\*10<sup>6</sup> Zellen/ml Milch (12h p.i.) bis hin zu Maximalwerten von  $\bar{x}$  8,2 (7,02-9,99)\*10<sup>6</sup> Zellen/ml Milch 24h nach Infektionsbeginn. Tiere der *S.a.72h*-Gruppe zeigten zu Beginn (0h) ebenfalls niedrige Ausgangswerte (SCC=  $\bar{x}$  3,3 [2,2-3,6]\*10<sup>4</sup>/ml Milch). Hier zeigten sich jedoch niedrigere Werte 12h nach Infektion (SCC=  $\bar{x}$  7,1 [6,3-19,1]\*10<sup>4</sup>/ml Milch) verglichen mit der *E.c.24h*-Gruppe ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 10). Zum Zeitpunkt 60h waren die Werte für die Milchzellen wieder etwas niedriger (SCC=  $\bar{x}$  1,8 [0,3-2,5]\*10<sup>4</sup>/ml Milch [nicht dargestellt; Unterschied statistisch nicht gesichert]).

In der *E.c.6h*-Gruppe lag der Ausgangszellgehalt bei  $\bar{x}$  2,9 (2,4-3,3)\*10<sup>4</sup> Zellen/ml Milch und erhöhte sich signifikant zum Versuchsende auf  $\bar{x}$  8,8 (6,8-11,5)\*10<sup>4</sup> Zellen/ml Milch ( $p=0,016$ ).

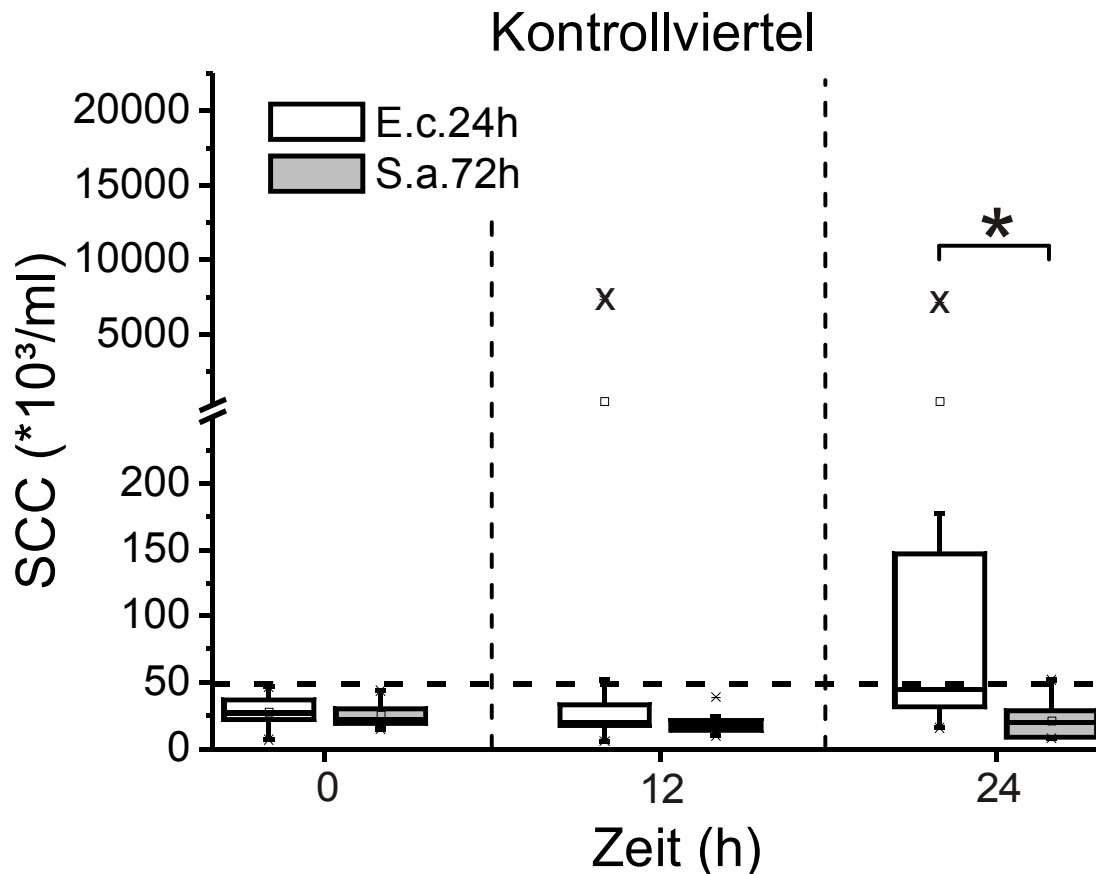


**Abbildung 10: Somatische Zellzahl (SCC) der infizierten Viertel nach intramammärer Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus***

Dargestellt ist der somatische Zellgehalt in infizierten Vierteln der Gruppe *E.c.24h* ( $n = 5$ ) und der *S.a.72h*-Gruppe ( $n = 5$ ). Boxplots: Median (—); MW (■); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊓) Perzentil. Modellgrenze bei 50.000 Zellen/ml (----). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant zum Zeitpunkt 12h p.i. ( $p < 0,05$ ).

Der Verlauf der Zellgehalte in den nicht infizierten Vierteln ist in Abbildung 11 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Infektion lag der SCC bei den Kontrollvierteln der *E.c.24h*-Gruppe bei  $\bar{x}$  2,7 (2,3-3,5) $\cdot 10^4$  Zellen/ml Milch, in der *S.a.72h*-Gruppe bei  $\bar{x}$  2,2 (2,0-2,8) $\cdot 10^4$  Zellen/ml Milch. Zum Zeitpunkt 24h p.i. zeigt sich ein scheinbar höherer SCC-Gehalt in der Gruppe *E.c.24h* ( $\bar{x}$  3,9 [3,2-5,1] $\cdot 10^4$  Zellen/ml) gegenüber der *S.a.72h*-Gruppe ( $\bar{x}$  1,5 [0,9-2,8] $\cdot 10^4$  Zellen/ml). Es konnten zum Zeitpunkt 24h p.i. signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) gefunden werden (siehe Abbildung 11). Diese Unterschiede zeigten sich vor allem durch einen Zellanstieg auf den Kontrollvierteln der *E.c.24h*-Gruppe.

Tier M-6-16 reagierte auf einem Kontrollviertel (Placebo: siehe auch 3.3.4) mit sehr hohen Zellzahlwerten, ähnlich der infizierten Viertel zum Zeitpunkt 12h und 24h p.i. (siehe Abbildung 11; ×=Tier M-6-16). Es konnte jedoch nie ein ursächliches Pathogen im Euter, noch in der verwendeten NaCl-Lösung nachgewiesen werden.

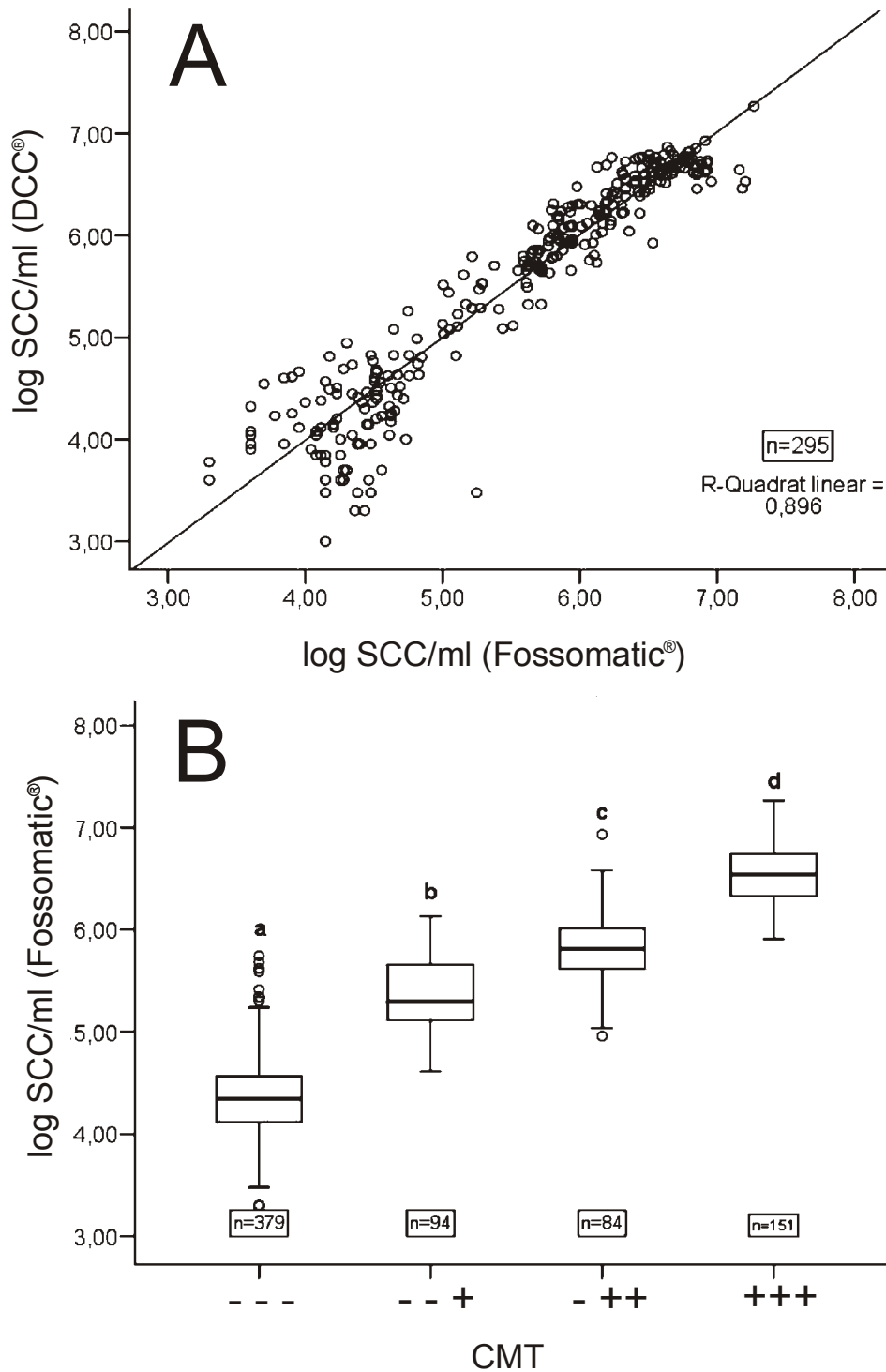


**Abbildung 11: Somatische Zellzahl (SCC) der nicht-infizierten Viertel nach intramammärer Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus***

Dargestellt ist die Entwicklung des SCC in nicht-infizierten Vierteln der Gruppe *E.c.24h* ( $n=5$ ) und der *S.a.72h*-Gruppe ( $n=5$ ). Boxplots: Median (-); MW (▪); Interquartilbereich (Box), 5. ( $\perp$ ), 95. ( $\top$ ) Perzentil. X = Ausreißer; Modellgrenze bei 50.000 Zellen/ml (----). Statistischer Vergleich zwischen den Gruppen:  $*(p < 0,05)$ .

Zusätzlich zur SCC-Bestimmung mittels Fossomatic<sup>®</sup> wurde im Stall zu jeder Melkzeit der CMT durchgeführt (siehe 3.3.5). Außerdem wurde vor Versuchsbeginn sowie im Versuch die Zellzahl mittels DCC<sup>®</sup> bestimmt (siehe 3.3.9). Die Ergebnisse des DCC<sup>®</sup>, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit der Referenzmessmethode des Fossomatic<sup>®</sup> (siehe Abbildung 12 A). Desweiteren wurden die erhobenen Daten des CMT mit dem Fossomatic korreliert und zeigten in der praxistauglichen semiquantitativen Einteilung des CMT statistische Unterschiede zwischen den Einteilungen „---“ bis „+++“ ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 12 B).





**Abbildung 12: Vergleich verschiedener eingesetzter Messmethoden für den somatischen Zellgehalt in Milch**

Dargestellt ist der Vergleich der SCC-Ergebnisse (n = 295) zwischen Fossomatic® und DCC® (A) mit sehr hoher Korrelation ( $R^2 = 0,9$ ). Zwischen Fossomatic® und California Mastitis Test (CMT) (B) konnte für die stufenweise semiquantitative Einteilung des CMT ebenfalls eine gute Korrelation festgestellt werden. Die einzelnen Stufen zeigten signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ), hier durch verschieden Buchstaben gekennzeichnet.

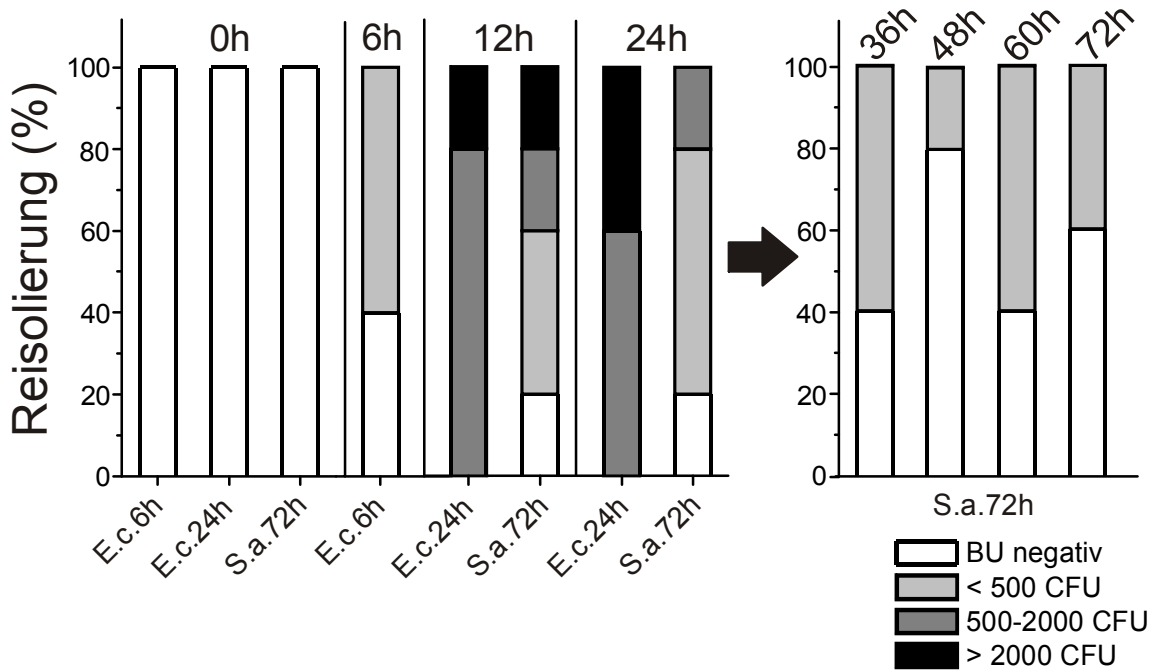
### 4.2.3 Milchkeimgehalt

Vor jedem Melken wurden während des Versuchs Milchproben für die bakteriologische Untersuchung der einzelnen Euterviertel der Tiere gewonnen (siehe 3.3.5). Zum einen sollte damit die erfolgreiche Infektion der Viertel überprüft und andererseits das Vorhandensein anderer Erreger ausgeschlossen werden.

Bei der *E.c.6h*-Gruppe konnte bei 3 von 5 Tieren der Keim 6h p.i. mit einem Gehalt von 500 bis 2000 CFU *E. coli* pro ml Milch reisoliert werden. Zwei Tiere waren bakteriologisch negativ. Bei der *E.c.24h*-Gruppe waren die infizierten Viertel ab der ersten Melkzeit nach Versuchsbeginn durchgängig kulturell positiv für *E. coli*. Bereits 12h nach Inokulation von *E. coli* war bei 80% der Tiere ein Gehalt von 500 bis 2000 CFU *E. coli* pro ml Milch und bei 20% der Tiere ein Gehalt von über 2000 CFU/ml Milch nachweisbar. Nach 24h lag der Anteil der Tiere mit einem Gehalt von über 2000 CFU/ml Milch bereits bei 40% (siehe Abbildung 13).

In der *S.a.72h*-Gruppe wurde bei jedem Tier der Keim mindestens zweimal im Zeitraum von 72h reisoliert (siehe Tabelle 12). Nur zum Zeitpunkt 12h p.i. war bei 20% der Tiere ein Gehalt von 500 bis 2000 CFU *S. aureus* oder über 2000 CFU/ml Milch nachweisbar. Zum Zeitpunkt 24h p.i. konnte lediglich bei 20% der Tiere ein Gehalt von 500 bis 2000 CFU/ml Milch nachgewiesen werden. Die restlichen positiven Befunde wiesen einen Keimgehalt von weniger als 500 CFU/ml Milch auf (siehe Abbildung 13). In Tabelle 12 sind die bakteriologischen Befunde der einzelnen Tiere der Gruppe *S.a.72h* zu sehen.

Es wurde jeweils nur die Keimspezies nachgewiesen, mit der infiziert worden war. Zu keinem Zeitpunkt wurde auf einem der Kontroll- oder Placeboviertel der infizierten Tiere, sowie der GS-Tiere ein Erreger nachgewiesen.



**Abbildung 13: Kulturelle Reisolierung von *E. coli* und *S. aureus* aus dem Milchsekret experimentell infizierter Tiere**

Dargestellt sind die bakteriologischen Befunde der infizierten Viertel der 3 Versuchsgruppen 0-72h p.i. (je nach Versuchsdauer) nach der Infektion in Prozent. Zur Stunde 0 wurden den Tieren 500 CFU *E. coli* oder 10.000 CFU *S. aureus* in jeweils ein Euterviertel infundiert. Die Anzahl der Tiere beträgt für die Gruppen jeweils n = 5.

**Tabelle 12: Kulturelle Reisolierung von *S. aureus* aus dem Milchsekret der experimentell infizierten Tiere**

Zeit \ Tier	12h	24h	36h	48h	60h	72h
M-7-20	+	+	+	-	+	+
M-7-28	++	++	+	-	+	-
M-7-29	+	-	-	-	+	-
M-7-23	-	+	-	-	-	+
M-7-30	+++	+	+	+	-	-

Dargestellt sind die bakteriologischen Befunde aus dem Viertelanfängsgemelk der infizierten Viertel über den Versuchszeitraum von 72h. Zur Stunde 0 waren alle Tiere der Versuchsgruppe bakteriologisch negativ. Sie wurden mit 10.000 CFU *S. aureus* in jeweils einem Euterviertel infiziert. - = BU negativ, + = < 500 CFU/ml, ++ = 500-2000 CFU/ml, +++ = > 2000 CFU/ml.

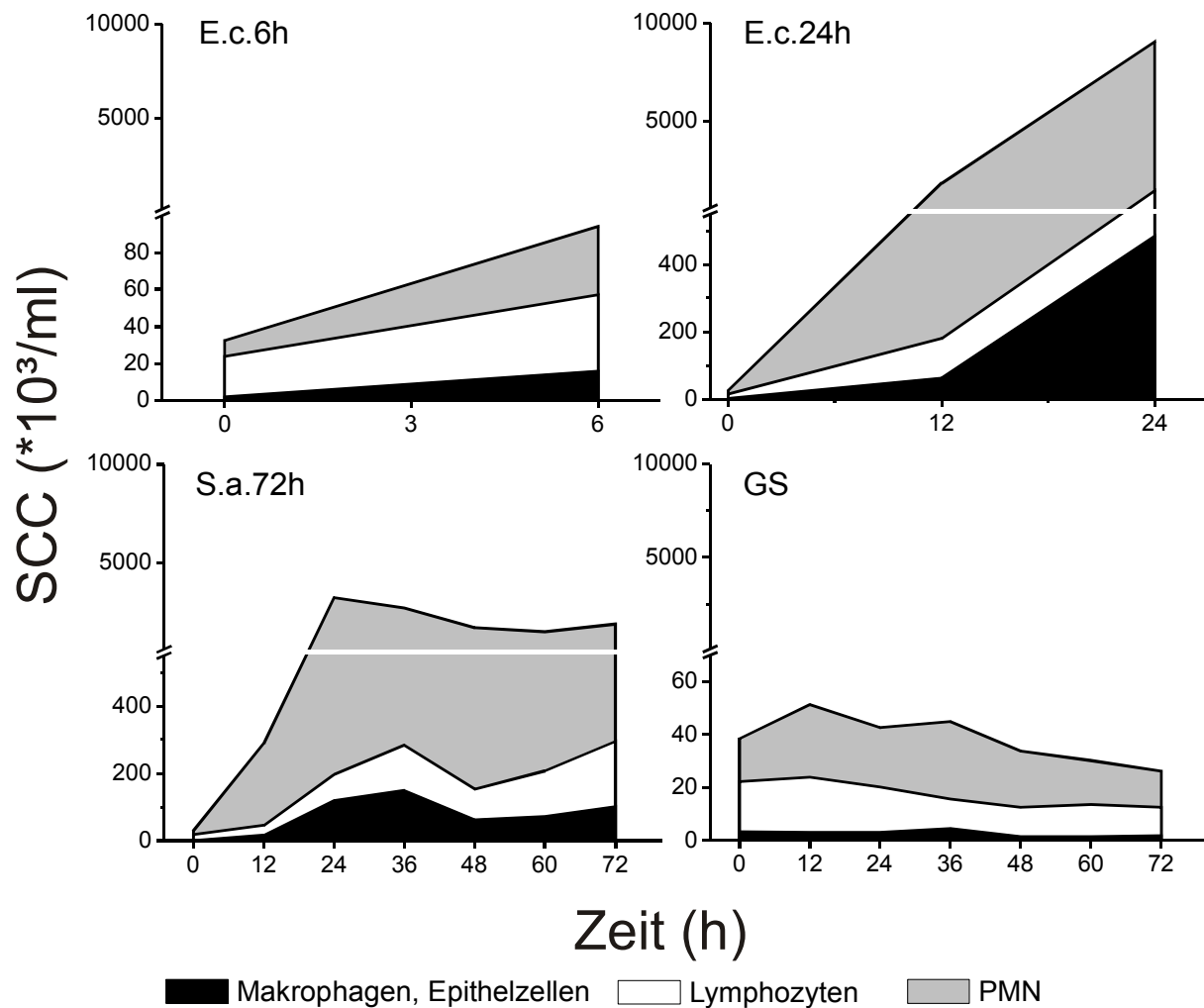
#### 4.2.4 Differentialzellbild der Milch

Zur morphologischen Differenzierung der Zellen, die in der Milch nachweisbar sind, wurden die Milchezellen wie unter 3.3.10 beschrieben aufgereinigt, mit Acridin-Orange und Propidiumjodid angefärbt und dann im Durchflusszytometer differenziert. Anhand des bekannten Gesamtzellgehaltes (SCC, siehe 3.3.9) wurden dann die Absolutzahlen verschiedener Zellpopulationen berechnet. Abbildung 14 zeigt Veränderungen in der Anzahl der einzelnen morphologisch differenzierbaren Milchezellfraktionen nach der intramammären Inokulation mit *E. coli* oder *S. aureus*. Während des unter 4.2.2 beschriebenen SCC-Anstiegs zeigte sich, dass die PMN als dominierende Zellpopulation für diesen Anstieg verantwortlich waren. Zum Zeitpunkt 0h waren  $\bar{x}$  5,4 (4,0-12,0)  $\cdot 10^3$  PMN pro ml Milch zu finden (siehe Abbildung 14). 12h nach Inokulation von 500 CFU *E. coli* stieg die Anzahl der PMN im infizierten Viertel auf  $\bar{x}$  2,0 (0,8-2,4)  $\cdot 10^6$  PMN pro ml Milch und nach 24h weiter auf  $\bar{x}$  6,5 (5,1-8,8)  $\cdot 10^6$  PMN pro ml Milch an. 12h nach Inokulation mit 10.000 CFU *S. aureus* erhöhte sich die Anzahl der PMN im infizierten Viertel auf  $\bar{x}$  6,5 (2,6-18,3)  $\cdot 10^4$  und nach 24h weiter auf  $\bar{x}$  4,5 (0,4-5,0)  $\cdot 10^6$  PMN pro ml Milch. In den nicht infizierten Vierteln der beiden Gruppen war die PMN-Zahl zum Zeitpunkt 12h p.i. geringgradig auf  $\bar{x}$  9,0 (7,0-15,9)  $\cdot 10^3$  PMN pro ml Milch angestiegen. Zum Zeitpunkt 24h p.i. war eine weitere Erhöhung auf  $\bar{x}$  13,4 (5,6-22,9)  $\cdot 10^3$  PMN pro ml Milch zu verzeichnen.

Der relative Anteil an lymphoiden Zellen und Makrophagen sank hingegen trotz ebenfalls ansteigender absoluter Zahlen bei diesen Populationen. Zur Stunde 0 waren in der Milch  $\bar{x}$  1,6 (1,3-2,0)  $\cdot 10^4$  Lymphozyten pro ml Milch zu finden. 12h nach Inokulation von *E. coli* in ein Euterviertel stieg dieser Wert auf  $\bar{x}$  2,8 (2,5-14,9)  $\cdot 10^4$  Lymphozyten pro ml Milch an. Ein weiterer Anstieg der Lymphozyten konnte zum Zeitpunkt 24h p.i. verzeichnet werden. Hier stiegen die Werte auf  $\bar{x}$  4,8 (3,9-18,6)  $\cdot 10^5$  Lymphozyten pro ml Milch. Bei den mit *S. aureus* infizierten Vierteln zeigte sich zum Zeitpunkt 12h p.i. ebenfalls eine Erhöhung der Lymphozytengehalte auf  $\bar{x}$  2,6 (0,4-4,6)  $\cdot 10^4$  Lymphozyten pro ml Milch, die dann weiter stiegen und zum Zeitpunkt 24h p.i.  $\bar{x}$  9,9 (5,0-10,4)  $\cdot 10^4$  Lymphozyten pro ml Milch erreichten. Die Kontrollviertel zeigten hingegen zu beiden Zeitpunkten einen Abfall gegenüber dem Ausgangsgehalt. Zum Zeitpunkt 12h p.i. waren  $\bar{x}$  6,5 (5,5-11,2)  $\cdot 10^3$  Lymphozyten pro ml Milch und zum Zeitpunkt 24h p.i.  $\bar{x}$  1,0 (0,5-14,0)  $\cdot 10^4$  Lymphozyten pro ml Milch nachweisbar.

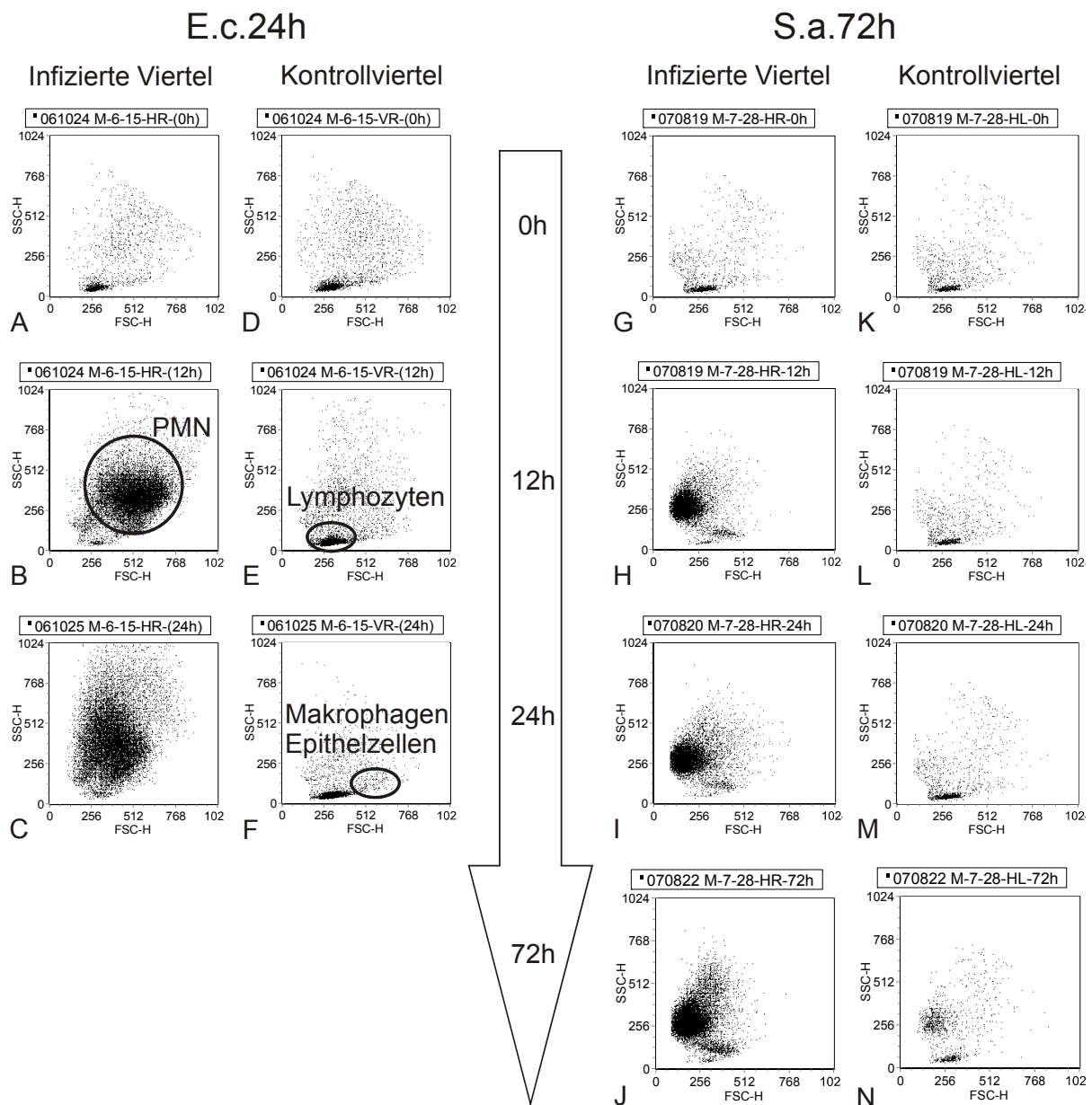
Als Ausgangswert der Makrophagen und Epithelzellen wurden im Hauptgemelk  $\bar{x}$  0,9 (0,5-1,9)\*10<sup>3</sup> Zellen pro ml Milch gefunden. 12h nach Inokulation von *E. coli* stieg diese Anzahl auf  $\bar{x}$  4,3 (2,3-11,9)\*10<sup>4</sup> Zellen pro ml Milch an (siehe Abbildung 14). 24h nach Versuchsbeginn war ein weiterer Anstieg der Makrophagen und Epithelzellen auf  $\bar{x}$  3,5 (0,5-7,3)\*10<sup>5</sup> Zellen pro ml Milch feststellbar. Ähnliche Zellzahl-Anstiege sind bei den Tieren nach *S. aureus*-Infektion zu verzeichnen. So stieg die Makrophagen-Zahl zum Zeitpunkt 12h p.i. auf  $\bar{x}$  3,8 (2,3-8,0)\*10<sup>3</sup> Zellen pro ml Milch an (siehe Abbildung 14), zum Zeitpunkt 24h p.i. sogar auf  $\bar{x}$  1,4 (0,7-1,7)\*10<sup>5</sup> Zellen pro ml Milch. Die nicht infizierten Viertel zeigten hingegen nur geringgradige Änderungen gegenüber dem Ausgangswert. Zum Zeitpunkt 12h p.i. waren  $\bar{x}$  0,8 (0,5-1,2)\*10<sup>3</sup> Zellen pro ml Milch und zum Zeitpunkt 24h p.i.  $\bar{x}$  1,1 (0,4-2,4)\*10<sup>3</sup> Zellen pro ml Milch nachweisbar.

Die GS-Tiere zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum nur geringgradige nichtsignifikante Schwankungen der einzelnen Zellpopulationen.



**Abbildung 14: Quantitative Veränderungen der Milchzellsubpopulationen nach Inokulation von *E. coli* oder *S. aureus* (infizierte Viertel)**

Dargestellt ist die Anzahl der Milchzellsubpopulationen nach der Inokulation von *E. coli* oder *S. aureus* in ein Euterviertel. Zusätzlich wurde die Gruppe Goldstandard dargestellt. Die Zellen wurden nach Anfärbung durchflusszytometrisch nach Makrophagen/Epithelzellen, Lymphozyten und PMN differenziert. Die Anzahl der differenzierten Milchproben beträgt für die Gruppen mit Infektion  $n = 5$  pro Zeitpunkt und für die GS-Tiere  $n = 11$  bis zum Zeitpunkt 24h p.i., danach  $n = 5$  pro Zeitpunkt.



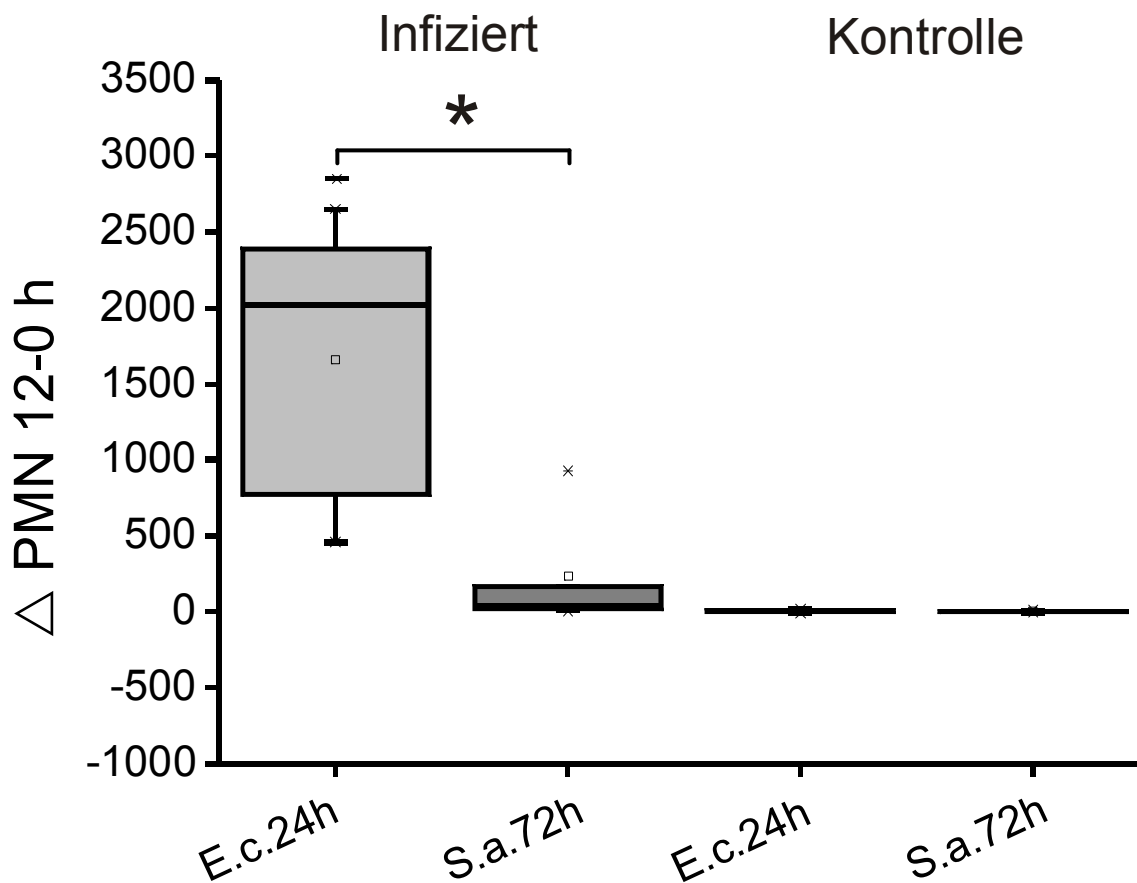
**Abbildung 15: Durchflusszytometrische Darstellung der Milchzellpopulationen in den infizierten und nicht infizierten Vierteln nach der Infektion mit *E. coli* und *S. aureus***

In der Abbildung sind Punktediagramme nach durchflusszytometrischer Analyse mit Acridin-Orange-Färbung (siehe 3.3.12) vergleichend dargestellt. Erfasst wurden jeweils 20.000 Ereignisse. A= naives Viertel vor der Infektion, B= infiziertes Viertel 12h nach Infektion mit *E. coli*, C= infiziertes Viertel 24h nach Infektion mit *E. coli*, D= naives Nachbarviertel vor Infektion, E= nicht infiziertes Nachbarviertel 12h nach Infektion, F= nicht infiziertes Nachbarviertel 24h nach Infektion, G= naives Viertel vor der Infektion, H= infiziertes Viertel 12h nach Infektion mit *S. aureus*, I= infiziertes Viertel 24h nach Infektion mit *S. aureus*, J= infiziertes Viertel 72h nach Infektion mit *S. aureus*, K= nicht infiziertes Nachbarviertel vor Infektion, L= nicht infiziertes Nachbarviertel 12h nach Infektion, M= nicht infiziertes Nachbarviertel 24h nach Infektion, N= nicht infiziertes Nachbarviertel 72h nach Infektion

Abbildung 15 zeigt durchflusszytometrische Darstellungen (Dotplots) der Zellpopulationen vergleichend zwischen der *E.c.24h*-Gruppe und der *S.a.72h*-Gruppe. Hierbei zeigen die einwandernden Zellen eine sich verändernde Zusammensetzung. Zum Zeitpunkt 0h finden sich im Milchsekret überwiegend Lymphozyten (siehe Abbildung 15 A, D, G, J). In beiden Gruppen kommt es 12h p.i. nur im infizierten Viertel zu einem Anstieg des Gehaltes an PMN. Dagegen steigt der Gehalt an PMN bei den nicht infizierten Vierteln 12h p.i. nicht an. Dieses Phänomen ist auch 24h p.i. bei beiden Gruppen so zu beobachten.

Zusätzlich wurden die Veränderungen der einzelnen Zellpopulationen zwischen zwei Melkzeiten errechnet. Es wurden jeweils die infizierten Viertel der beiden Gruppen, sowie die Kontrollviertel untereinander verglichen. Bei der Auswertung konnten lediglich für die PMN signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) zwischen den infizierten Vierteln der Gruppe *E.c.24h* und *S.a.72h* festgestellt werden (siehe Abbildung 16). Bei den lymphoiden Zellen sowie bei den Makrophagen und Epithelzellen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen (nicht dargestellt).





**Abbildung 16: Veränderung der PMN-Gehalte im Gemelk infizierter Viertel und Kontrollviertel 12h nach Versuchsbeginn**

Dargestellt ist die Differenz ( $\Delta$ ) der PMN-Zahl ( $\cdot 10^3/\text{ml}$ ) für infizierte Viertel und Kontrollviertel der Gruppen *E.c.24h* und *S.a.72h*. Positive Werte stellen einen höheren PMN-Anteil und negative Werte einen niedrigeren PMN-Anteil im Vergleich zum Versuchsbeginn dar. Die Anzahl für die ausgewerteten Proben betrug für die infizierten Viertel jeweils  $n = 5$  und für die Kontrollviertel jeweils  $n = 10$ . Boxplots: Median (—); MW (•); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊤) Perzentil. \* ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Milchhaltsstoffe

Die Milchhaltsstoffe wurden im Labor des Milchprüfrings Bayern in Wolnzach bestimmt (siehe 3.3.9). Die Ausgangswerte der Tiere zeigten trotz der strengen Modellbedingungen bezüglich Tierausswahl und Haltungsbedingungen bei einem Teil der Parameter deutliche interindividuelle Unterschiede, deshalb werden hier relative Veränderungen der Milchparameter dargestellt. Dazu wurden die 0h-Werte jeweils von den Werten der nachfolgenden Zeitpunkte abgezogen. Die Inhaltsstoffe wurden während des Versuchs auf Viertelenebene bestimmt, was eine separate Betrachtung der infizierten sowie der nicht infizierten Viertel ermöglichte. In der *E.c.24h*-Gruppe war bei zwei Tieren zum Zeitpunkt 24h p.i. das Milchsekret auf den infizierten Vierteln so stark entzündlich verändert, dass eine

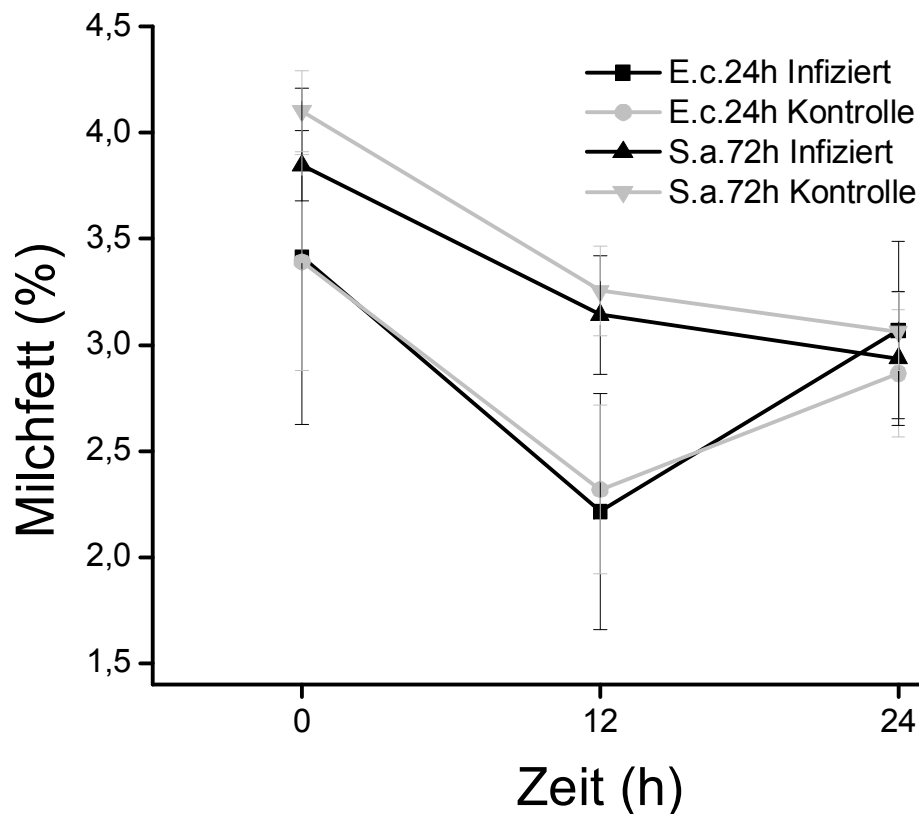
Bestimmung der Milchinhaltsstoffe unter den gegebenen Laborbedingungen nicht mehr möglich war.

Der Fokus wurde im Folgenden auf pathogenabhängige Unterschiede in der dynamischen Entwicklung der Milchinhaltsstoffe in beiden Mastitis-Infektionsmodellen gelegt. Die Werte der GS-Tiere sind bei den Untersuchungen zu Milchinhaltsstoffen nicht dargestellt. Auch die Tiere der *E.c.6h*-Gruppe wurden für die Darstellung der Milchinhaltsstoffe nicht herangezogen, da der mögliche Einfluss des verkürzten Melkintervalls auf die Milchinhaltsstoffe eine seriöse Vergleichbarkeit mit den übrigen Werten nicht zulässt.

#### 4.2.5.1 Fett

Während des Versuchs wurde zu jeder Melkzeit der Milchfettgehalt (%) auf Viertelebene bestimmt (siehe 3.3.9). Abbildung 17 zeigt die Veränderungen des Milchfettgehaltes nach Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* in den ersten 24h p.i.. Zum Zeitpunkt 0h lag der Milchfettgehalt in der Gruppe *E.c.24h* bei  $\bar{x}$  3,41 ± 1,77%. 12h nach Versuchsbeginn kam es zu einem deutlichen Abfall des Fettgehaltes auf  $\bar{x}$  2,21 ± 1,25%, welcher sich zum Versuchsende (24h p.i.) wieder dem Ausgangswert näherte ( $\bar{x}$  3,07 ± 0,72% Fett). Zum Zeitpunkt 24h p.i. waren allerdings nur bei drei Tieren die Proben der infizierten Viertel auswertbar. Die Kontrollviertel der *E.c.24h*-Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf (siehe Abbildung 17) mit  $\bar{x}$  3,39 ± 1,61% Fett als Ausgangswert,  $\bar{x}$  2,32 ± 1,26% Fett nach 12h und  $\bar{x}$  2,87 ± 0,95% Fett zu Versuchsende. Die Unterschiede waren jeweils nicht statistisch signifikant.

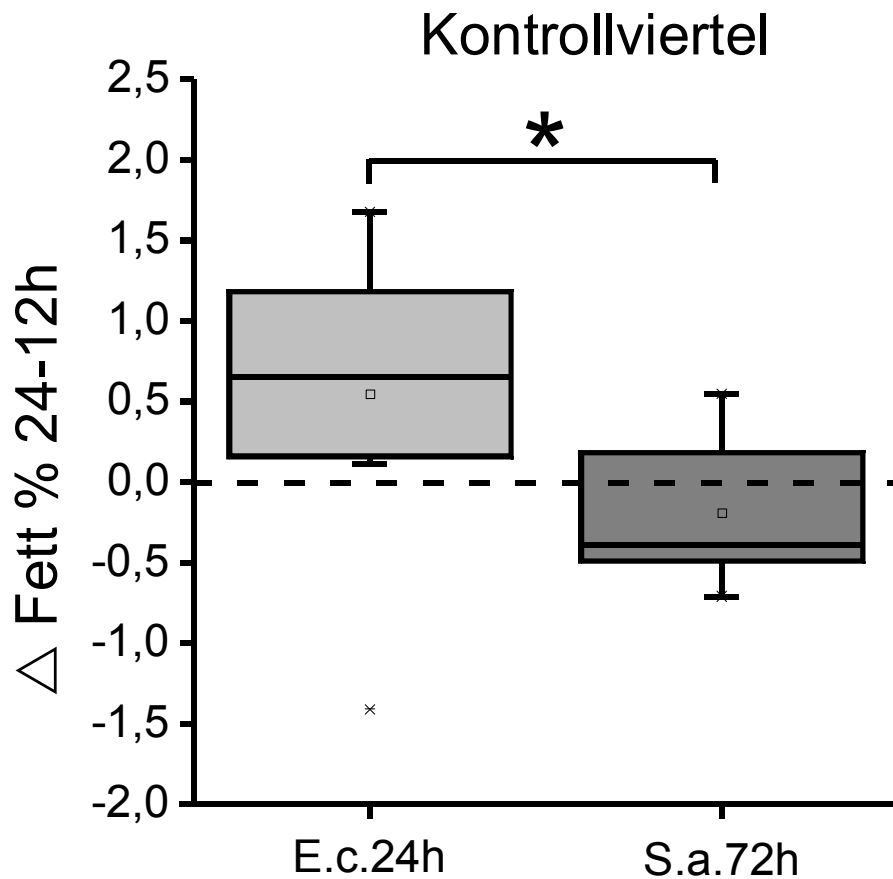
Die Werte der Gruppe *S.a.72h* hingegen sanken nicht so stark, dafür aber stetig ab. Zu Versuchsbeginn lag der Milchfettgehalt auf den infizierten Vierteln bei  $\bar{x}$  3,85 ± 0,37%, nach 12h bei  $\bar{x}$  3,44 ± 0,62%, und nach weiteren 12h sank der Fettgehalt auf  $\bar{x}$  2,94 ± 0,71%. Auch hier zeigten die Kontrollviertel einen ähnlichen Verlauf. Der Ausgangswert lag bei  $\bar{x}$  4,10 ± 0,60% Fett, 12 Stunden später bei  $\bar{x}$  3,25 ± 0,67% Fett und 24h p.i. bei  $\bar{x}$  3,06 ± 0,58% Fett (siehe Abbildung 17). Auch diese Unterschiede konnten nicht statistisch gesichert werden.



**Abbildung 17: Milchfettgehalt nach experimenteller Mastitis durch *E. coli* und *S. aureus* während der ersten 24h**

Dargestellt ist der Milchfettgehalt in Prozent ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) nach der Inokulation von *E. coli* oder *S. aureus* in einem Euterviertel. Die Anzahl der Proben beträgt für die infizierten Viertel jeweils  $n = 5$ , außer zum Zeitpunkt 24h p.i. bei der *E.c.24h*-Gruppe ( $n = 3$ ). Bei den Kontrollvierteln wurden zu jedem Zeitpunkt  $n = 10$  pro Gruppe für die Auswertung berücksichtigt. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

In einem weiteren Schritt wurden nun die Veränderungen des Milchfettgehaltes zwischen zwei aufeinanderfolgenden Melkzeiten untersucht. Dazu wurden die Differenzen gebildet. Vom 12h-Wert wurden die 0h-Werte abgezogen und von den 24h-Werten die 12h-Werte. Auch hier konnte wieder zwischen infizierten und nicht infizierten Vierteln unterschieden werden. Interessanterweise gab es jedoch lediglich bei den Kontrollvierteln (siehe Abbildung 18) der beiden Gruppen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).



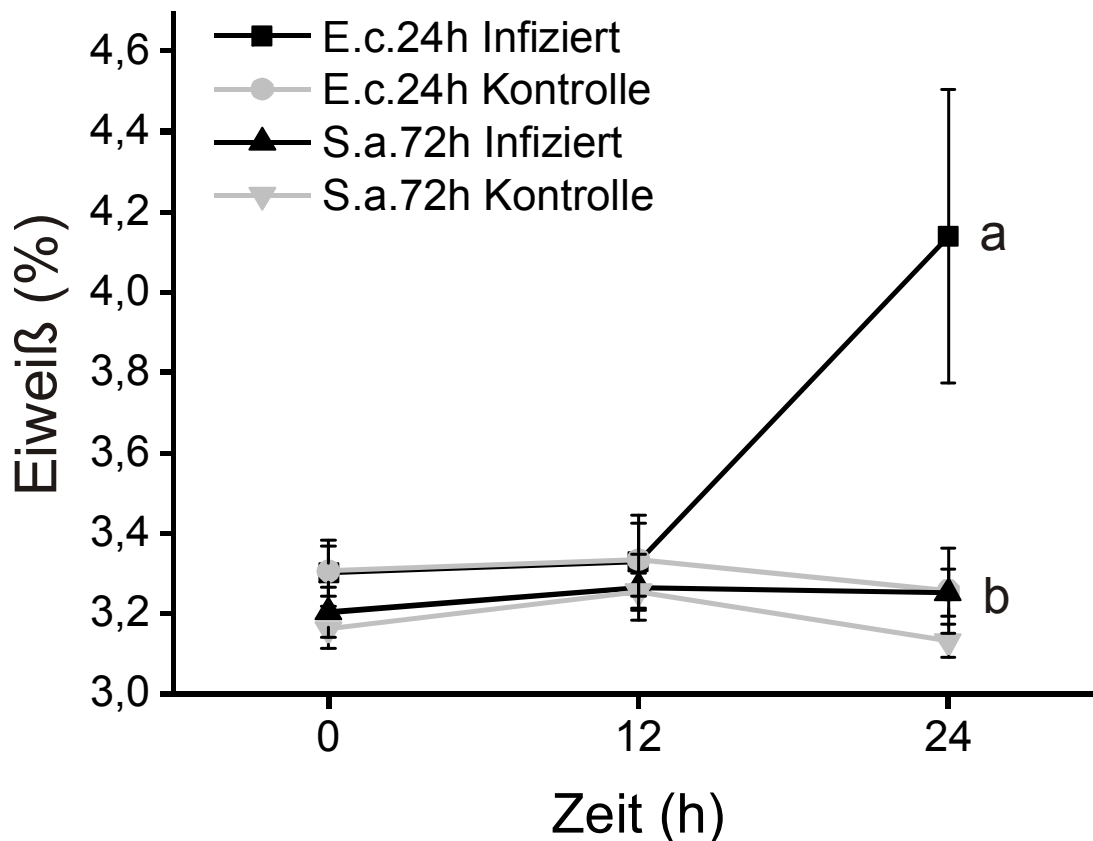
**Abbildung 18: Veränderungen des Milchfettgehaltes auf den Kontrollvierteln der Gruppe *E.c.24h* und *S.a.72h* von 12h p.i. zu 24h p.i.**

Dargestellt sind die Differenzen ( $\Delta$ ) des Milchfettes für die Kontrollviertel der Gruppen *E.c.24h* und *S.a.72h*. Positive Werte stellen einen höheren Milchfettgehalt und negative Werte einen niedrigeren Milchfettgehalt dar. Die Ausgangswerte sind als gestrichelte Linie dargestellt. Es wurden für beide Gruppen  $n = 10$  Kontrollviertel ausgewertet. Boxplots: Median (—); MW (▪); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊔) Perzentil. \* ( $p < 0,05$ )

#### 4.2.5.2 Eiweiß

Als weiterer Parameter wurde zu jeder Melkzeit der Eiweißgehalt (%) auf Viertelebene bestimmt (siehe 3.3.9). Abbildung 19 zeigt die Veränderungen des Eiweißgehaltes nach Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* in den ersten 24h p.i.. Zum Versuchsbeginn lag der Ausgangswert der Gruppe *E.c.24h* bei  $\bar{x} 3,30 \pm 0,18\%$  Eiweiß im Gemelk der später infizierten Viertel. Nach 12h enthielten die Milchproben der infizierten Viertel  $\bar{x} 3,33 \pm 0,26\%$  Eiweiß. Der Eiweißgehalt auf den Kontrollvierteln lag ebenfalls wieder im gleichen Bereich mit  $\bar{x} 3,34 \pm 0,29\%$  Eiweiß. Erst zum Zeitpunkt 24h p.i. konnte ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) des Gesamteiweiß auf den infizierten Vierteln mit  $\bar{x} 4,14 \pm 0,63\%$  verzeichnet werden. Auf den Kontrollvierteln war kein Anstieg zu verzeichnen, hier lag der Eiweißgehalt bei  $\bar{x} 3,26 \pm 0,34\%$  (siehe Abbildung 19).

In der Gruppe *S.a.72h* lag der Eiweißgehalt bei Versuchsbeginn auf den infizierten Vierteln bei  $\bar{x}$  3,20 ± 0,14% Eiweiß. Auf den Kontrollvierteln konnten vergleichbare Werte für Eiweiß gemessen werden ( $\bar{x}$  3,16 ± 0,15%). Auch zum Zeitpunkt 12h p.i. lag der Wert der infizierten Viertel mit  $\bar{x}$  3,27 ± 0,19% Eiweiß wieder dicht beim Eiweißgehalt der Kontrollviertel mit  $\bar{x}$  3,26 ± 0,15% Eiweiß. 24h nach der Infektion konnte weder auf den infizierten Vierteln ( $\bar{x}$  3,25 ± 0,13% Eiweiß) noch auf den Kontrollvierteln ( $\bar{x}$  3,13 ± 0,13% Eiweiß) ein Anstieg verzeichnet werden (siehe Abbildung 19).

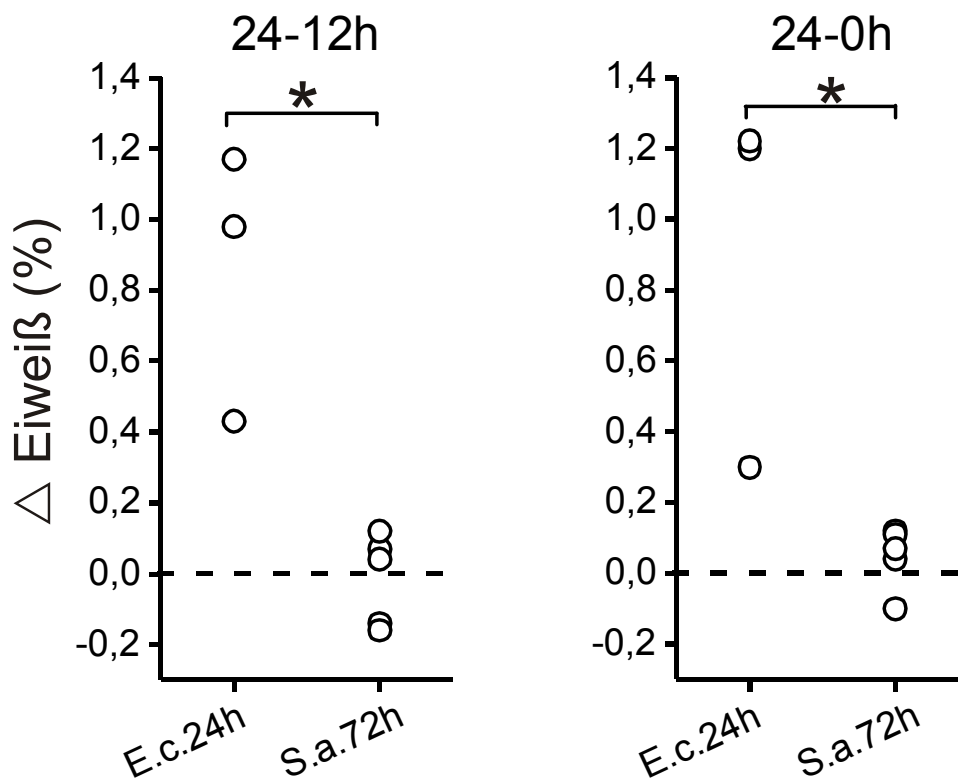


**Abbildung 19: Eiweißgehalt in der Milch nach experimenteller Mastitis durch *E. coli* und *S. aureus***

Dargestellt ist der Gesamteiweißgehalt in Prozent ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) nach Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* in einem Euterviertel. Die Anzahl der Proben beträgt für die infizierten Viertel jeweils  $n = 5$ , außer zum Zeitpunkt 24h p.i. bei der *E.c.24h*-Gruppe ( $n = 3$ ). Bei den Kontrollvierteln wurden zu jedem Zeitpunkt  $n = 10$  pro Gruppe für die Auswertung berücksichtigt. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den infizierten Vierteln ( $p < 0,05$ ).

Der Eiweißgehalt wurde zudem noch als Differenz zwischen den Melkzeiten bestimmt. So konnten Veränderungen über einen Zeitraum von 12 bzw. 24 Stunden beurteilt werden. Hierfür wurden die 0h-Werte von den 12h-Werten sowie die 12h- von den 24h-Werten

abgezogen. Um einen Überblick über den gesamten Zeitraum von 24h zu bekommen, wurden die Eiweißgehalte zum Zeitpunkt 0h von den Werten zum Zeitpunkt 24h p.i. subtrahiert. Die Differenzen zeigten signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den beiden Infektionsmodellen (siehe Abbildung 20). Der Anstieg des Eiweißgehaltes der mit *E. coli* infizierten Viertel 24h p.i. spiegelt sich auch in diesen Vergleichen zwischen den Melkzeiten in der Infektionsphase wieder, während sich die Kontrollviertel und die infizierten Viertel der *S.a.72h*-Gruppe nicht veränderten. Die Unterschiede zwischen den beiden ersten Melkzeiten (12-0h) waren nicht signifikant (nicht dargestellt).

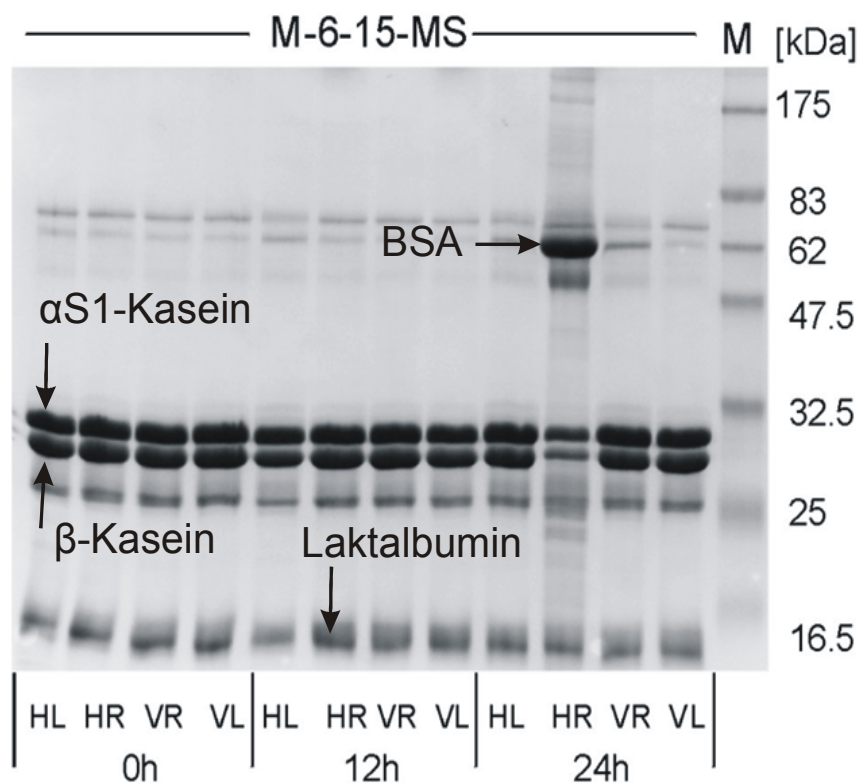


**Abbildung 20: Differenzen des Milcheiweißgehaltes der Gruppe *E.c.24h* und *S.a.72h* auf den infizierten Vierteln zwischen den Melkzeiten**

Dargestellt sind die Differenzen ( $\Delta$ ) des Eiweißgehaltes für die infizierten Viertel der Gruppen *E.c.24h* und *S.a.72h*. In der Abbildung links wurde ein 12h-Intervall zwischen der 12h- und 24h-Melkzeit dargestellt, in der rechten Abbildung wurde der gesamte Versuchszeitraum von der Gruppe *E.c.24h* erfasst. Positive Werte stellen einen höheren, negative Werte einen niedrigeren Eiweißgehalt dar. Die gestrichelte Linie stellt den Ausgangswert dar. Für die infizierten Viertel der *E.c.24h*-Gruppe wurden  $n = 3$  Werte berücksichtigt, für die infizierten Viertel von *S.a.72h*  $n = 5$ . \*( $p < 0,05$ ).

Der unter 4.2.5.2 dokumentierte Eiweißanstieg in der Milch bei den *E.c.24h*-Tieren wurde zum Anlass genommen, das Gesamteiweiß im Milchserum auf dessen Zusammensetzung zu untersuchen. Die Analyse der verschiedenen Eiweißfraktionen wurde freundlicherweise im

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf von Herrn Dr. Wolfgang Tomek durchgeführt. Nach Aufbereitung der Milchseren wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli für die *E.c.24h*-Gruppe auf 10%-Gelen (AA: Bis AA = 30:0.8) angefertigt. Die Gele wurden dann mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Charakteristischerweise konnte zum Zeitpunkt 24h p.i. bei allen Tieren eine Eiweißbande mit 62 kDa nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21). Diese Eiweißbande entspricht bovinem Serum Albumin (BSA). Gleichzeitig zeigten sich die Banden der vorherrschenden Milchproteine ( $\alpha$ S1-Kasein,  $\beta$ -Kaseine) deutlich verringert. Zum Zeitpunkt 12h p.i. waren noch keine Veränderungen feststellbar.



**Abbildung 21: Eiweißzusammensetzung im Milchserum nach experimenteller Infektion mit *E. coli***

Dargestellt sind exemplarisch bei einem Tier die einzelnen Eiweißfraktionen als schwarze Banden. Auf dem infizierten Viertel (HR) ist zum Zeitpunkt 24h p.i. eine deutliche Bande bei 62 kDa zu sehen. Diese entspricht bovinem Serum Albumin (BSA).

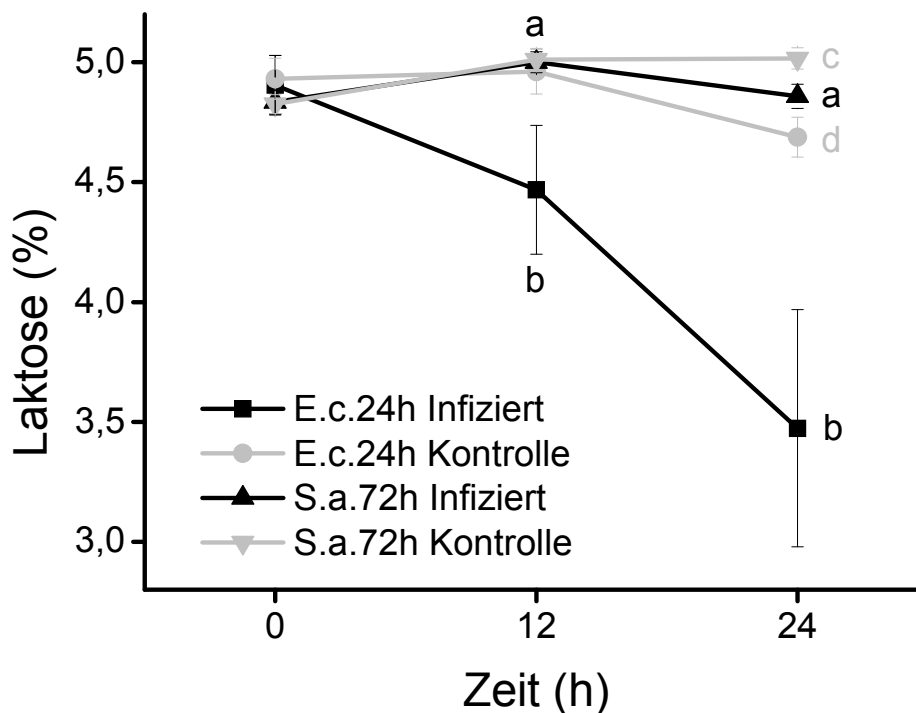
### 4.2.5.3 Laktose

Der Laktosegehalt wurde ebenfalls zu jeder Melkzeit pro Viertelgemelk bestimmt. Zu Beginn des Versuchs zeigten alle Viertel physiologische Werte. In der *E.c.24h*-Gruppe lag der Mittelwert zum Zeitpunkt 0h bei  $\bar{x} 4,90 \pm 0,28\%$  Laktose auf den später infizierten Vierteln und bei  $\bar{x} 4,93 \pm 0,27\%$  Laktose auf den Kontrollvierteln. Bereits 12h nach Versuchsbeginn konnte auf dem infizierten Viertel ein signifikanter Abfall auf  $\bar{x} 4,47 \pm 0,60\%$  Laktose im Gemelk verzeichnet werden, während auf den Kontrollvierteln der Wert mit  $\bar{x} 4,96 \pm 0,29\%$  nahezu gleich blieb. Erst 24h p.i. zeigten auch die Kontrollviertel ein leichtes Absinken auf  $\bar{x} 4,69 \pm 0,26\%$ . Die infizierten Viertel waren zu diesem Zeitpunkt ebenfalls weiter auf  $\bar{x} 3,47 \pm 0,86\%$  Laktose gesunken (siehe Abbildung 22).

In der *S.a.72h*-Gruppe lag der Mittelwert im Gemelk der später infizierten Viertel zu Beginn bei  $\bar{x} 4,83 \pm 0,11\%$  Laktose und in den Kontrollvierteln bei  $\bar{x} 4,83 \pm 0,12\%$ . Zum Zeitpunkt 12h p.i. konnte ein leichter Anstieg auf den infizierten ( $\bar{x} 5,0 \pm 0,10\%$ ), sowie nicht infizierten Vierteln ( $\bar{x} 5,01 \pm 0,14\%$ ) verzeichnet werden, dieser war jedoch nicht signifikant. Im weiteren Verlauf des Infektionsversuchs sank der Laktosegehalt im Gemelk der infizierten Viertel auf das Ausgangsniveau von  $\bar{x} 4,86 \pm 0,11\%$  Laktose, während bei den Kontrollvierteln der Mittelwert mit dem 12h-Wert fast identisch war ( $\bar{x} 5,02 \pm 0,14\%$ ).

Beim Vergleich der Laktosegehalte zwischen den zwei Infektionsmodellen unterschieden sich die infizierten Viertel zu den Zeitpunkten 12h und 24h p.i. signifikant ( $p < 0,05$ ), verursacht durch das starke Absinken der Laktose bei der *E.c.24h*-Gruppe (siehe Abbildung 22). Die Kontrollviertel der beiden Gruppen zeigten zum Zeitpunkt 24h p.i. ebenfalls einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ).





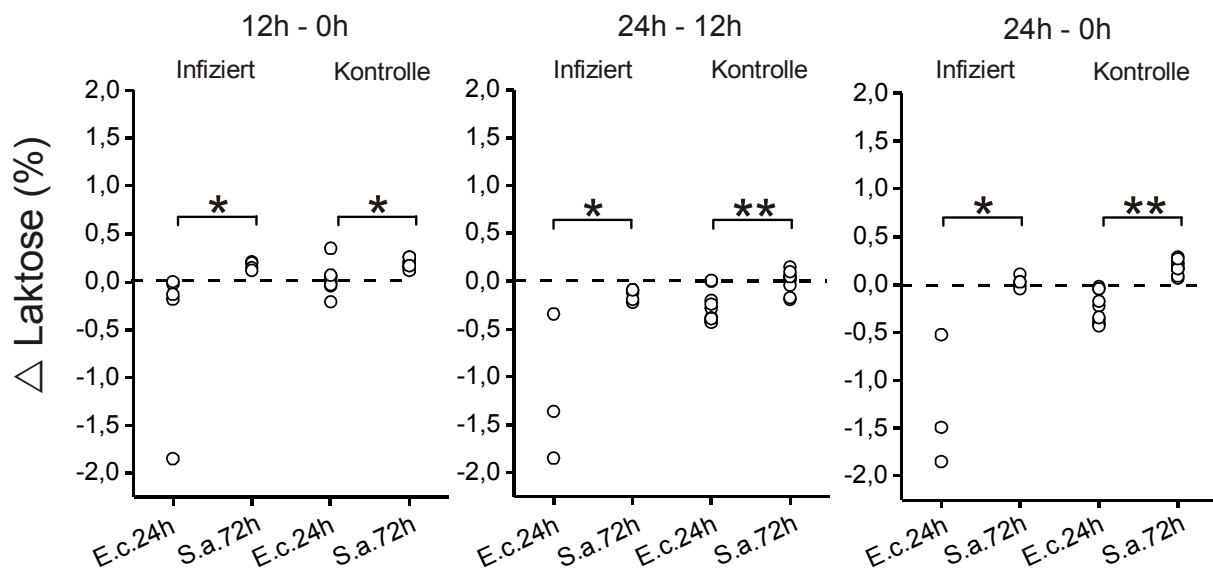
**Abbildung 22: Laktosegehalt in der Milch nach experimenteller Mastitis durch *E. coli* und *S. aureus***

Dargestellt ist der Laktosegehalt in % ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) nach Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus*. Die Anzahl der Proben beträgt für die infizierten Viertel jeweils  $n = 5$ , außer zum Zeitpunkt 24h p.i. bei der *E.c.24h*-Gruppe ( $n = 3$ ). Bei den Kontrollvierteln wurden zu jedem Zeitpunkt  $n = 10$  pro Gruppe für die Auswertung berücksichtigt. Die Buchstaben a und b kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zum jeweiligen Zeitpunkt zwischen den infizierten Vierteln, die Buchstaben c und d zwischen den Kontrollvierteln der beiden Infektionsmodelle.

Für die Darstellung der Unterschiede zwischen zwei Melkzeiten wurden die Differenzen des Laktosegehaltes im Gemelk ermittelt. Danach wurden die beiden Infektionsmodelle miteinander verglichen. Nachdem die 0h-Werte von den 12h-Werten subtrahiert wurden, konnten signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den infizierten sowie den Kontrollvierteln der beiden Gruppen gesehen werden (siehe Abbildung 23). Der Laktosegehalt im Gemelk der *E.c.24h*-Tiere sank in den infizierten Vierteln gegenüber dem Ausgangswert ab.

Im nächsten 12h-Intervall (24-12h) sanken die Werte der *E.c.24h*-Gruppe weiter ab, diesmal jedoch sowohl auf den infizierten Vierteln ( $p < 0,05$ ) als auch auf den Kontrollvierteln ( $p < 0,001$ ).

Dies zeigte sich auch, wenn die Ausgangswerte von den 24h-Werten abgezogen wurden und der komplette Beobachtungszeitraum betrachtet wurde. Der Laktosegehalt der *E.c.24h*-Tiere sank signifikant gegenüber der *S.a.72h*-Gruppe im Gemelk der infizierten Viertel ( $p < 0,05$ ), wie auch auf den Kontrollvierteln ( $p < 0,001$ , siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23: Differenzen des Laktosegehaltes der Gruppen *E.c.24h* und *S.a.72h* auf den infizierten Vierteln zwischen den Melkzeiten**

Dargestellt sind die Differenzen ( $\Delta$ ) des Laktosegehaltes in der Milch der Gruppen *E.c.24h* und *S.a.72h* zwischen verschiedenen Melkzeiten. In der Abbildung links und in der Mitte wurde jeweils ein 12h Intervall dargestellt, in der rechten Abbildung wurde der gesamte Versuchszeitraum erfasst. Positive Werte stellen einen höheren prozentualen Laktosegehalt und negative Werte einen niedrigeren prozentualen Laktosegehalt gegenüber dem Ausgangswert dar. Für die infizierten Viertel der *E.c.24h*-Gruppe wurden  $n = 3$  Werte berücksichtigt, für die mit *S. aureus* infizierten Viertel  $n = 5$  und für die jeweiligen Kontrollviertel  $n = 10$ . Die gestrichelte Linie stellt den Ausgangswert dar. \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,001$ ).

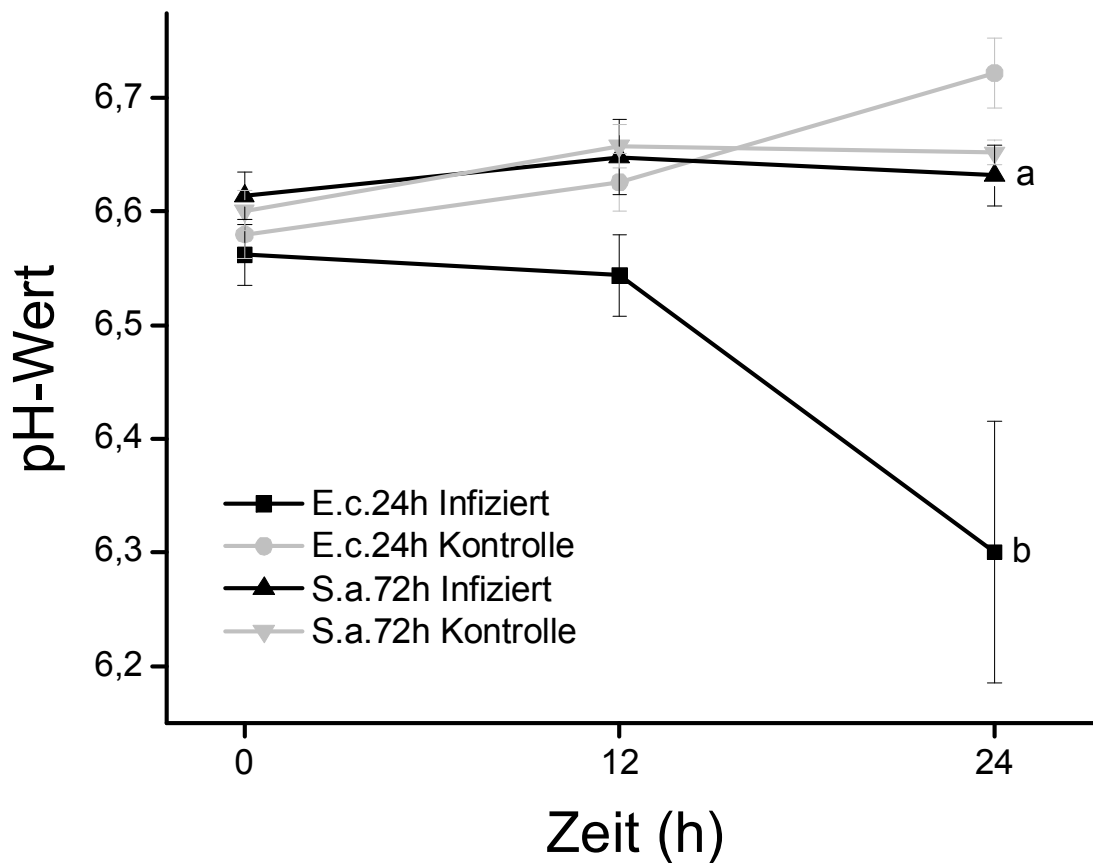
#### 4.2.5.4 pH-Wert

Der pH-Wert als bekannter Indikator für entzündliche Vorgänge im Euter wurde standardmäßig mit den Milchinhaltsstoffen bestimmt. Die Ausgangswerte aller Viertel lagen auch hier im physiologischen Bereich (6,5-6,8). Dieser blieb im Verlauf bei den Probanden der *S.a.72h*-Gruppe sowohl auf dem infizierten als auch auf den Kontrollvierteln im physiologischen Referenzbereich.

Bei der *E.c.24h*-Gruppe konnte ein Ausgangswert von  $\bar{x}$  6,56  $\pm$  0,06 auf dem später infizierten Viertel gemessen werden. Die Kontrollviertel waren ebenfalls in diesem Bereich angesiedelt ( $\bar{x}$  6,58  $\pm$  0,07). 12h nach der Inokulation war ein minimaler, statistisch nicht sicherbarer Abfall des pH-Wertes auf den infizierten Vierteln zu verzeichnen ( $\bar{x}$  6,54  $\pm$  0,08). Die Kontrollviertel dagegen zeigten einen nicht signifikanten Anstieg auf  $\bar{x}$  6,63  $\pm$  0,08, dargestellt in Abbildung 24. Diese minimalen Verschiebungen des pH-Wertes setzten sich auch 24h nach Versuchsbeginn fort. Auf den Kontrollvierteln stieg der pH-Wert weiter auf  $\bar{x}$  6,72  $\pm$  0,10, und auf den infizierten Vierteln kam es zu einem deutlichen Absinken auf  $\bar{x}$  6,3  $\pm$  0,19.

Die *S.a.72h*-Tiere zeigten während des Versuchszeitraumes einen konstanten pH-Wert. Auf den später infizierten Vierteln war zu Versuchsbeginn ein pH-Wert von  $\bar{x}$  6,61  $\pm$  0,05 zu messen. Die Kontrollviertel zeigten einen pH-Ausgangswert von  $\bar{x}$  6,60  $\pm$  0,06. Bei der nächsten Beprobung konnte auf den infizierten Vierteln ein Wert von  $\bar{x}$  6,65  $\pm$  0,07 gemessen werden, auf den Kontrollvierteln ein Wert von  $\bar{x}$  6,66  $\pm$  0,06. 12h später lag der pH-Wert auf den infizierten Vierteln bei  $\bar{x}$  6,63  $\pm$  0,06 und in den Kontrollvierteln bei  $\bar{x}$  6,65  $\pm$  0,03.

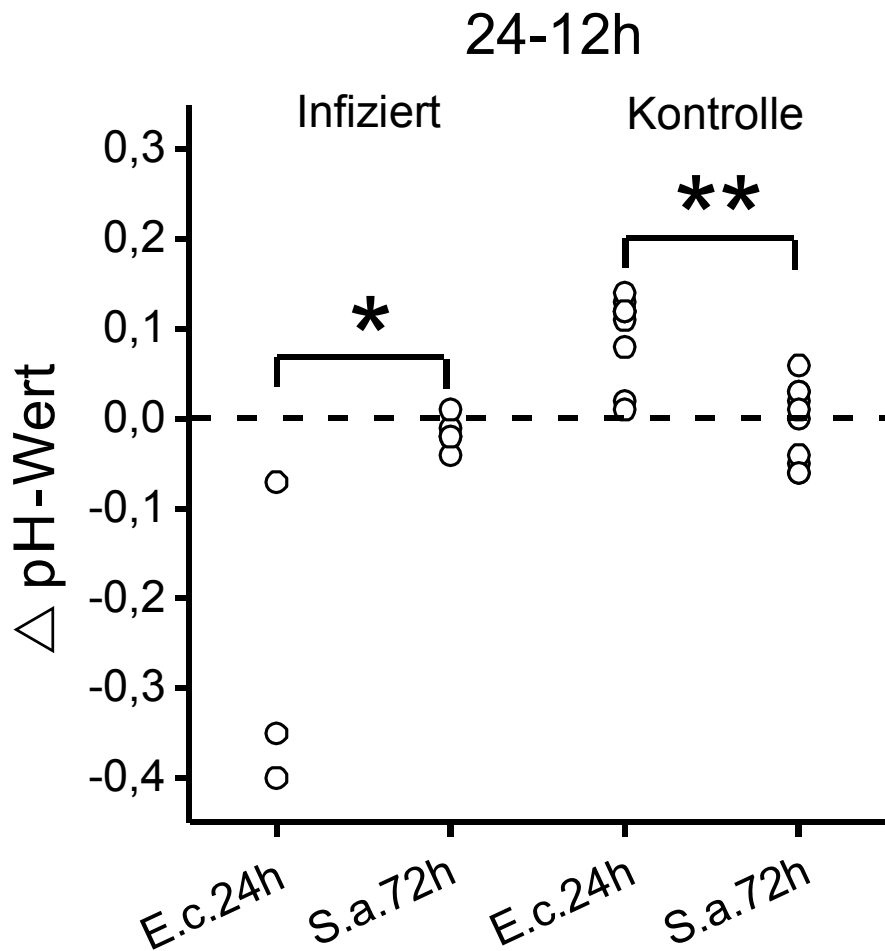
Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zeigten sich lediglich zum Zeitpunkt 24h p.i. zwischen den infizierten Vierteln der beiden Infektionsgruppen. Der pH-Wert auf den infizierten Vierteln der *E.c.24h*-Gruppe hatte sich weiter in den sauren Bereich verschoben. Das Kontrollviertel dieser Gruppe hingegen zeigte eine Tendenz (nicht signifikant) zu einem höheren pH-Wert (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: pH-Wert der Milch nach experimenteller Mastitis durch *E. coli* und *S. aureus***

Dargestellt ist der pH-Wert ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) nach Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus*. Die Anzahl der Proben beträgt für die infizierten Viertel jeweils  $n = 5$ , außer zum Zeitpunkt 24h p.i. bei der *E.c.24h*-Gruppe ( $n = 3$ ). Bei den Kontrollvierteln wurden zu jedem Zeitpunkt  $n = 10$  pro Gruppe für die Auswertung berücksichtigt. Die Buchstaben a und b kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zum Zeitpunkt 24h p.i. zwischen den infizierten Vierteln der beiden Versuchsgruppen.

Beim pH-Wert wurden ebenfalls die Differenzen zwischen verschiedenen Melkzeiten gebildet. So konnten vor allem auch die Unterschiede zwischen den Kontrollvierteln dargestellt werden, die in Abbildung 24 zwar als Tendenz sichtbar, jedoch nicht signifikant waren. Auch hier wurden wieder die Viertelgemelke der beiden Infektionsmodelle verschiedener Melkzeiten verglichen. Im ersten 12h-Melkintervall zeigten sich keine Unterschiede (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Veränderungen waren am deutlichsten nachdem die 12h-Werte von den 24h-Werten subtrahiert worden waren. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den infizierten Vierteln ( $p < 0,05$ ) sowie den Kontrollvierteln ( $p < 0,001$ ) der beiden Modelle (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25: Differenzen des pH-Wertes der Gruppe *E.c.24h* und *S.a.72h* auf den infizierten Vierteln und den Kontrollvierteln**

Dargestellt sind die Differenzen ( $\Delta$ ) des pH-Wertes in der Milch der Gruppen *E.c.24h* und *S.a.72h*. Positive Werte stellen einen höheren pH-Wert und negative Werte einen niedrigeren pH-Wert dar. Für die infizierten Viertel der *E.c.24h*-Gruppe wurden  $n=3$  Werte berücksichtigt, für die infizierten Viertel von *S. aureus*  $n=5$  und für die Kontrollviertel  $n=10$ . Die gestrichelte Linie stellt die Ausgangswerte dar. \*( $p < 0,05$ ) \*\*( $p = 0,001$ ).

#### 4.2.5.5 Harnstoff

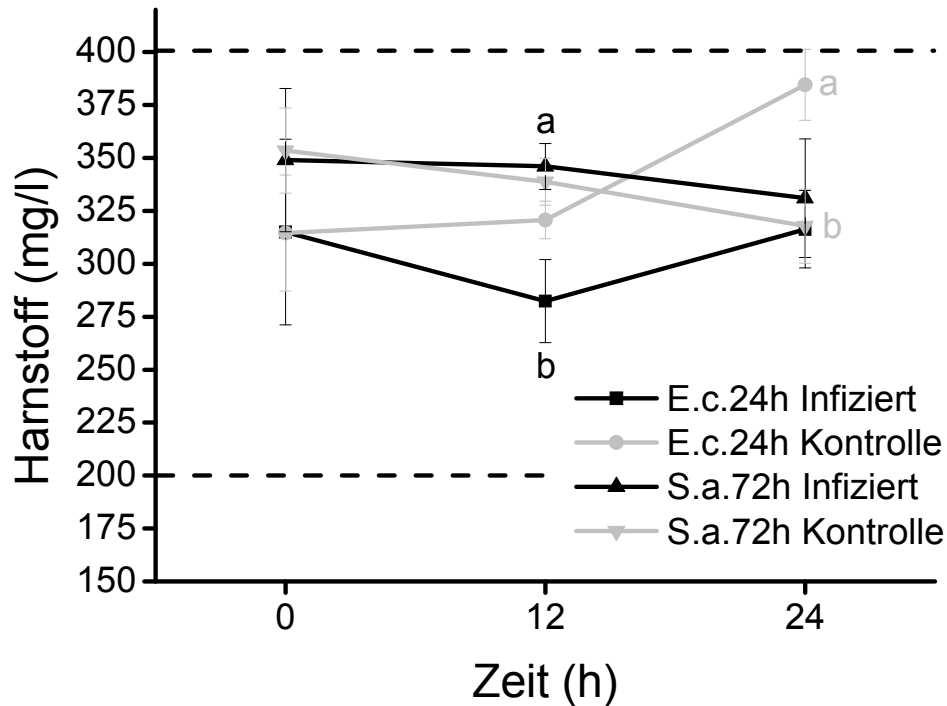
Der Milhharnstoffgehalt (mg/l) wurde im Experiment zu jeder Melkzeit bestimmt. Bereits die mittleren Ausgangswerte der Versuchsgruppen zeigten deutliche Unterschiede (siehe Abbildung 26).

In der *E.c.24h*-Gruppe lagen die Ausgangswerte der später infizierten Viertel bei  $\bar{x}$  315 ± 98,09 mg/l Harnstoff und auf den Kontrollvierteln bei  $\bar{x}$  314,5 ± 86,68 mg/l Harnstoff. Nach 12h kam es auf den infizierten Vierteln zu einem signifikanten Absinken der Harnstoffgehalte in der Milch auf  $\bar{x}$  282,4 ± 43,78 mg/l, bei den Kontrollvierteln war ein minimaler Anstieg auf  $\bar{x}$  320,7 ± 28,11 mg/l Harnstoff zu verzeichnen. Dieser Anstieg verstärkte sich zum Zeitpunkt 24h p.i. mit  $\bar{x}$  384,5 ± 53,02 mg/l Harnstoff. Auch das Gemelk der infizierten Viertel zeigte 24h p.i. einen Anstieg der Harnstoffgehalte auf  $\bar{x}$  316,33 ± 31,75 mg/l, was in etwa den Ausgangswerten zum Zeitpunkt 0h entsprach (siehe Abbildung 26).

In der *S.a.72h*-Gruppe lagen die Harnstoffwerte in der Milch der später infizierten Viertel mit  $\bar{x}$  349 ± 75,49 mg/l und die der Kontrollviertel mit  $\bar{x}$  353,5 ± 63,70 mg/l zum Zeitpunkt 0h etwa im gleichen Bereich. Nach 12h kam es zu einem minimalen Absinken (nicht signifikant) sowohl bei den infizierten Vierteln ( $\bar{x}$  346 ± 24,27 mg/l) als auch bei den Kontrollvierteln ( $\bar{x}$  338,8 ± 35,16 mg/l Harnstoff). Zum Zeitpunkt 24h p.i. setzte sich diese Tendenz weiter fort. So konnte für die infizierten Viertel ein Mittelwert von  $\bar{x}$  331 ± 62,84 mg/l Harnstoff gemessen werden und für die Kontrollviertel ein Wert von  $\bar{x}$  317,8 ± 55,19 mg/l (nicht signifikant).

Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) konnten zwischen den infizierten Vierteln der beiden Gruppen nur zum Zeitpunkt 12h p.i. gefunden werden. Bei der Gruppe *E.c.24h* war der Harnstoffgehalt niedriger als in der *S.a.72h*-Gruppe. Zum Zeitpunkt 24h p.i. gab es signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Kontrollvierteln (siehe Abbildung 26), wobei die Harnstoffwerte der *E.c.24h*-Tiere höher als die der Gruppe *S.a.72h* waren.

Die beobachteten statistisch signifikanten Unterschiede lagen innerhalb des physiologischen Referenzbereichs (200-400mg/l Harnstoff). Die klinische Relevanz dieses Parameters ist daher fraglich und muss näher diskutiert werden.



**Abbildung 26: Harnstoffgehalt in der Milch nach experimenteller Mastitis durch *E. coli* und *S. aureus***

Dargestellt ist der Harnstoffgehalt in mg/l ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) nach Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus*. Die Anzahl der Proben beträgt für die infizierten Viertel jeweils  $n = 5$ , außer zum Zeitpunkt 24h p.i. bei der *E.c.24h*-Gruppe ( $n = 3$ ). Bei den Kontrollvierteln wurden zu jedem Zeitpunkt  $n = 10$  pro Gruppe für die Auswertung berücksichtigt. Die Buchstaben a und b kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zum jeweiligen Zeitpunkt. Die gestrichelten Linien markieren den Referenzbereich.

Um Veränderungen zwischen zwei Melkzeiten aufzuzeigen, wurden auch hier die Differenzen zwischen verschiedenen Melkzeiten gebildet. Es ergaben sich lediglich zwischen den Kontrollvierteln signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Es konnte zum Vergleichsintervall 24-12h ein deutlicher Anstieg des Harnstoffgehaltes im Gemelk der Kontrollviertel der *E.c.24h*-Gruppe beobachtet werden (siehe Abbildung 27), während die Werte der *S.a.72h*-Tiere etwa auf dem gleichen Niveau blieben (siehe Abbildung 27).

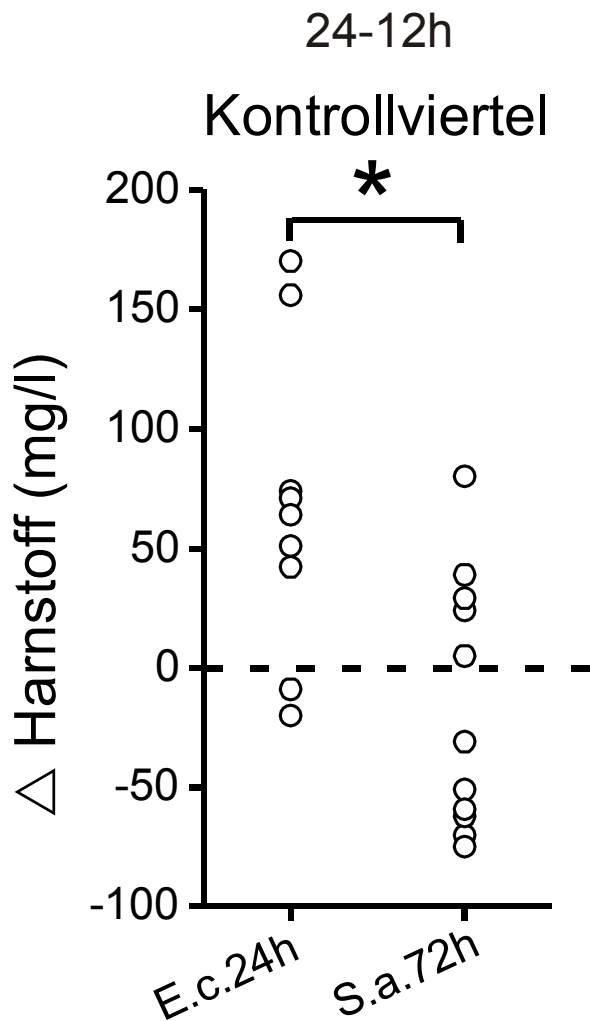


Abbildung 27: Veränderungen des Harnstoffgehaltes der Gruppe *E.c.24h* und *S.a.72h* auf den Kontrollvierteln zwischen den Melkzeiten 12h und 24h p.i.

Dargestellt sind die Differenzen ( $\Delta$ ) des Harnstoffgehaltes in der Milch der Gruppen *E.c.24h* und *S.a.72h*. Positive Werte stellen einen höheren Harnstoffgehalt und negative Werte einen niedrigeren Harnstoffgehalt zum späteren Zeitpunkt dar. Es wurden  $n = 10$  Kontrollviertel für beide Gruppen berücksichtigt. Die gestrichelte Linie stellt den Ausgangswert dar.  $*(p < 0,05)$ .



### 4.3 Einfluss einer experimentellen Mastitis auf entzündungsrelevante Parameter des Milchdrüsenparenchyms

#### 4.3.1 Histologische Veränderungen

Am Ende der Expositionsphase des Euters mit *E. coli* oder *S. aureus* wurden die Tiere geschlachtet und Eutergewebe und Euter- sowie Buglymphknoten der experimentell infizierten Tiere pathologisch-anatomisch untersucht und Proben zur pathologisch-histologischen Befundung gewonnen (siehe 3.3.18).

Euterviertel, die mit *E. coli* über einen Zeitraum von 24h infiziert worden waren, zeigten ausnahmslos ein mittel- bis hochgradiges Ödem des interstitiellen und subkutanen Bindegewebes, eine deutlich diffuse Rötung der Drüsenanschnittfläche und eine deutliche Vergrößerung des Euterviertels. Bei den experimentell mit *S. aureus*-infizierten Tieren unterschieden sich infizierte Viertel dagegen nur geringgradig von den Kontrollvierteln. Sie waren leicht vergrößert und nur geringgradig rötlich verfärbt.

Die pathologisch-histologischen Befunde des Milchdrüsenparenchyms wie auch von lokalen und peripheren Lymphknoten sind in Tabelle 13, 14, 15, 16 und 17 zusammengefasst.

Insbesondere traten akute, eitrig-entzündliche Prozesse in den Vordergrund, die in pathogenetischem Zusammenhang mit der experimentellen Mastitis standen. Sie waren bei allen *E.c24h*-Tieren in hohem Maße in den infizierten Eutervierteln zu finden. Es konnte zudem das Auftreten von Nekrosen beobachtet werden. Tier M-6-16 reagierte auf dem Placebo-Viertel entzündlich, wie auf dem infizierten Viertel, mit deutlich milderer Ausprägung. Es handelte sich hierbei um zwei unmittelbar benachbarte Viertel (vgl. 4.2.2).

Eine entsprechende Ausprägung der pathologischen Befunde war bei dem kurzen Versuchszeitraum von 6h nur andeutungsweise zu sehen. Die entzündlichen Prozesse waren deutlich geringer ausgeprägt als bei den *E.c.24h*-Tieren. Eine Ödematisierung konnte nicht bei allen Tieren festgestellt werden und war allenfalls geringgradig ausgeprägt (siehe Tabelle 13).

Im Gegensatz dazu standen die Befunde von den Tieren, die mit *S. aureus* infiziert worden waren: Hier waren zwar in den betroffenen Vierteln akute, eitrig-entzündliche Prozesse zu finden, meist jedoch in geringradiger Ausprägung. Die zumeist hochgradige interstitielle Ödematisierung der mit *E. coli*-infizierten Viertel fehlte oder war bei der *S.a.72h*-Gruppe weniger stark ausgeprägt. Lymphozytär, interstitiell entzündliche Prozesse konnten vor allem

bei mit *S. aureus*-infizierten Vierteln beobachtet werden.

In der Gruppe GS waren bis auf Tier M-6-17 die Euterviertel aller Tiere ohne besonderen Befund. Das Tier M-6-17 zeigte Anzeichen einer gering- bis mittelgradigen chronischen Mastitis mit interstitiellen lymphozytären Infiltraten und Fibrose. Es waren vor allem die Viertel vorne rechts und hinten rechts betroffen. Auch die Euterlymphknoten zeigten beidseits mittelgradige folliculäre und pulpöse Hyperplasien.

**Tabelle 13: Pathologisch-histologische Befunde des Eutergewebes nach experimenteller Infektion mit *E. coli* über einen Zeitraum von 6h**

Euterviertel	Tier	Eitrige- entzündliche Prozesse	Nekrose	Eitrige Galaktophoritis	Interstitielle Ödematisierung
<b>HR Infektion</b>	M-6-3	+	-	-	+
<b>HR Infektion</b>	M-6-4	-	-	-	-
<b>HR Infektion</b>	M-6-5	-	-	-	-
<b>HR Infektion</b>	M-6-6	+	-	-	+
<b>HR Infektion</b>	M-6-7	+	-	-	+

Aufgelistet sind die pathologisch-histologischen Befunde von 5 Tieren, die experimentell mit 500 CFU *E. coli* intramammär infiziert wurden. Die Proben wurden zum Zeitpunkt 6h p.i. nach Schlachtung der Tiere gewonnen. Die Kontrollviertel zeigten keinerlei Veränderungen (hier nicht dargestellt). Grad der Veränderung: - = keine; + = geringgradig.

**Tabelle 14: Pathologisch-histologische Befunde des Eutergewebes nach experimenteller Infektion mit *E. coli* über einen Zeitraum von 24h**

<b>Euterviertel</b>	<b>Tier</b>	<b>Eitrige-entzündliche Prozesse</b>	<b>Nekrose</b>	<b>Eitrige Galaktophoritis</b>	<b>Interstitielle Ödematisierung</b>
<b>HR Infektion</b>	M-6-8	+++	+	++	+++
<b>HR Infektion</b>	M-6-12	+++	++	++	+++
<b>HR Infektion</b>	M-6-15	+++	++	++	+++
<b>HR Infektion</b>	M-6-16	+++	+++	++	+++
<b>HR Infektion</b>	M-6-19	++	+	++	+
<b>VR Kontrolle</b>	M-6-8	-	-	-	-
<b>VR Kontrolle</b>	M-6-12	-	-	-	-
<b>VR Kontrolle</b>	M-6-15	-	-	-	-
<b>VR Kontrolle</b>	M-6-16	-	-	-	-
<b>VR Kontrolle</b>	M-6-19	-	-	-	-
<b>VL Kontrolle</b>	M-6-8	-	-	-	-
<b>VL Kontrolle</b>	M-6-12	-	-	-	-
<b>VL Kontrolle</b>	M-6-15	-	-	-	-
<b>VL Kontrolle</b>	M-6-16	-	-	-	-
<b>VL Placebo</b>	M-6-19	-	-	-	-
<b>HL Placebo</b>	M-6-8	-	-	-	-
<b>HL Placebo</b>	M-6-12	-	-	-	-
<b>HL Placebo</b>	M-6-15	-	-	-	-
<b>HL Placebo</b>	M-6-16	++	++	++	+
<b>HL Kontrolle</b>	M-6-19	-	-	-	-

Aufgelistet sind die pathologisch-histologischen Befunde von 5 Tieren, die experimentell mit 500 CFU *E. coli* intramammär infiziert wurden. Die Proben wurden zum Zeitpunkt 24h nach Infektion gewonnen. Grad der Veränderung: - = keine; + = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig.

**Tabelle 15: Pathologisch-histologische Befunde des Eutergewebes nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* über einen Zeitraum von 72h**

Euterviertel	Tier	Eitrig-entzündlicher Prozesse	interstitielle lymphozytäre Infiltrate	Eitrige Galaktophoritis	Interstitielle Ödematisierung
HR Infektion	M-7-20	++	+	++	++
HR Infektion	M-7-23	++	++	+	++
HR Infektion	M-7-28	++	++	-	+
HR Infektion	M-7-29	+	+	-	-
HL Infektion	M-7-30	++	+	+	-

Aufgelistet sind die pathologisch-histologischen Befunde von 5 Tieren, die experimentell mit 10.000 CFU *S. aureus* intramammär infiziert wurden. Die Proben wurden zum Zeitpunkt 72h nach Infektion gewonnen. Grad der Veränderung: - = keine; + = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig.

Neben dem Milchdrüsengewebe wurden ebenfalls regionale sowie Buglymphknoten vergleichend untersucht. Die Euterlymphknoten (*Lnn. mammarii*) der infizierten Euterseite waren bei allen *E.c.24h*-Tieren am stärksten durch eitrig-entzündliche Prozesse gekennzeichnet. Wie bereits im Drüsengewebe zu sehen, waren auch hier wieder die Veränderungen bei den Tieren, die mit *E. coli* infiziert worden waren, stärker ausgeprägt als bei denen, die mit *S. aureus* infiziert worden waren. Bei den *S. a.72h*-Tieren zeigten lediglich 2 Tiere geringgradig eitrig-entzündliche Prozesse am Euterlymphknoten der infizierten Seite.

Die Buglymphknoten (*Lnn. cervicales superficiales*) wiesen lediglich eine z.T. mittelgradig ausgeprägte Hyperplasie auf, aber zeigten keine eitrigen Veränderungen (siehe Tabelle 16).

Bei den mit *S. aureus*-infizierten Tieren waren die Buglymphknoten ohne besonderen Befund (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 16: Pathologisch-histologische Befunde der Lymphknoten nach experimenteller Infektion mit *E. coli* über einen Zeitraum von 24h**

Tier	Lymphknoten	eitrige Lymphadenitis	Ödematisierung	follikuläre Hyperplasie
M-6-8	<b>Euterlymphknoten R</b>	++	++	-
	Euterlymphknoten L	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	-
M-6-12	<b>Euterlymphknoten R</b>	++	+	-
	Euterlymphknoten L	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	+
M-6-15	<b>Euterlymphknoten R</b>	-	-	-
	Euterlymphknoten L	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	+
M-6-16	<b>Euterlymphknoten R</b>	+++	-	-
	Euterlymphknoten L	++	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	++
	Buglymphknoten L	-	-	++
M-6-19	<b>Euterlymphknoten R</b>	++	-	-
	Euterlymphknoten L	-	-	+
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	+

Aufgelistet sind die pathologisch-histologischen Befunde von 5 Tieren, die experimentell mit 500 CFU *E. coli* intramammär infiziert wurden. Die Proben wurden zum Zeitpunkt 24h nach Infektion gewonnen. Regionale Lymphknoten der infizierten Seite sind fett gedruckt. Grad der Veränderung: - = keine; + = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig.

**Tabelle 17: Pathologisch-histologische Befunde der Lymphknoten nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* über einen Zeitraum von 72h**

Tier	Lymphknoten	eitrige Lymphadenitis	Ödematisierung	follikuläre Hyperplasie
M-7-20	<b>Euterlymphknoten R</b>	+	-	-
	Euterlymphknoten L	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	-
M-7-23	<b>Euterlymphknoten R</b>	-	-	-
	Euterlymphknoten L	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	-
M-7-28	<b>Euterlymphknoten R</b>	++	-	-
	Euterlymphknoten L	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	-
M-7-29	<b>Euterlymphknoten R</b>	-	-	-
	Euterlymphknoten L	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	-
M-7-30	Euterlymphknoten R	-	-	-
	<b>Euterlymphknoten L</b>	-	-	-
	Buglymphknoten R	-	-	-
	Buglymphknoten L	-	-	-

Aufgelistet sind die pathologisch-histologischen Befunde von 5 Tieren, die experimentell mit 10.000 CFU *S. aureus* intramammär infiziert wurden. Die Proben wurden zum Zeitpunkt 72h nach Infektion gewonnen. Regionale Lymphknoten der infizierten Seite sind fett gedruckt. Grad der Veränderung: - = keine; + = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig.

### 4.3.2 Expression entzündungsrelevanter Gene

Neben den klinischen Daten und der Analyse zellulärer wie löslicher Milchinhaltsstoffe sollten die hier eingesetzten In-vivo-Entzündungsmodelle anhand relevanter regulierter Gene begleitend charakterisiert werden. Sie sollten zudem als Beweis für die stattfindende Auseinandersetzung des Wirts mit dem Pathogen dienen. Neben den klassischerweise im infizierten Viertel regulierten entzündungsrelevanten Zytokinen und Effektormolekülen sollte auch die Regulation von Kandidatengen in benachbarten unbehandelten Kontrollvierteln (Crosstalk) untersucht werden, um die systemischen Auswirkungen zwischen den Vierteln darzustellen.

Im Rahmen der induzierten Mastitis konnte 24h nach Inokulation mit *E. coli* für die Mehrzahl der (überwiegend proinflammatorischen) untersuchten Gene eine bis zu 1285-fache Expressionssteigerung festgestellt werden (CXCL8, siehe Tabelle 18). Einzelne Gene (CCL5, 5-fach) wurden nur schwach hochreguliert. Als einziges nicht-reguliertes Gen im untersuchten Kandidatengen-Set erwies sich TGF- $\beta$ . Im Gegensatz zur *E.c.24h*-Gruppe zeigten die Tiere, die mit *S. aureus* über 72h infiziert waren, zwar eine Heraufregulation für das Defensin LAP (lingual antimicrobial peptide), jedoch blieb die Expression der untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und CXCL8 unbeeinflusst (siehe Abbildung 28).

**Tabelle 18: Expressionsstärke der mRNA-Kopien/75ng RNA immunrelevanter Gene in Milchdrüsengewebe nicht-infizierter GS-Tiere und im Gewebe *E. coli*-infizierter Euterviertel 24h p.i. bzw. *S. aureus*-infizierter Euterviertel 72h p.i.**

Gen	GS-Tiere	<i>E. coli</i> -infizierte		Vielfaches der Expression <sup>1</sup>
		GS-Tiere	Euterviertel 24h p.i.	
<b>CXCL8</b>	53 ± 9	68641 ± 34572	1285	101 ± 64
<b>CCL20</b>	78 ± 7	43155 ± 18257	554	n.u.
<b>CCL5</b>	11005 ± 1112	55979 ± 11763	5	n.u.
<b>TNF-α</b>	264 ± 28	4750 ± 1935	18	211 ± 52
<b>TGF-β</b>	1178 ± 133	1317 ± 202	1	n.u.
<b>iNOS</b>	276 ± 76	8205 ± 3995	30	n.u.
<b>SAA3</b>	31022 ± 6563	23x10 <sup>6</sup> ± 6x10 <sup>6</sup>	762	n.u.
<b>LAP</b>	1334 ± 198	148244 ± 63815	111	3007 ± 1708

Mittelwerte ± SEM der mRNA-Kopienzahl/75ng RNA aus Milchdrüsengewebe. 1) Der Mittelwert in den *E. coli*-infizierten Eutervierteln (n=5) wurde zum Mittelwert in den GS-Tier-Proben (=1, n=11) in Bezug gesetzt. n.u. = nicht untersucht.

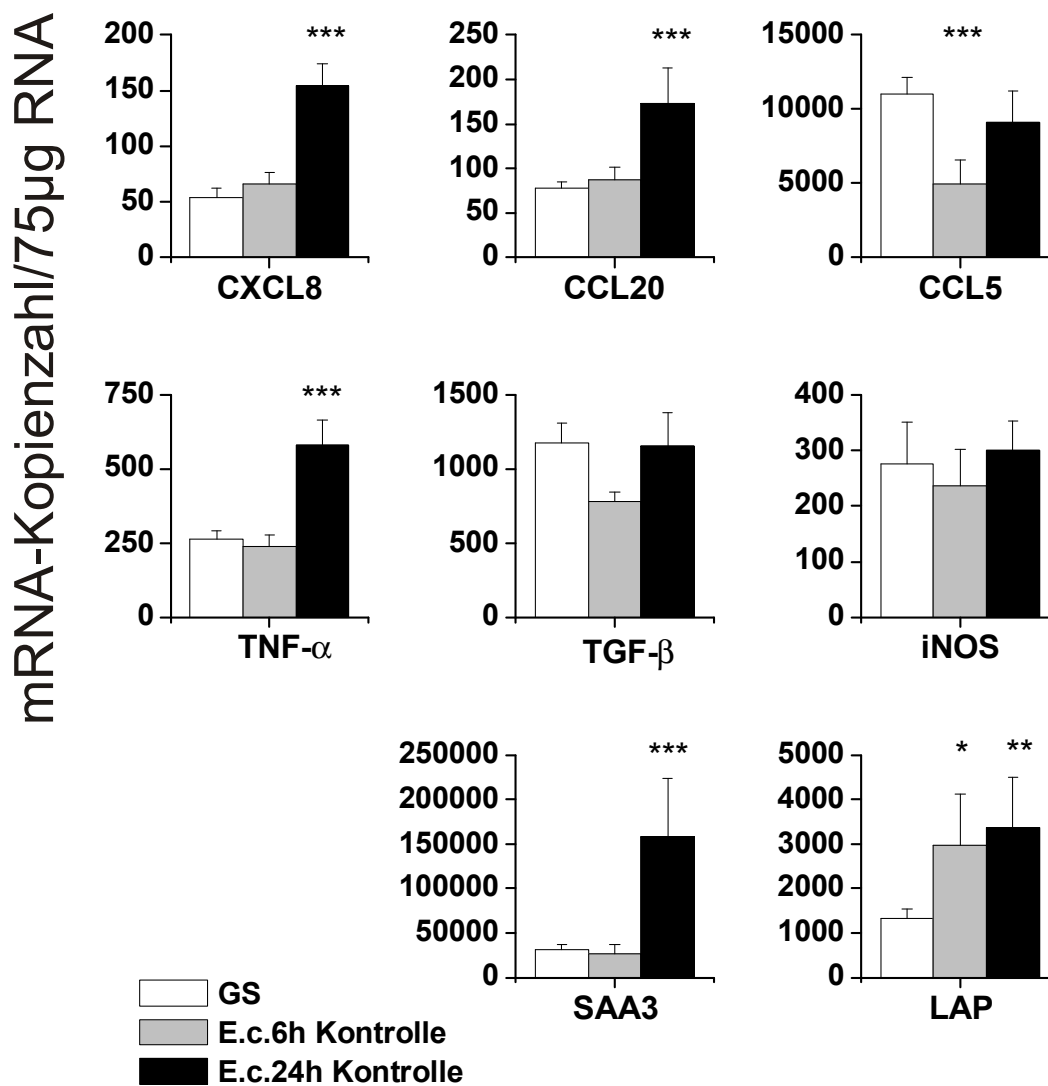
Nach Vergleich der Kontroll-Euterviertel der Gruppe *E.c.24h* mit den Eutervierteln der GS-Tiere ergab sich 6h p.i. eine signifikant verminderte mRNA-Expression des Chemokins CCL5 und eine um die 3-fach höhere Expressionsstärke des Defensins *linguales antimikrobielles Peptid* (LAP). Alle anderen Zytokine, Chemokine und Effektormoleküle wiesen keine Änderung der Expressionsstärke auf. 24h p.i. konnten in den Kontroll-Eutervierteln der *E.c.24h*-Tiere signifikant höhere mRNA-Expressionsstärken (3-5-fach) für CXCL8, CCL20, TNF-α, SAA3 und LAP im Vergleich zu GS-Eutervierteln gemessen werden (siehe Abbildung 28).

Damit konnte gezeigt werden, dass die Infektion eines Euterviertels die Expression der untersuchten Gene nicht-infizierter Kontrollviertel eines Tieres beeinflusst.



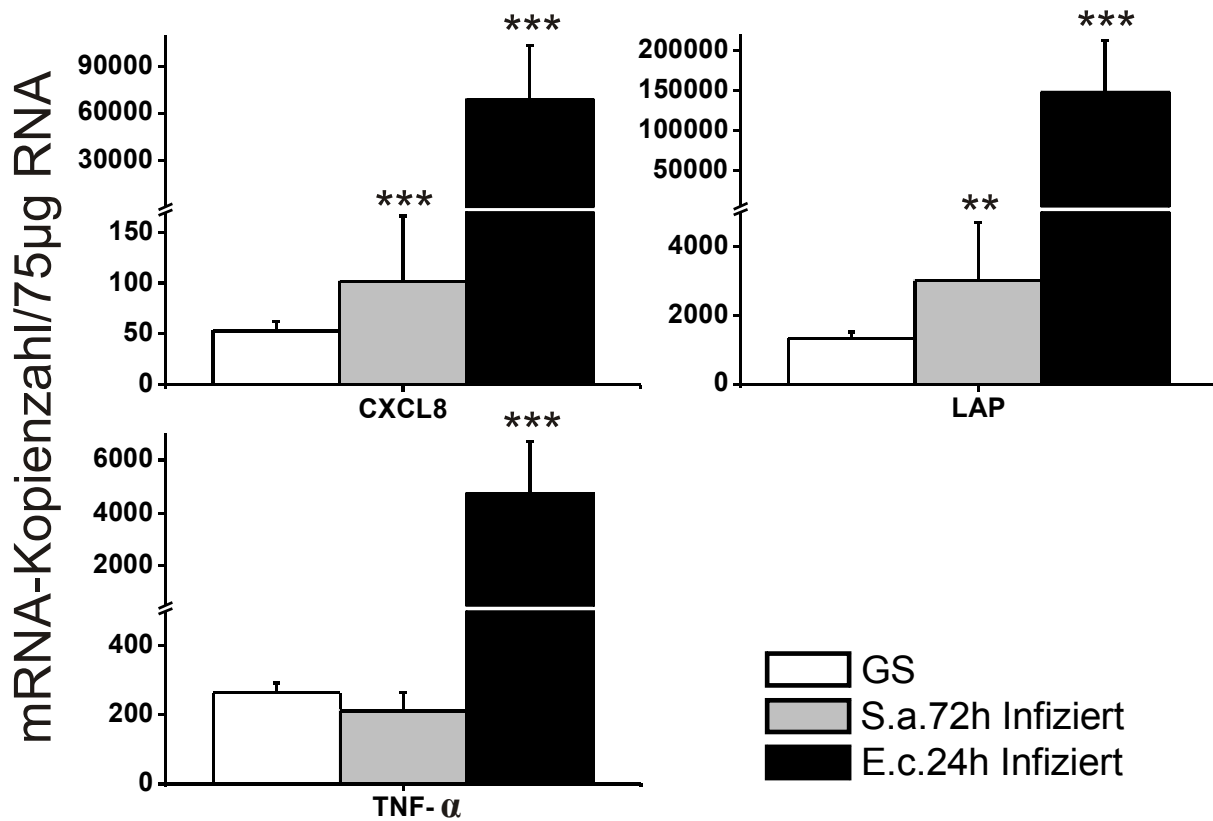
Bei den Gewebeproben der *S.a.72h*-Gruppe kam es im Gegensatz zu Proben der *E.c.24h*-Gruppe zu einem deutlich geringeren Anstieg auf den infizierten Vierteln (siehe Abbildung 29).

Im Gegensatz zur *E.c.24h*-Gruppe zeigten die Tiere, die mit *S. aureus* über 72h infiziert waren, zwar eine Heraufregulation für das Defensin LAP, jedoch blieb die Expression der untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und CXCL8 unberührt (siehe Tabelle 18)



**Abbildung 28: Expressionsmodulation ausgewählter Gene in Kontroll-Eutervierteln zu unterschiedlichen Zeiten nach Inokulation eines Viertels mit 500 CFU *E. coli***

Dargestellt sind Säulendiagramme der Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Kopienzahl/75µg RNA aus Milchdrüsenengewebe nicht-infizierter Goldstandardtiere (n = 11) und Kontroll-Eutervierteln *E. coli*-infizierter Tiere (6h und 24h p.i., jeweils n=5). Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den GS-Tieren \*\*\* = p<0,001, \*\* = p<0,01; \* = p<0,05.



**Abbildung 29: Expressionsmodulation ausgewählter Gene auf infizierten Eutervierteln zu unterschiedlichen Zeiten nach Inokulation eines Viertels mit 500 CFU *E. coli* oder 10.000 CFU *S. aureus***

Dargestellt sind Säulendiagramme der Mittelwerte ± SEM der mRNA-Kopienzahl/75μg RNA aus Milchdrüsengewebe nicht-infizierter GS-Tiere (n = 11), *E. coli*-infizierter Viertel (24h p.i., n=5) und *S. aureus*-infizierter Viertel (72h p.i., n=5). Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den GS-Tieren \*\*\* = p=0,001, \*\* = p<0,01.

## 5 Diskussion

### 5.1 Frühe Erreger-Wirts-Interaktionen im Euter sind reproduzierbar nur im Mastitismodell darstellbar

Die Mastitis des Rindes stellt eine der verlustreichsten Einzeltierkrankungen in der Milchviehwirtschaft dar. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) zählen zu den häufigsten Mastitis-Erregern. Dieser Umstand und die erreger-spezifischen, meist unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen sind die Gründe für die Verwendung der beiden Erreger im vorliegenden Dissertationsprojekt. Für die Erforschung sehr früher pathogenetischer Mechanismen der Mastitis wurde ein experimentelles Mastitis-Infektionsmodell mit *E. coli* und *S. aureus* etabliert. Ziel dieser Studie war es, anhand gezielt ausgewählter Parameter in einem definierten Entzündungsmodell initial stattfindende pathogenunspezifische und –spezifische Phänomene zu erfassen. Deren Kenntnis und Verständnis sind Ausgangspunkt für die Etablierung neuer diagnostischer, prophylaktischer und therapeutischer Konzepte.

Mastitismodelle wurden beim Rind während der letzten Jahrzehnte für viele Fragestellungen eingesetzt. Bei spontan erkrankten Tieren sind die Ausgangsbedingungen nur schwer kontrollierbar und interpretierbar. In Infektionsmodellen können diese bewusst vorgegeben werden. Entscheidend für die Aussagekraft eines Tiermodelles sind Art und Strenge der Modellgrenzen. Die Anforderungen an das Tiermodell waren jedoch in der Vergangenheit sehr unterschiedlich. In wenigen Fällen wurden die Versuchstiere streng nach Laktationszeitpunkt, Anzahl bisheriger Laktationen, niedriger Zellzahl (SCC) und wiederholt bakteriologisch negativen Befunden ausgewählt (Schukken *et al.*, 1999). In dem hier verwendeten Modell wurden ausschließlich allgemein- und eutergesunde Tiere gleichen Alters und Laktationsstadiums eingesetzt, die darüber hinaus auch im Sexualzyklusstand synchronisiert waren.

Der SCC ist ein wichtiger Parameter für die Eutergesundheit (Pyorala, 2003). Er steigt um ein Vielfaches im Verlauf einer Mastitis. Ab einer Zellzahl von >50.000 Zellen/ml konnte eine Verschiebung des Zellbildes zu Gunsten der PMN-Population festgestellt werden (Koess, 2004). Dies kann bereits als Hinweis auf eine entzündliche Veränderung angesehen werden. In unserer Studie zeigten alle Probanden bei einem Zellgehalt <50.000 Zellen/ml eine ähnliche Zusammensetzung der Milchzellpopulationen, mit lymphoiden Zellen als prädominierender Zellfraktion (Daten nicht gezeigt).

In früheren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass initial erhöhte SCC-Werte die Entzündungssymptome bei natürlicher wie experimentell ausgelöster Mastitis abschwächen (Nickerson *et al.*, 1990; Shuster *et al.*, 1996). In dem Mastitismodell von Petzl (2005) wurden Probanden eingesetzt, die einen initialen Zellgehalt von 100.000 Zellen/ml nicht überschritten. Dennoch reagierten die Tiere individuell sehr unterschiedlich auf die Inokulation mit *S. aureus*. Um die Grenzen noch strenger zu setzen, wurde im hier eingesetzten Mastitismodell ein maximaler Zellgehalt von 50.000 Zellen/ml auf Viertelgemelkeebene vorausgesetzt. Nach Kenntnis des Autors wurde dies bisher in noch keinem Mastitismodellversuch so vorgegeben.

Da die Zellzahl mit der Anzahl der Laktationen vor allem durch eine Zunahme der PMN steigt sowie mit fortschreitender Laktationsdauer die Zellzahl aller Milchzellpopulationen zunimmt (Doggweiler & Hess, 1983; Burvenich *et al.*, 1994), wurden ausschließlich Kühe in der Mitte der ersten Laktation ausgewählt. Als weiteres wichtiges Kriterium für die Auswahl der Versuchstiere galt, dass vorberichtlich keine Mastitis vorlag. Dieses Kriterium war einfacher und zuverlässiger bei erstlaktierenden Kühen zu erfüllen. Möglicherweise latent vorliegende Infektionen hätten sonst durch exogene Stressfaktoren zu einer unvorhergesehenen Mastitis führen können (Wegner *et al.*, 1976) und somit eine Vergleichbarkeit der einzelnen Tiere gefährdet.

In diesem Modell wurden die Tiere Zyklus-synchronisiert, da vermutet wird, dass die Aktivität von Milchdrüsenepithelzellen oder residenten Makrophagen hormonell gesteuert wird (Suriyasathaporn *et al.*, 2000b). Diese beiden Zelltypen sind in der Lage immunologische Reaktionen zu modulieren. Da der Zyklusstand der Kuh nachgewiesenermaßen einen Einfluss auf den Zellgehalt in der Milch hat (Pfister, 2009) und Östrogene die Reaktionslage boviner Makrophagen verändern (Petzl, 2005), kann eine Beeinflussung von Abwehrvorgängen im Euter nicht ausgeschlossen werden. Für die verbesserte Reproduzierbarkeit des Infektionsmodells wurden daher alle Tiere im Östrus infiziert. Dieser Zeitpunkt lässt sich auf einen Zeitraum von etwa 18h eingrenzen und ist in diesem Zusammenhang anderen Zyklusstadien überlegen.

Der klinische Verlauf einer Mastitis ist bekanntermaßen sehr unterschiedlich. Er wird durch Erreger-, Wirts- und Umweltfaktoren beeinflusst (Park *et al.*, 2004). Daher war es zunächst wichtig, klinische Symptome zu erfassen und deren Verlauf zu dokumentieren. Subklinische Mastitiden bleiben aufgrund fehlender Anzeichen oftmals unerkannt. Erst das Auftreten

sichtbarer Veränderungen wie Flocken in der Milch, Euterschwellung sowie Störungen des Allgemeinbefindens, lassen erkrankte Tiere erkennen. Die klinischen Parameter dienen in dem vorliegenden Modell der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs bei experimenteller Mastitis. Außerdem konnten dabei der Schweregrad und die systemische Auswirkung der Entzündung erregerspezifisch charakterisiert werden (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11).

Veränderungen der absoluten und relativen Anzahl zirkulierender Leukozyten im Blut wurden als Indikator für stattfindende entzündliche Prozesse herangezogen und sollten ebenfalls die systemischen Auswirkungen entzündlicher Prozesse charakterisieren.

Bezüglich der klinischen Parameter wie Körpertemperatur, Euterpalpationsbefund und Sekretbeschaffenheit zeigten die Goldstandardtiere erwartungsgemäß im Beobachtungszeitraum konstante Befunde innerhalb der physiologischen Grenzen (siehe 4.1.1 und 4.2.1). Auch die Milchleistung war über den Beobachtungszeitraum konstant (siehe Abbildung 5).

Neben dem SCC-Monitoring wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen, die Differenzierung der Milchzellen als das sensitivere System zur Feststellung initialer entzündlicher Prozesse im Euter heranzuziehen (Hamann & Krömker, 1997; Dosogne *et al.*, 2003; Koess, 2004). Vor allem die neutrophilen Granulozyten unterliegen einer starken Modulation, da sie in hoher Anzahl in die infizierte Milchdrüse einwandern (Petzl *et al.*, 2008). Initial, vor Pathogen-Exposition, lag der Anteil neutrophiler Granulozyten an den somatischen Milchzellen bei allen Versuchstieren um durchschnittlich 45%. Er bewegte sich damit, trotz niedriger SCC-Werte <50.000 Zellen/ml, etwas über den in der Literatur für die gesunde Milchdrüse angegebenen Werten von 0-37% (Paape *et al.*, 1981; Concha, 1986; Wever & Emanuelson, 1989; Leitner *et al.*, 2000). Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die sehr unterschiedlichen Nachweisverfahren für Zellen in der Milch zurückzuführen (Koess, 2004).

Die Lymphozytenpopulation in der Milch setzte sich vor Infektion und bei den Goldstandardtieren über den gesamten Beobachtungszeitraum aus den drei Haupt-T-Zellsubpopulationen zusammen: CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen machten zusammen im Mittel 96% der Lymphozyten aus. Der Anteil an B-Zellen war in nicht-infizierten, eutergesunden Tieren demnach sehr gering bis vernachlässigbar. Taylor *et al.* (1997) hingegen ermittelten nur einen Anteil von insgesamt 67% T-Zellen an den lymphoiden Zellen der Milch. Allerdings wurde in dieser Studie die Zellzahlgrenze für eutergesunde Tiere

bei <400.000 Zellen/ml gesetzt. Desweiteren befanden sich die untersuchten Tiere in verschiedenen Laktationsstadien. Über die Anzahl der Laktationen ist nichts bekannt. Die vergleichsweise homogene Zusammensetzung der lymphoiden Zellen bei den Goldstandardtieren in unserem Modell kann als Zeichen für die verhältnismäßig gute Vergleichbarkeit unter den Probanden angesehen werden. Die Unterschiede der Studien sind vermutlich auf die unterschiedliche Standardisierung der Modelle, insbesondere die Tierausswahl, zurückzuführen.

Angaben über Infektions- und Versuchsdauer experimenteller Mastitiden differieren in der Literatur von 96 Stunden (Kornalijnslijper *et al.*, 2003) bis zu 21 Tagen (Lohuis *et al.*, 1990) für *E. coli* und 72 Stunden bis 48 Tage für *S. aureus* (Shoshani *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2004). In dem hier verwendeten Tiermodell sollte vor allem die frühe Phase der Erreger-Wirts-Interaktion und die daraus resultierende Entzündung analysiert werden. Die Zeitspanne bis 24h nach Inokulation wurde als frühe Phase definiert, in der sich eine *E. coli*-Mastitis mit Sicherheit etabliert. Allerdings wurde in den Infektionsversuchen von Petzl (2005) deutlich, dass bis 24h nach Inokulation mit *S. aureus* zum Teil noch keine klinischen Veränderungen oder Erhöhungen der Milchzellzahl zu erfassen waren. Daher wurden die Tiere in dem vorliegenden Tiermodell für die *S. aureus*-Mastitis über 72h beobachtet.

Die trotz strenger Standardisierung vorliegende Variabilität zwischen Goldstandardtieren und zwischen den Eutervierteln ein und desselben Individuums wurde besonders deutlich als die Expression ausgewählter Kandidatengene analysiert wurde. Die Expression zeigte eine z.T. erhebliche natürliche Varianz (siehe Tabelle 18). Unterschiede lieferten die beiden Mastitismodelle auch im Ausgangsniveau anderer Parameter (SCC, Milchzellzusammensetzung) trotz der strengen Standardisierung. Im Infektions- und Entzündungsverlauf waren jedoch frühe Veränderungen der genannten Parameter reproduzierbar nachweisbar, wie es im Feldversuch nicht möglich gewesen wäre.

## **5.2 Experimentelle *E. coli*-Infektionen führen invariant zu einer akuten Mastitis**

Die durch *E. coli* verursachten Mastitiden, waren in dem vorliegenden Entzündungsmodell durch einen akuten Verlauf mit moderat ausgeprägten klinischen Symptomen gekennzeichnet, was den Beobachtungen von Burvenich *et al.* (2003) entspricht. Eine erfolgreiche Infektion konnte invariant bei allen Tieren anhand der klinischen Befunde bestätigt werden (siehe 4.1.2). Bei den infizierten Eutervierteln konnte 24h p.i. eine deutliche Verhärtung sowie

starke Schwellung aufgrund des vorliegenden subkutanen wie interstitiellen Ödems festgestellt werden. Das Milchsekret der infizierten Euterviertel zeigte bei allen Probanden hochgradige Flockenbildung, und bei drei Tieren war der Milchcharakter weitgehend aufgehoben (siehe Abbildung 8). Wie bereits bei Bannermann *et al.* (2004) beobachtet, reagierten die Tiere einheitlich mit einer deutlichen Erhöhung der rektalen Körpertemperatur 12h nach Infektion mit *E. coli*. Das Allgemeinbefinden war jedoch nur mittelgradig gestört (siehe Tabelle 10). Dieser Umstand kann damit begründet werden, dass sich die Tiere in der Mitte der ersten Laktation befanden. Burvenich *et al.* (2003) beschrieben, dass die Schwere der klinischen Symptome im fortgeschrittenen Laktationsstadium im Vergleich zur postpartalen Phase abnimmt.

Bei allen Versuchstieren der Gruppe *E. coli* 24h (*E.c.24h*) konnte ein deutlicher Rückgang der Milchleistung beobachtet werden (siehe Abbildung 5), was in früheren Untersuchungen ebenfalls festgestellt wurde (Lohuis *et al.*, 1990). Diese Reduktion der Milchleistung zeigte sich auch auf den nicht infizierten Vierteln, wie auch bei Shuster *et al.* (1996) beschrieben. Verantwortlich hierfür werden pathogen-abhängige Mechanismen gemacht, die die Milchproduktion stark reduzieren (Burvenich *et al.*, 2003). Dies beruht u.a. auf Genen, welche durch akute entzündliche Geschehen aktiviert oder unterdrückt werden. So konnte im Rahmen von Genexpressions- und In-situ-Hybridisierungsanalysen für die bovine Milchdrüse gezeigt werden, dass die Milchdrüsenepithelzelle in der Lage ist, die Synthese von Milchinhaltsstoffen zugunsten antimikrobieller Peptide herunterzuregulieren (Vanselow *et al.*, 2006). Eine lokale Gewebsschädigung führt darüberhinaus zum Verlust syntheseaktiver Zellen (Heyneman *et al.*, 1990), wobei dieser Effekt vor allem in der Folge abgeschlossener Mastitiden zu erwarten wäre. Als weitere Ursache für den Rückgang der Milchleistung kann auch eine vorübergehende Einstellung der Futteraufnahme gesehen werden. Durch den Mangel an Nährstoffen kann die Milchleistung kurzfristig negativ beeinflusst werden (Lohuis *et al.*, 1988).

Bereits 12h p.i. konnte bei allen Probanden eine Leukopenie beobachtet werden (siehe Abbildung 7), welche als eine systemische Auswirkung der Entzündung zu werten ist. Es handelte sich hierbei sowohl um eine Neutropenie als auch eine Lymphopenie (Daten nicht gezeigt). Eine initiale Neutropenie könnte dadurch erklärt werden, dass neutrophile Granulozyte die Blutbahn verlassen und in infiziertes Gebiet einwandern (Paape *et al.*, 1974). Obwohl eine zeitliche Korrelation zwischen dem Verlust neutrophiler Granulozyten im Blut und dem gleichzeitigen Einstrom in die Milch beschrieben ist (Bannerman *et al.*, 2004),

repräsentieren die in der Milch befindlichen neutrophilen Granulozyten (PMN) lediglich einen Bruchteil der im Blut reduzierten Anzahl. Es wird angenommen, dass ein Großteil der PMN in entzündetes Milchdrüsengewebe einwandert und somit nur histologisch erfassbar wäre. Ein weiterer Teil der PMN im Blut, in der Milch und im Gewebe ist aufgrund Margination und Apoptose nicht mehr detektierbar. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen LPS-vermittelten Effekt: Durch die intramammäre Gabe von 500µg LPS konnte eine starke Neutropenie bei Rindern induziert werden. Höhere Dosierungen verursachten zusätzlich eine Lymphopenie und Fieber (Jain & Lasmanis, 1978; Mehrzad *et al.*, 2007). Eine LPS-vermittelte Sekretion von TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose bei PMN (Takeda *et al.*, 1993).

In der vorliegenden Arbeit erhöhte sich bis 12h p.i. der Anteil der PMN unter den Leukozyten der Milch von ca. 40% auf über 90% (siehe Abbildung 14). Somit konnte die Aussage von Leitner *et al.* (2000) und Riollot *et al.* (2000), dass in der akuten Phase der Mastitis der Anteil der PMN auf über 86% bzw. 96% steigt, bestätigt werden. Den prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten als Indikator für entzündliche Veränderungen in der Milchdrüse heranzuziehen, wurde bereits vorgeschlagen (Hamann & Krömker, 1997). Dies kann aufgrund der hier erhobenen Daten bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des PMN-Anteils an der Gesamtleukozytenpopulation der Milch mit der entzündungsbedingten Zunahme des SCC stark korreliert (siehe Abbildung 16).

Trotz ansteigender absoluter Zahlen der lymphoiden Zellen und Makrophagen/Epithelzellen (siehe Abbildung 14) sank deren relativer Anteil dramatisch (hier nicht dargestellt). Dies ist auf den massiven Anstieg der PMN zurückzuführen (Leitner *et al.*, 2000).

Auf der Ebene der Milchinhaltsstoffe kam es bei der *E.c.24h*-Gruppe 12h p.i. zunächst zu einem Abfall des Gehaltes an Fett, Laktose und Harnstoff. Auch der pH-Wert sank. Dieser Effekt ist vor allem auf die verminderte Syntheseleistung der Milchdrüsenepithelzellen zurückzuführen (Sandholm & Mattila, 1985).

Der Milchfettgehalt fiel sowohl auf dem infizierten als auch auf den Kontrollvierteln zum Zeitpunkt 12h p.i. ab, was auf eine verminderte Fettsyntheseleistung der Milchdrüsenepithelzelle schließen lässt (Shuster *et al.*, 1995). Die Milchmenge war zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht signifikant abgefallen. Zum Zeitpunkt 24h p.i. war jedoch wieder ein Anstieg des Fettgehaltes auf allen Vierteln zu verzeichnen. Bei diesem Anstieg handelt es sich vermutlich um einen relativen Anstieg des Milchfetts, da die Milchleistung zum Zeitpunkt 24h p.i. deutlich abgefallen war (Massart-Leen *et al.*, 1994). Dies ist somit als eine



entzündungsbedingte Fettkonzentrierung in der Milch zu interpretieren.

Im Gegensatz zu den übrigen Milchinhaltstoffen stieg der Gesamtproteingehalt der Gemelke der infizierten Viertel zum Zeitpunkt 24h p.i. sprunghaft an. Dies wurde vor allem durch den Zustrom von Bovinem-Serum-Albumin (BSA) aus dem Blut verursacht (siehe Abbildung 21). Dies stimmt mit früheren Beobachtungen überein (Bannerman *et al.*, 2004; Moussaoui *et al.*, 2004). Vor allem bei schweren klinischen Mastitiden, die durch *E. coli* verursacht werden, kommt es zur Schädigung der Blut-Euter-Schranke (Wagner *et al.*, 2009). Einer neueren Studie zufolge ist das Eutergewebe auch selbst in der Lage Albumin zu synthetisieren (Shamay *et al.*, 2005). Hierfür wurden Explantkulturen von infiziertem und nicht infiziertem Drüsengewebe angelegt und mit LPS stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Albumin-mRNA-Expression in den Kulturen aus Mastitis-Drüsengewebe ca. 4fach höher lag. Durch die Zugabe von LPS konnte die Synthese weiter stimuliert werden. Shamay *et al.* (2005) sehen dies sogar als Teil der angeborenen unspezifischen Immunantwort.

Der Laktosegehalt der Milch liegt in der Hochlaktation nahezu konstant bei 4,9% (Gebhardt, 1993). Alle Tiere in diesem Versuch zeigten vergleichbare Ausgangswerte (siehe Abbildung 22). Wie auch bei McFadden *et al.* (1988) beschrieben, fiel der Laktosegehalt in unseren Experimenten 24h p.i. auf den mit *E. coli* infizierten Vierteln um ca. 40% ab. Dies liegt zum einen an der verminderten Syntheseleistung der Milchdrüsenepithelzelle, zum anderen wird Laktose über den Harn ausgeschieden, sobald die Blut-Euter-Schranke geschädigt ist (Scheler, 1985; Schulz *et al.*, 1998). Eine weitere Ursache für das Absinken des Laktosewertes in der Milch ist in der Fermentation von Laktose durch *E. coli* zu sehen (Hahn *et al.*, 2005). Auf den Kontrollvierteln hingegen kam es nur zu einem geringgradigen Absinken des Laktosegehaltes. Hier steht vermutlich die verminderte Laktosesyntheseleistung der Milchdrüsenepithelzelle im Vordergrund.

Der physiologische pH-Wert der Milch liegt bei 6,6 (Hamann, 1999). Im Gemelk der mit *E. coli* infizierten Viertel kam es hier überraschenderweise zu einem durchschnittlichen pH-Wert-Abfall um 0,3. Dies ist mit der Zunahme der Stoffwechselprodukte zu erklären (Ameisensäure, Milchsäure, Essigsäure etc.), die bei der Fermentation der Laktose durch *E. coli* entstehen (Keating, 1986). Der pH-Wert im Gemelk der Kontrollviertel hingegen stieg im Mittel um 0,1 an. Beim Verlust der Integrität der Blut-Euter-Schranke kommt es infolge des Blutserumeintrags in die Milch zu einer pH-Wert Verschiebung in Richtung des für das Blut physiologischen pH-Werts von ca. 7,4 (Wendt *et al.*, 1994).

Der Harnstoffgehalt in der Milch ist stark korreliert mit der Blutharnstoffkonzentration (Piatkowski *et al.*, 1981; Kaufmann *et al.*, 1982). Andererseits fällt der Harnstoffgehalt in der Milch bei einer klinischen Mastitis normalerweise ab (Gutjahr *et al.*, 1997). In den ersten 12h der experimentellen *E. coli*-Infektion konnten wir diesen Effekt auf den infizierten Vierteln ebenfalls beobachten (siehe Abbildung 26). Erstaunlicherweise stieg die Harnstoffkonzentration in der Milch zum Versuchsende wieder an. Auf den Kontrollvierteln war über den gesamten Versuchszeitraum ein Anstieg zu beobachten. Dies entspricht den Beobachtungen von Bleul *et al.* (2006), wo bei *E. coli*-bedingten Mastitiden mit toxischen Geschehen der Harnstoffgehalt in der Milch anstieg. Insgesamt blieben die Harnstoffkonzentrationen jedoch innerhalb des Referenzbereichs (Bastin *et al.*, 2009). Die große Streuung der 0h-Werte und die Tatsache, dass alle beschriebenen Veränderungen innerhalb des Referenzbereichs stattfanden, stellen die Harnstoffkonzentration als sinnvollen Parameter für die Erkennung von Mastitiden in Frage.

Die akute klinische Mastitis spiegelte sich in der Expression proinflammatorischer Gene wider (siehe Tabelle 18). Zum Zeitpunkt 24h p.i. zeigte sich im infizierten Viertel nach holistischer Transkriptom-Analyse in einer assoziierten Studie mittels Affymetrix-GeneChip eine Vielzahl differentiell regulierter Gene (Mitterhuemer, 2009). Exemplarisch wurden Chemokine (CXCL8, CCL20, CCL5) und TNF- $\alpha$  mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Es zeigte sich eine starke Heraufregulation für die genannten Mediatoren. Dies deckt sich mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur akuten *E. coli*-Mastitis nach 24h (Rinaldi *et al.*, 2009). Auch Effektoren (LAP, iNOS) als auch das Akute-Phase-Protein SAA3 waren deutlich in der Expression gesteigert, während für das gegenregulierende antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  keine Steigerung zu konstatieren war. Diese Ergebnisse unterstützen, dass es sich zum Zeitpunkt 24h p.i. um die akute Phase der Entzündung handelte. Die Genexpressionsdaten konnten nur zuverlässig im Vergleich zur Goldstandard-Gruppe interpretiert werden, da die Infektion zum Zeitpunkt 24h p.i. bereits die benachbarten Euterviertel beeinflusste (siehe Abbildung 28) und diese somit nicht als „Kontrollviertel“ fungieren konnten. Vielmehr zeigten letztere das Ausmaß der systemischen Auswirkung der Entzündung. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen aus früheren Mastitis-Infektionsstudien der eigenen Arbeitsgruppe (Petzl *et al.*, 2008). Bereits 6h p.i. konnte solch ein systemischer Effekt für das Defensin LAP gezeigt werden (siehe Abbildung 28). Dies legt nahe, dass die ersten Erreger-Wirts-Interaktionen schon in den ersten Stunden nach experimenteller Infektion zu suchen sind.

Ein Tier (M-6-16) reagierte auf dem Placebo-Viertel in einigen Parametern (SCC, Zellsubpopulationen und Milchfett) ähnlich wie auf dem infizierten Viertel, aber deutlich milder. Es handelte sich hierbei um ein Viertel in unmittelbarer Nachbarschaft zum infizierten Viertel. Es konnte zu keinem Zeitpunkt der experimentellen Phase ein Erreger im Gemelk oder in der Placebo-Lösung nachgewiesen werden. Dennoch war ein massiver Zelleinstrom zu beobachten. Jedoch war auf keinem der beiden Kontrollviertel (keinerlei Applikation) ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Da es sich um ein ipsilaterales Nachbarviertel des infizierten Viertels handelt, könnte es einen sogenannten Crosstalk gegeben haben, wie bei Petzl *et al.* (2008) beschrieben. Damit ist die systemische Verteilung von Entzündungsmediatoren vermutlich über Blutstrom oder Lymphbahnen gemeint. Allerdings wäre dann auf den anderen Vierteln ebenfalls ein Effekt zu erwarten gewesen. Insgesamt handelt es sich um ein zur Zeit nicht eindeutig klärbares Phänomen, was auch nur dieses eine Tier betraf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in unserem Modell für die *E. coli*-Mastitis die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar waren. Die klinische Verlaufsform entsprach einer *E. coli*-Mastitis unter Feldbedingungen in der Mitte der Laktation. Neben den schon bekannten Parametern zur Mastitis-Erkennung (SCC, Sekretbeschaffenheit, Milchleistung) konnten zusätzlich einige Milchinhaltstoffe wie Fett, Eiweiß und Laktose für die Erkennung einer *E. coli*-Mastitis herangezogen werden. Bei einer Kombination von mehreren Parametern und einer Bestimmung zu jeder Melkzeit ist es zukünftig vielleicht möglich, verschiedene Euterrelevante Pathogene von einander zu unterscheiden.

### 5.3 Experimentelle *S. aureus*-Infektionen zeigen heterogene Verläufe

Der *S. aureus*-Stamm, welcher im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kam, verursachte sehr mild verlaufende Mastitiden. Selbst innerhalb der gut standardisierten Versuchsgruppe stellte sich der Verlauf der Entzündung sehr heterogen dar. So konnten abhängig vom Untersuchungszeitpunkt klinische und subklinische Mastitiden festgestellt werden, die ineinander übergangen. Die *S. aureus* 72h-Tiere (*S.a.72h*) zeigten keine Erhöhung der rektalen Körpertemperatur oder Störungen des Allgemeinbefindens. Auch die Milchleistung blieb über den gesamten Versuchszeitraum im Rahmen der tagesüblichen Schwankungen. Während bei einer experimentellen Infektion mit *E. coli* alle infizierten Viertel zu jedem gemessenen Beobachtungszeitpunkt einen bakteriologisch positiven Befund zeigten, konnte nicht bei jedem der mit *S. aureus* infizierten Viertel zu jedem Zeitpunkt ein bakteriologisch positiver Befund erhoben werden (siehe Tabelle 12). Schukken *et al.* (1999) berichteten sogar, dass

nach experimentellen Infektionen mit *S. aureus* 18 von 48 Eutervierteln weiterhin bakteriologisch negativ blieben. Negative bakteriologische Befunde sind bei *S. aureus*-Infektionen mit Vorsicht zu bewerten, da der Erreger z.T. nur intermittierend nachgewiesen werden kann. *S. aureus* ist in der Lage sowohl an der Milchdrüsenepithelzelle zu haften (Almeida *et al.*, 1996; Hensen *et al.*, 2000) als auch intrazellulär in Makrophagen (Hebert *et al.*, 2000) und Epithelzellen (Lammers *et al.*, 1999) zu überleben, was für die unsichere bakteriologische Diagnose mit verantwortlich zu sein scheint.

Die Anzeichen einer Euterentzündung waren in den vorliegenden Experimenten lediglich geringgradig. Dies spiegelte sich vor allem in einem im Mittel deutlich geringeren Zelleinstrom bei hoher individueller Variabilität wieder (siehe Abbildung 9). Wie bei Bannermann *et al.* (2004) beschrieben, konnte auch in dieser Studie erst 24h nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* eine deutliche SCC-Erhöhung registriert werden. In der oben beschriebenen Studie war das Zellzahlmaximum 48h p.i. in allen Vierteln nachgewiesen worden. In unserer Studie variierte das SCC-Maximum zeitlich dagegen stärker (zwischen 24h und 72h p.i.), obwohl die Auswahlkriterien für die Versuchstiere strenger gewählt worden waren. Möglicherweise sind die höheren SCC-Ausgangswerte in der Studie von Bannermann *et al.* (2004) (SCC <500.000/ml) oder der jeweils eingesetzte *S. aureus*-Stamm für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich. Auch Petzl (2005) beobachtete eine starke Variabilität in klinischer Symptomatik und SCC-Dynamik bei Einsatz des in unserer Studie verwendeten *S. aureus*-1027. Die Infektion mit *S. aureus* in der vorliegenden Arbeit führte bei 3 Tieren 24h nach Inokulation zu einer deutlichen Zellzahlerhöhung, während bei zwei Tieren über den gesamten Versuchsverlauf kein oder ein verzögerter Anstieg (erst 72h p.i.) zu beobachten war. Dieses uneinheitliche Bild der Zellzahlentwicklung wurde von Petzl (2005) schon beschrieben. SCC-Werte unmittelbar nach Infektion, insbesondere in den ersten 24h p.i., fehlen meist gänzlich (Schukken *et al.*, 1994; Shoshani *et al.*, 2000; Ebling *et al.*, 2001).

Interessanterweise deckten sich die Veränderungen der Leukozytenzusammensetzung in der Milch nach *S. aureus*-Inokulation mit denen nach *E. coli*-Inokulation relativ gut. Auch hier konnte 12h p.i. ein signifikanter Anstieg des PMN-Anteils festgestellt werden (von ca. 30% auf 77%, Daten nicht gezeigt), der über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant erhöht blieb. Morphologische Veränderungen der PMN (Verlust der Granularität, Größenzunahme) waren nach einer Infektion mit *E. coli* als auch mit *S. aureus* zu beobachten (siehe Abbildung 15). Die Größenzunahme boviner PMN wird durch pro-inflammatorische Mediatoren wie

Platelet-Activating-Factor (PAF) und TNF- $\alpha$  verursacht (McClenahan *et al.*, 2000). Es konnte *in vitro* auch gezeigt werden, dass sich die Granularität von PMN nach Stimulation mit PAMPs (z.B. LPS) verminderte (Dahnke, 2003). Dieser Granularitätsverlust kann als Hinweis auf eine Zellaktivierung interpretiert werden, die zur Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran und zur Abgabe der Inhalte in den Extrazellularraum führt. Apoptose kann ebenfalls zu morphologischen Veränderungen führen (Dahnke, 2003).

Wie schon bei der *E.c.24h*-Gruppe beschrieben, konnte auch für die *S.a.72h*-Tiere ein Anstieg der absoluten Anzahl der lymphoiden Zellen und der Makrophagen in der Milch verzeichnet werden. Auch hier fiel der relative Anteil der beiden Zell-Subpopulationen am Gesamtmilchzellgehalt deutlich ab. Dieser relative Rückgang ist durch den enormen prozentualen Anstieg der PMN zu erklären (Leitner *et al.*, 2000).

Der Milchfettgehalt nahm im Infektionsverlauf kontinuierlich ab, was mit den Beobachtungen von Sordillo *et al.* (1987a) übereinstimmt. Diese Abnahme ist sicherlich auf eine verminderte Milchfettsynthese zurückzuführen, da nur ein minimaler Milchmengenrückgang innerhalb der tagesüblichen Schwankungen zu verzeichnen war. Ein Anstieg des Milchfettgehaltes wie bei der *E.c.24h*-Gruppe war erst zum Zeitpunkt 60h p.i. zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung ist vermutlich auf eine Normalisierung der Milchfettsyntheseleistung zurückzuführen.

Im Gegensatz zur *E.c.24h*-Gruppe blieb bei den *S.a.72h*-Tieren der Milcheiweißgehalt über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu konstant. Dies lässt unter anderem darauf schließen, dass im Gegensatz zur *E. coli*-Infektion die Blut-Euter-Schranke intakt blieb und damit BSA nicht vermehrt aus dem Blut in die Milch übertrat.

Der Laktosegehalt in der Milch lag bei allen Probanden vor und nach *S. aureus*-Exposition etwa bei 4,9%, was dem Referenzwert in der Hochlaktation entspricht (Gebhardt, 1993). Im Vergleich zu den *E.c.24h*-Tieren kam es zu keinem Abfall des Laktosegehaltes auf den infizierten Vierteln (siehe Abbildung 22).

*E. coli* und *S. aureus* verursachen ein unterschiedliches Krankheitsbild bei der Mastitis des Rindes (Bannerman *et al.*, 2004). Dies spiegelte sich auch auf Genexpressionsebene in dem vorliegenden Modell wider. Nur für LAP und CXCL8 konnte eine signifikante Expressionssteigerung in den infizierten Viertel gegenüber der Goldstandard-Gruppe gezeigt werden (siehe Abbildung 29). Diese Heraufregulation blieb aber deutlich unter den Werten, die im Gewebe *E. coli*-infizierter Viertel gemessen wurden. Dies wurde bereits in früheren Untersuchungen ähnlich für ausgewählte Zytokine und Defensine gezeigt (Yang *et al.*, 2008).

Die milderen Entzündungserscheinungen nach *S. aureus*-Infektion spiegeln sich somit in einer nur mäßig herabgesetzten Milchleistung (siehe Abbildung 5) als auch in den weitgehend unveränderten Milchinhaltsstoffen (Eiweiß-, Laktose-, Harnstoffgehalt) sowie dem pH-Wert wieder. Der verzögerte SCC-Anstieg bei *S. aureus*, sowie ein im Mittel innerhalb der ersten 24h p.i. 3fach niedrigerer SCC sind starke Differenzierungskriterien für die beiden Erreger. In Kombination mit den Milchinhaltsstoffen ist es zukünftig eventuell möglich, *S. aureus* von weiteren Pathogenen abzugrenzen.

#### **5.4 Schlussbetrachtungen und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Forschungsgesamtkonzeptes zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen im Euter. In der entsprechenden DFG-Forschergruppe FOR 585 war dieses Teilprojekt von zentraler Bedeutung. Die Etablierung zweier stark unterschiedlicher Mastitismodelle (akute und subklinisch-chronische Verlaufsform) stand im Vordergrund. Hierfür wurden bezüglich der Mastitisätiologie die äußerst relevanten Erreger *E. coli* bzw. *S. aureus* ausgewählt. Diese beiden Modelle dienten als Grundlage für die Analyse wichtiger regulatoriver und resultierender Veränderungen bei Wirt und Erreger. Dieses Hauptziel des Dissertationsprojektes wurde voll erfüllt, wie die eigenen Ergebnisse, aber auch die Resultate assoziierter Projekte zeigen (Vanselow *et al.*, 2006; Petzl *et al.*, 2008; Mitterhuemer, 2009).

Die Ergebnisse der Arbeit haben gezeigt, dass die Strenge der Modellgrenzen ein wichtiges Kriterium für das Gelingen von Mastitis-Infektionsmodellen darstellt. Dennoch gab es immer noch große interindividuelle Unterschiede in den Ausgangswerten, insbesondere bei Milchinhaltsstoffen wie dem Harnstoffgehalt. Entsprechend der Fragestellung sollten zukünftig eventuell noch engere Modellgrenzen gezogen werden. So könnte die Ausgangszellzahl der Milch auf 20.000 Zellen/ml reduziert werden und, wie von Hamann *et al.* (1997) vorgeschlagen, die Zusammensetzung der somatischen Zellen in der Milch zur

Standardisierung herangezogen werden, um die individuelle Variabilität noch weiter zu reduzieren. Die Verfeinerung des Tiermodells bezüglich dieser Kriterien würde allerdings einen erheblich höheren Arbeits- und Investitionsaufwand bei der Auswahl der Tiere nach sich ziehen und die Klientel möglicher Probanden stark einengen.

Anhand der Expression immunrelevanter Gene konnte gezeigt werden, dass die wichtigsten Erreger-Wirts-Interaktionen bereits im Zeitraum 0-6h p.i. statt finden (*E. coli*). Daher ist bei kommenden Projekten große Aufmerksamkeit auf diesen Zeitraum zu legen. Zu prüfen wäre für entsprechende Studien, wie lange die Adaptationsphase der Modellkeime in der Milchdrüse dauert. Es ist davon auszugehen, dass diese im Bereich von Minuten bis Stunden liegen kann und dann erst eine effiziente Erregervermehrung und nachweisbare Interaktionen mit dem Wirt zu erwarten sind (Dobrindt, persönliche Mitteilung 2009).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob es möglich ist, zu einem sehr frühen Zeitpunkt anhand verschiedener klinischer und Milchparameter auf die entsprechenden Pathogene zurückzuschließen. Bei den beiden in der Studie verwendeten sehr unterschiedlichen Pathogenen, war dies in Abhängigkeit von der Expositionszeit schon anhand der klinischen Symptome möglich. Es zeigte sich deutlich, dass *E. coli* akute Mastitiden induzierte, während *S. aureus* überwiegend subklinische bis milde klinische Mastitiden verursachte. Unter den klinischen Parametern waren vor allem die deutliche Erhöhung der rektalen Körpertemperatur, mit einem Peak etwa 12h p.i., und die etwa zeitgleich auftretenden Sekretveränderungen eindeutig *E. coli* zuzuordnen. Zudem konnte nach *E. coli*-Infektion ein massiver SCC-Anstieg schon 12h p.i. beobachtet werden, während bei *S. aureus* erst 24h p.i. ein deutlicher Zelleinstrom in die Milch zu verzeichnen war. Dieser Zelleinstrom erreichte bei *E. coli* bis zu 3fach höhere Werte als bei *S. aureus*. An dieser Stelle sei an die 20fach höhere Infektionsdosis bei *S. aureus* erinnert, was andeutet, dass dieser Erreger offenbar über Faktoren verfügt, die eine unmittelbare immunologisch-entzündliche Gegenreaktion verhindert oder dämpft. Dies könnte ein Grund für die ungenügende Erregerelimination sein. Trotz der zeitverzögerten Wirtsreaktion auf *S. aureus* konnte im Blut auch zu keinem späteren Zeitpunkt eine Leukopenie beobachtet werden. Bei *E. coli* war dies invariant bei allen Tieren innerhalb der ersten 24h p.i. der Fall. Die Milchzellsubpopulationen erlaubten uns nur in Kombination mit der Zellzahl und deren Änderungskinetik, die beiden Erreger zu unterscheiden. Der starke Milcheiweißanstieg, sowie der Laktoserückgang, aber auch der pH-Wert-Abfall sind potentiell als Parameter zur Erkennung von *E. coli* geeignet. In

Zukunft müssten hier pathogenbedingte Unterschiede zu anderen Keimen, die ebenfalls akute klinische Mastitiden verursachen, untersucht werden.

Es ist bekannt, dass beide Pathogene, *E. coli* wie auch *S. aureus*, um den Zeitpunkt der Geburt schwere klinische Mastitiden auslösen können. Um die zugrunde liegende unterschiedliche Reaktionslage des Wirtes für diesen Zeitraum der höchsten Mastitisinzidenz zu überprüfen, müssten entsprechende Infektionsversuche im peripartalen Zeitraum stattfinden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Rückschluss auf das jeweilige Pathogen unter den gewählten Modellbedingungen ohne weiteres möglich war. Es ist denkbar, dass in Zukunft die Kombination mehrerer Parameter (Zellsubpopulationen und Milchhaltsstoffe) zur Mastitisfrühdiagnostik herangezogen werden kann. Notwendig wäre dafür ein Online-Messsystem, das eine Datenerhebung und -analyse zu jeder Melkzeit erlaubt. Entsprechende Firmenaktivitäten schaffen schon jetzt die Grundlagen dafür.



## 6 Zusammenfassung

Die Mastitis ist die wirtschaftlich bedeutendste Einzeltierkrankung in der Milchproduktion, für die es bisher nur unbefriedigende Prophylaxe- und Therapiekonzepte gibt. Speziell *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) verursachen hohe Verluste. Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, die frühen Erreger-Wirts-Interaktionen in einem *In-vivo*-Infektionsmodell für *S. aureus* und *E. coli* zu erfassen. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Mastitismodellsystems, in dem neben klinischen Symptomen, verschiedene Milch- und Eutergewebeparameter (Milchzellzahl, Subpopulationen der Milchzellen, Milchhaltsstoffe und Expression relevanter Gene im Eutergewebe) analysiert werden können. Außerdem sollten im Modell analysierte Milcheigenschaften auf ihre potentielle Eignung zur Mastitisfrühdagnostik geprüft werden.

Die hohe Qualität des hier erarbeiteten Modells basiert vor allem auf den strengen Tierauswahlkriterien. So wurden ausschließlich Kühe der Rasse Holstein Friesian in der ersten Laktation eingesetzt. Alle Probanden befanden sich im 3.-5. Laktationsmonat und hatten einen somatischen Milchzellgehalt (SCC) von <50.000 Zellen/ml. Die Tiere waren auf allen Vierteln frei von Mastitiserregern und hatten vorberichtlich keine Mastitis. Vor Versuchsbeginn wurden alle Tiere Zyklus-synchronisiert und befanden sich zum Zeitpunkt der Inokulation im Östrus.

Zehn Tiere wurden auf jeweils einem Euterviertel mit *E. coli* infiziert (500CFU) und über einen Zeitraum von 6h (n = 5) oder 24h (n = 5) beobachtet. Dies sollte Informationen über pathophysiologische Mechanismen der frühen Phase einer akuten Mastitis liefern. Weiteren 5 Tieren wurde *S. aureus* (10.000CFU) in ein Viertel verabreicht, um den subklinischen Verlauf einer Euterentzündung zu simulieren. Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 72h beobachtet. Elf Probanden erhielten keine Behandlung und dienten als Goldstandard.

Bei den *E. coli*-infizierten Tieren kam es stets zu einer akuten klinischen Mastitis innerhalb der ersten 12h p.i.: Alle Tiere zeigten invariant Fieber, Euterschwellung, makroskopisch deutlich verändertes Milchsekret, gering- bis mittelgradige Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens sowie Leukopenie. Bei den mit *S. aureus*-infizierten Tieren zeigte kein Proband eine Störungen des Allgemeinbefindens. Alle Tiere zeigten normale Futteraufnahme und physiologische Werte der untersuchten klinischen Parameter während des jeweiligen Versuchszeitraums. Makroskopische Veränderungen des Milchsekrets konnten nur vereinzelt beobachtet werden und waren in der Ausprägung eher geringgradig.

Bereits 12h nach Inokulation mit *E. coli* reagierten die Tiere mit einem Milchzellanstieg auf den infizierten Vierteln, der vor allem durch die Zunahme polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) verursacht wurde. Der PMN-Anteil stieg innerhalb von 12h p.i. von etwa 35% auf >90% an und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum auf diesem hohen Niveau. Bei den mit *S. aureus* inokulierten Tieren konnte ebenfalls ein Zellanstieg in der Milch der infizierten Euterviertel beobachtet werden, allerdings erst 24h p.i. und etwa 3fach geringer als bei *E. coli*. Der PMN-Anteil stieg ebenfalls von 35% auf >90% allerdings erst 36h p.i..

Vor allem bei mit *E. coli*-infizierten Tieren konnten zum Teil starke Veränderungen beim Gehalt relevanter Milchinhaltsstoffe beobachtet werden. So kam es 12h p.i. zum Absinken des Milchfettgehaltes auf allen Vierteln. Laktose- und Eiweißgehalt zeigten jedoch erst 24h p.i. Abweichungen von den Ausgangswerten. Der Laktosegehalt verringerte sich in der Milch der infizierten Viertel um etwa 40%. Beim Eiweißgehalt hingegen war ein signifikanter Anstieg in der Milch der infizierten Viertel nachweisbar. Dagegen konnte bei den mit *S. aureus*-infizierten Tieren lediglich ein Absinken des Milchfettgehaltes auf allen Vierteln beobachtet werden; die anderen hier analysierten Milchinhaltsstoffe blieben unverändert.

Die mittels quantitativer RT-PCR durchgeführten Genexpressionsanalysen im Milchdrüsengewebe zeigten, dass durch die Etablierung einer Infektion mit Mastitis-Erregern die mRNA-Expression immunrelevante Gene signifikant moduliert wurde. Bereits 6h p.i. waren für das linguale anti-mikrobielle Peptid (LAP,  $\beta$ -Defensin) signifikante Expressionssteigerungen zu beobachten. 24h p.i. war die Expression des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der Chemokine CXCL8 und CCL20 sowie des Akute-Phase-Proteins Serum Amyloid A3 (SAA3) signifikant angestiegen. Es konnte zudem eine vermutlich systemisch vermittelte Beeinflussung der Genexpression immunrelevanter proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in nichtinfizierten Vierteln durch die lokal begrenzte Euterezündung in einem benachbarten Viertel nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden damit zwei Mastitismodelle etabliert, mit deren Hilfe erregerspezifische frühe Erreger-Wirts-Interaktionen auf verschiedenen Ebenen analysiert werden konnten und in Nachfolgeprojekten weiter verfolgt werden können. In der Zukunft könnten die erregerspezifischen Veränderungen verschiedener Milcheigenschaften (SCC, Verteilung von Milchzellpopulationen, Milchinhaltsstoffe) für die

Mastitisfrühdagnostik genutzt werden.

Gefördert aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG FOR 585, ZE414/3-1).

## 7 Summary

Daniel Mehne (2009): Investigations on the early phase of bovine mastitis

Mastitis is the most costly disease in dairy production. Concepts for prophylaxis and therapy are still unsatisfactory. Efficacy of mastitis treatment depends on the early detection of the causative pathogen. Especially *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) are two of the major mastitis pathogens which elicit highly different clinical findings. This study was designed to investigate early host pathogen interaction in a well defined mastitis model for clinical (*E. coli*) and subclinical (*S. aureus*) mastitis. The aim was to identify pathogen related patterns in recruited milk cell populations as well as changes of milk ingredients for a potential application in mastitis diagnostics.

The quality of the model is based on the stringent selection and pre-screening of animals. In the present study we used only pure bred Holstein-Frisian heifers in their 3<sup>rd</sup>-5<sup>th</sup> month of lactation, that were free from mastitis pathogens and had a somatic cell count (SCC) <50.000cells/ml for at least 3 weeks prior to challenge. All animals were estrus synchronized and were challenged at day of estrus to rule out hormonal influences. One udder quarter was inoculated with either *E. coli* (n = 10) to induce an acute clinical mastitis or with *S. aureus* (n = 5) to induce a subclinical mastitis. Eleven animals received no treatment and served as controls.

All *E. coli* infused animals developed acute clinical mastitis within 12h after inoculation. They showed fever, leucopenia, inflammatory swelling of the affected udder quarter and severe changes of the milk secretion (large clots, loss of milk character). The general condition was moderately impaired. In contrast, no animal challenged with *S. aureus* responded with fever. Their general condition stayed unaffected and only occasionally mild visible alterations in milk (small clots) were detected.

The SCC increased in both groups after pathogen inoculation. There was a 3-fold higher increase in SCC in *E. coli*- than in *S. aureus*-challenged animals. The predominant immigrating cells were PMN, which increased from 35% to >90% in *E. coli*-challenged cows 12h after inoculation. In *S. aureus*-challenged udder quarters a similar relative increase of PMN was seen but not until 36h after inoculation.

In a parallel approach we analyzed the alterations of different milk constituents in the course

of the experimentally induced mastitis with *E. coli* and *S. aureus*. We observed an initial decrease of lactose (-40%) and fat (-35%) 12h after *E. coli*-challenge, while proteins in milk were elevated by 1.7-fold 24h after challenge. *S. aureus* infused quarters only showed a decreased fat content (-24%) 24h after inoculation.

Quantitative RT-PCR for immune-related genes in udder tissue showed a number of significantly modulated genes after inoculation with the two different pathogens. A rise in mRNA-concentration was already noted 6h after *E. coli*-challenge for the  $\beta$ -Defensin LAP (lingual anti-microbial peptide). The expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), the chemokines CXCL8 and CCL20 as well as the acute phase protein serum amyloid A3 (SAA3) was significantly up-regulated 24h after inoculation of *E. coli*. The degree of inflammation was reflected by a strong increase of these proinflammatory genes in *E. coli*-challenged animals in contrast to a slight increase of LAP and CXCL8 in *S. aureus* challenged animals. In non-infected neighboring quarters of *E. coli*-challenged animals the expression of several proinflammatory genes also was modulated by a systemic crosstalk.

In this study two different mastitis models were established, which can be applied for further investigations of the early phase of mastitis. In these models we were able to relate the changes in milk composition (SCC, milk cell populations, milk ingredients) to the clinical picture of mastitis and the causative pathogen. This application may contribute to advance early mastitis diagnostics in the future.

(Supported by DFG FOR 585, ZE414/3-1)

## 8 Literaturverzeichnis

- Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 679-705.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 1996; 79: 1021-6.
- Baggiolini M, Horisberger U, Gennaro R, Dewald B. Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. *Lab Invest* 1985; 52: 151-8.
- Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 1971; 134: 907-34.
- Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Sohn EJ. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3128-37.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 463-72.
- Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* 1998; 81: 411-9.
- Barnouin J, Karaman Z. [Continuing eco-pathological survey: 9. Influence of the level of production on the pathology of the dairy cow]. *Ann Rech Vet* 1986; 17: 331-46.
- Barrett JJ, Hogan JS, Weiss WP, Smith KL, Sordillo LM. Concentrations of alpha-Tocopherol after intramammary infusion of Escherichia coli or lipopolysaccharide. *J Dairy Sci* 1997; 80: 2826-32.
- Bastin C, Laloux L, Gillon A, Miglior F, Soyeurt H, Hammami H, Bertozzi C, Gengler N. Modeling milk urea of Walloon dairy cows in management perspectives. *J Dairy Sci* 2009; 92: 3529-40.
- Bauman DE, Davis CL (1974) Biosynthesis of milk fat. In: *Lactation*, Bd. 2. Ed (Hrsg.) BLLuVRS. Academic Press, New York
- Baumrucker CR. Amino acid transport systems in bovine mammary tissue. *J Dairy Sci* 1985; 68: 2436-51.
- Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 1998; 4: 615-8.
- Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430: 257-63.
- Bickerstaffe R, Annison EF, Linzell JL. The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. *J. Agric. Sci.* 1974; 82: 71-85.
- Bleul U, Sacher K, Corti S, Braun U. Clinical findings in 56 cows with toxic mastitis. *Vet Rec* 2006; 159: 677-9.
- Blobel H, Bruckler J, Kitzrow D, Schaeg W. Antiphagocytic factors of Staphylococcus aureus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1980; 3: 447-53.
- Boddie RL, Nickerson SC. Reduction of mastitis caused by experimental challenge with Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae by use of a quaternary ammonium and halogen-mixture teat dip. *J Dairy Sci* 2002; 85: 258-62.
- Bradley AJ, Green MJ. Adaptation of Escherichia coli to the bovine mammary gland. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1845-9.
- Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec* 2007; 160: 253-7.

- Brooker BE, Hill AW, Frost AJ. Epithelial regeneration in the bovine mammary gland: the closure of lesions produced by *Escherichia coli*. *Biological Sciences* 1981; 213: 81 – 91.
- Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 63: 45-55.
- Burkhardt F (1992) *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Burvenich C (1983) Bloedvloei door de melkklier van lacterende geiten onder verschillende fysiologische en pathologische (mastitis) omstandigheden (Euterblutfluss lakterender Ziegen unter Berücksichtigung verschiedener physiologischer und pathologischer (Mastitis) Einflüsse). (fläm.). In: Rijksuniv., Fak. Dierengeneeskunde, Diss., Gent/B
- Burvenich C, van Messom GV, Roets E, Massart-Leen A, Akers RM, van Sichem RR, Devriese L. Hormone somatotrope bovine et mammite aiguë à *Escherichia coli*. *Ann. Méd. Vét.* 1988; 132: 601 – 6.
- Burvenich C, Paape MJ, Hill AW, Guidry AJ, Miller RH, Heyneman R, Kremer WD, Brand A. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Vet Q* 1994; 16: 45-50.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003; 34: 521-64.
- Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ, Wagner WC. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res* 1994; 55: 934-43.
- Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 1999; 73: 369-509.
- Cecil H, Bitman J, Wood J. Changes in milk glycogen during mastitis. *J. Dairy Sci.* 1965; 48: 1607 – 11.
- Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN, Nickerson SC, Marquardt WW. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 1994; 77: 970-83.
- Concha C. Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions--a review of the literature. *Nord Vet Med* 1986; 38: 257-72.
- Dahnke J (2003) CpG Motive und ausgewählte Toll-like-Rezeptor-Liganden: Ihre modulatorische Interaktion mit bovinen Leukozyten. *Tierärztl. Hochschule, Hannover*
- Davis SR, Collier RJ. Mammary blood flow and regulation of substrate supply for milk synthesis. *J Dairy Sci* 1985; 68: 1041-58.
- de Haas Y, Veerkamp RF, Barkema HW, Grohn YT, Schukken YH. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *J Dairy Sci* 2004; 87: 95-105.
- Doggweiler R, Hess E. Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter. *Milchwissensch.* 1983: 5-8.
- Dosogne H, Vangroenweghe F, Mehrzad J, Massart-Leen AM, Burvenich C. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *J Dairy Sci* 2003; 86: 828-34.
- DVG (1994) Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem. Sachverständigenausschuss "Subklinische Mastitis" des Arbeitskreises Eutergesundheit der Fachgruppe Milchhygiene. Gießen
- Ebling TL, Fox LK, Bayles KW, Bohach GA, Byrne KM, Davis WC, Ferens WA, Hillers JK. Bovine mammary immune response to an experimental intramammary infection with a *Staphylococcus aureus* strain containing a gene for staphylococcal enterotoxin C1. *J Dairy Sci* 2001; 84: 2044-50.

- Emery RS. Biosynthesis of milk fat. *J Dairy Sci* 1973; 56: 1187-95.
- Emery RS. Deposition, secretion, transport and oxidation of fat in ruminants. *J Anim Sci* 1979; 48: 1530-7.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1008-15.
- Fernando RS, Spahr SL, Jaster EH. Comparison of electrical conductivity of milk with other indirect methods for detection of subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 1985; 68: 449-56.
- Fourichon C, Seeger SH, Beaudeau F, Bareille N (2001) Economic losses consecutive to health disorders in dairy farms in Pays de la Loire (France). In: 52nd Meeting of the European Association of Animal Production, Budapest (H)
- Gardzima E, Poradzisz Z, Sawicka J. Zawartosc laktozy w melku jako wskaznik zapalenia wymienia u krow (Laktosegehalt der Milch als Mastitisindikator). (poln.). *Med. Weter.* 1987; 34: 355 – 7.
- Gebhardt W (1993) Leistungsmerkmale und minore Milchbestandteile in der zweiten Frühlaktation bei hochleistenden HF-Kühen in einem offenen Nukleus. In: Tierärztl. Hochschule, Dissertation, Hannover
- Gennaro R, Dewald B, Horisberger U, Gubler HU, Baggiolini M. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J Cell Biol* 1983; 96: 1651-61.
- Glabowna M, Sender G, Lukaszewicz M, Bassalik-Chabielska L. The influence of selected factors upon the lactose level in milk as mastitis indicator. *Milchwissensch.* 1988; 43: 22 – 4.
- Godden SM, Lissemore KD, Kelton DF, Leslie KE, Walton JS, Lumsden JH. Factors associated with milk urea concentrations in Ontario dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84: 107-14.
- Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 174-85.
- Gooden JM, Lascelles AK. Effect of feeding protected lipid on the uptake of precursors of milk fat by the bovine mammary gland. *Aust J Biol Sci* 1973; 26: 1201-10.
- Grabowski NT (2000) Körpergewichtsentwicklung, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender DSB-Kühe in Laufstallhaltung. In: Tierärztl. Hochschule, Dissertation, Hannover
- Gravert HO. Indikatoren zur Beurteilung der Energiebilanz der Milchkuh. *Mh. Med.-Vet.* 1991; 46: 536-7.
- Griinari JM, McGuire MA, Dwyer DA, Bauman DE, Barbano DM, House WA. The role of insulin in the regulation of milk protein synthesis in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80: 2361-71.
- Gronlund U, Johannisson A, Persson Waller K. Changes in blood and milk lymphocyte subpopulations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Res Vet Sci* 2006; 80: 147-54.
- Guliye AY, Van Creveld C, Yagil R. Detection of subclinical mastitis in dromedary camels (*Camelus dromedarius*) using somatic cell counts and the N-acetyl-beta-D-glucosaminidase test. *Trop Anim Health Prod* 2002; 34: 95-104.
- Gustafson GM (1993) Regular exercise to tied dairy cows. Effects on productivity, health and locomotion and with attention paid to the influence of light. Ed Vard. IfHUo. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala/S



- Gutjahr S, Schulz J, Beck K. Zur Beeinflussung des Harnstoffgehaltes in Rindermilchproben durch den Gesundheitszustand des Euters. *Prakt. Tierarzt* 1997; 78: 573 – 80.
- Haag T (1988) Zum Aussagewert der Harnstoffbestimmung in der Milch vom Rind unter besonderer Berücksichtigung methodischer Untersuchungen. In: Justus-Liebig-Universität, Dissertation, Giessen
- Hahn H, Falke D, Kaufmann S, Ullmann U (2005) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. In: Springer Medizin Verlag. Ed Heidelberg SVB, Heidelberg
- Hamann J. Zum Einfluß von Stressituation auf die Anzahl Somatischer Zellen der Milch. *Prakt. Tierarzt, Sonderheft Colleg. Vet* 1992; 23: 38 – 41.
- Hamann J, Krömker V. Potential of specific milk composition variables for cow health management. *Livest. Prod. Sci.* 1997: 201-8.
- Hamann J, Stahlhut-Klipp H, Krömker V, Gyodi P (1997) Milchqualität: Variation majorer und minorer Milchinhaltsstoffe. 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene" der DVG. Garmisch-Partenkirchen. S. 214 – 9
- Hamann J, Zeconi A. Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin of the International Dairy Federation* 1998; 334: 5 – 22.
- Hamann J (1999) Elektrische Leitfähigkeit als Mastitisindikator. In: Tagung des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ über Trends in der Milchproduktion – Wandel in der Mastitisbekämpfung. Ed Deutsche-Veterinärmedizinische-Gesellschaft, Hannover. 67 - 75
- Hamann J, Gyodi P. Somatic cells and electrical conductivity in relation to milking frequency. *Milchwissensch.* 2000; 55: 303 – 7.
- Hamann J, Fehlings K (2002) Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. DVG-Tagung. Gießen.
- Hanus O, Zvackova I, Gencurova V, Gabriel B. Vzťah obsahu laktózy v mléce k ukazateľom zdravotného stavu mléčne žlázy v prvej tretine laktácie (Beziehung zwischen Laktosegehalt in Milch und Indikatoren der Eutergesundheit im ersten Drittel der Laktation). (tschech.). *Vet. Med. Praha* 1992; 37: 595 – 604.
- Hanus O, Gabriel B, Gencurova V, Zvackova I. Laktosegehalt der Kuhmilch im ersten Laktationsdrittel nach einigen Sekretionsstörungsindikatoren des Euters. *Zivocisna Vyroba.* 1993; 38: 131 – 8.
- Hebert A, Sayasith K, Senechal S, Dubreuil P, Lagace J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 193: 57-62.
- Heeschen W, Suhren G, Hahn G. Mastitis – Significance for processing of milk and public health aspects. *Kiel. milchwirtsch. Forschungsber.* 1985; 37: 233 – 43.
- Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, Poutrel B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci* 2000; 83: 418-29.
- Hess E, Egger B. Correlation between the cell count in milk and the results of histological and bacteriological examinations. *J. Dairy Science* 1969; 83: 418-29.
- Heyneman R, Burvenich C, Vercauteren R. Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *J Dairy Sci* 1990; 73: 985-94.
- Hill AW. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Res Vet Sci* 1981; 31: 107-12.
- Hill AW, Heneghan DJ, Williams MR. The opsonic activity of bovine milk whey for the phagocytosis and killing by neutrophils of encapsulated and non-encapsulated *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 1983; 8: 293-300.

- Hoeben D, Burvenich C, Eppard PJ, Hard DL. Effect of recombinant bovine somatotropin on milk production and composition of cows with *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci* 1999; 82: 1671-83.
- Hoedemaker M, Korff B, Edler B, Emmert M, Bleckmann E. Dynamics of *Staphylococcus aureus* infections during vaccination with an autogenous bacterin in dairy cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001; 48: 373-83.
- Hogan J, Larry Smith K. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 507-19.
- Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Collaborative study to determine effects of milk composition on somatic cell counts. *J. Food Prot.* 1990; 53: 67 - 71.
- Hogan JS, Smith LK. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 507-19.
- Holdaway RJ, Holmes CW, Steffert IJ. A comparison of indirect methods für diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows 1: the effects of bacterial infection, stage of lactation and age of cow on eight parameters in foremilk from individual quarters with an initial study of differences between milk fractions. *Aust. J. Dairy Technol.* 1996; 51: 64 – 71.
- Holländer GA (2006) *Immunologie*, 1. Auflage edn. Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, München
- Huth F-W (1995) *Die Laktation des Rindes – Analyse, Einfluß, Korrektur*. Verlag Ulmer, Stuttgart
- IDF. In: *Ann. Bull.*, part 3: International Dairy Federation 1967:
- IHTM. IFHUTDMH. *Anleitung zur Milchuntersuchung und Milchbeurteilung sowie Biotechnik des maschinellen Milchentzuges*. Tierärztliche Hochschule, Hannover/D 1995;
- Jain NC. Peroxidase activity in leukocytes of some animal species. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1967; 88: 297-304.
- Jain NC, Lasmanis J. Leucocytic changes in cows given intravenous injections of *Escherichia coli* endotoxin. *Res Vet Sci* 1978; 24: 386-7.
- Jakobi U, Rossow N, Lemke B, Staufenbiel R, Boretius B, Kirst E. Einfluss ernährungsbedingter Stoffwechselstörungen der Milchkuh auf Lebendmasseentwicklung und Milchhaltsstoffe. *Tierzucht* 1985; 39: 223-6.
- Jans F, Munger A. Effet du propyléneglycol comme agent de prévention de l'acétonémie durant la phase de démarrage chez la vache laitière. *Rev. Suisse Agric.* 1992; 24: 237 – 42.
- Jensen DL, Eberhart RJ. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am J Vet Res* 1981; 42: 743-7.
- Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. *Blood* 2003; 102: 2180-6.
- Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181: 261-72.
- Karnovsky ML, Badwey JA. Respiratory burst during phagocytosis: an overview. *Methods Enzymol* 1986; 132: 353-4.
- Kaufmann W, Lotthammer K-H, Lüppling W. Zum Einfluss eines verminderten Rohproteingehaltes der Ration über Verwendung von geschütztem Protein auf Milchleistung und einige Blutparameter als Kennzeichen der Leberbelastung. *Ztschr. Tierphysiol., Tierernähr. Futtermittelkde.* 1982; 47: 85-101.
- Keating PF (1986) *Introducción a la lactología (Einführung in die Milchwissenschaft)*. (span.). Ed. Limusa, México, D.F./MEX
- Kehrli ME, Burton JL, Nonnecke BJ, Lee EK. Effects of stress on leukocyte trafficking and immune responses: implications for vaccination. *Adv Vet Med* 1999; 41: 61-81.

- Kerro Dego O, Van Dijk JE, Nederbraght H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q.* 2002; 4: 181-98
- Koess C (2004) Durchflusszytometrische Differenzierung sowie phänotypische und funktionelle Eigenschaften boviner Milchzellen unter Berücksichtigung der Eutergesundheit. In: Aus dem Zentrum für Lebensmittelwissenschaften, Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Milchhygiene. tierärztl. Hochschule, Hannover
- Koess C, Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J Dairy Res* 2008; 75: 225-32.
- Kornalijnslijper JE, Beerda B, Daemen I, van der Werf J, van Werven T, Niewold T, Rutten V, Noordhuizen-Stassen E. The effect of milk production level on host resistance of dairy cows, as assessed by the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 721-36.
- Kremer WD, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ, Daemen AJ, Brand A, Burvenich C. Blood polymorphonuclear leukocyte chemotaxis during experimental *Escherichia coli* bovine mastitis. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2613-8.
- Kronfeld DS. Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneous ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 1982; 65: 2204-12.
- Kruif Ad, Mansfeld R, Hoedemaker M (1998) Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Kuncewicz A. Badania nad zawartoscia mono- i disacharydow w mleku i mlecznych produktach fermentowanych (Untersuchungen zum Gehalt von Mono- und Disacchariden in Milch und Milchfermentationsprodukten). (poln.). *A. Acad. Agric. Techn. Olstenensis* 1994; 26: 3 – 42.
- Kutilla T, Pyorala S, Kaartinen L, Isomaki R, Vahtola K, Myllykoski L, Saloniemi H. Lactoferrin and citrate concentrations at drying-off and during early mammary involution of dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50: 350-3.
- Laarveld B, Christensen DA, Brockman RP. The effect of insulin on net metabolism of glucose and amino acids by the bovine mammary gland. *Endocrinology* 1981; 108: 2217-21.
- Lam TJ, Lipman LJ, Schukken YH, Gaastra W, Brand A. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am J Vet Res* 1996; 57: 39-42.
- Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 180: 103-9.
- Lee CS, Lascelles AK. Antibody-producing cells in antigenically stimulated mammary glands and in the gastro-intestinal tract of sheep. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1970; 48: 525-35.
- Leino L, Paape MJ. Comparison of the chemiluminescence responses of bovine neutrophils to differently opsonized zymosan particles. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1055-9.
- Leitner G, Shoshani E, Krifucks O, Chaffer M, Saran A. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 581-9.
- Lenninger AL (1985) *Biochemie*. Ediciones Omega, Barcelona/E
- Leslie KE, Petersson CS, Vernooy E, Bashiri A. Efficacy of an iodophore teat disinfectant against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in experimental challenge. *J Dairy Sci* 2005; 88: 406-10.
- Liebich HG. Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. 1993;

- Linton AH, Robinson TC. Studies on the association of *Escherichia coli* with bovine mastitis. *Br Vet J* 1984; 140: 368-73.
- Lipman LJ, de Nijs A, Gaastra W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. *Vet Microbiol* 1995; 47: 1-7.
- Löffler G, Petrides PE (1997) Stoffwechsel der Kohlenhydrate. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Ed LÖFFLER GuPEPH. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Lohuis JA, Verheijden JH, Burvenich C, van Miert AS. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants 2: metabolic aspects. *Vet. Q.* 1988; 10: 117 – 25.
- Lohuis JA, Kremer W, Schukken YH, Smit JA, Verheijden JH, Brand A, Van Miert AS. Growth of *Escherichia coli* in milk from endotoxin-induced mastitic quarters and the course of subsequent experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J Dairy Sci* 1990; 73: 1508-14.
- Mackay CR, Hein WR. Marked variations in gamma delta T cell numbers and distribution throughout the life of sheep. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 173: 107-11.
- Marschke RJ, Kitchen BJ. Glucose levels in normal and mastitic milk. *J Dairy Res* 1984; 51: 233-7.
- Massart-Leen AM, Burvenich C, Massart DL. Triacylglycerol fatty acid composition of milk from periparturient cows during acute *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Res* 1994; 61: 191-9.
- McClenahan DJ, Evanson OA, Walcheck BK, Weiss DJ. Association among filamentous actin content, CD11b expression, and membrane deformability in stimulated and unstimulated bovine neutrophils. *Am J Vet Res* 2000; 61: 380-6.
- McFadden TB, Akers RM, Capuco AV. Relationship of milk proteins in blood with somatic cell counts in milk of dairy cows. *J Dairy Sci* 1988; 71: 826-34.
- McGuire MA, Bauman DE (2003) Milk fat. In: *Encyclopedia of dairy sciences*. Ed ROGINSKY H, J.W. FUQUAY u. P.F. FOX (Hrsg.). Academic Press, London. 1828-34
- Mehrzad J, Dosogne H, De Spiegeleer B, Duchateau L, Burvenich C. Bovine blood neutrophil acyloxyacyl hydrolase (AOAH) activity during endotoxin and coliform mastitis. *Vet Res* 2007; 38: 655-68.
- Mehrzad J, Janssen D, Duchateau L, Burvenich C. Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2008; 91: 193-201.
- Meyer HHD, Rohleder M, Streich WJ, Goltenboth R, Ochs A. Sexualsteroidprofile und Ovaraktivitäten des Pandaweibchens YAN YAN im Berliner Zoo. *Berl. Münch.Tierärztl.Wochenschr.* 1997: 143-7.
- Middleton JR, Luby CD, Viera L, Tyler JW, Casteel S. Short communication: influence of *Staphylococcus aureus* intramammary infection on serum copper, zinc, and iron concentrations. *J Dairy Sci* 2004; 87: 976-9.
- Mielke H (1994) Physiologie der Laktation. In: *Euter und Gesäugekrankheiten*. Ed WENDT K, H. BOSTEDT, H. MIELKE u. H.W. FUCHS (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart. 66-9
- Miescher S, Schreyer M, Barras C, Capasso P, von Fliedner V. Sparse distribution of gamma/delta T lymphocytes around human epithelial tumors predominantly infiltrated by primed/memory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 1990; 32: 81-7.
- Miettinen P, Juvonen RO. Diurnal variations of serum and milk urea levels in dairy cows. *Acta Agric. Scand.* 1990; 40: 289-96.

- Mitterhuemer S (2009) Analyse des Transkriptoms von bovinem Milchdrüsenewebe nach experimenteller Infektion mit *E. coli* 1303. LMU, München
- Monardes HG, Hayes JF. Genetic and phenotypic relationships between lactation cell counts and milk yield and composition of Holstein cows. *J Dairy Sci* 1985; 68: 1250-6.
- Monecke S, Ehricht R. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 825-33.
- Morath S, Stadelmaier A, Geyer A, Schmidt RR, Hartung T. Synthetic lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release. *J Exp Med* 2002a; 195: 1635-40.
- Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T. Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations. *Infect Immun* 2002b; 70: 938-44.
- Moussaoui F, Vangroenweghe F, Haddadi K, Le Roux Y, Laurent F, Duchateau L, Burvenich C. Proteolysis in milk during experimental *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 2004; 87: 2923-31.
- Muir DD (2003) Lactose: properties, production, applications. In: Encyclopedia of dairy sciences. Ed ROGINSKY H, J.W. FUQUAY u. P.F. FOX (Hrsg.). Academic Press, London. 1525-9
- Muller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschape H, Schmidt MA. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3380-90.
- Neville MC, Allen JC, Watters C (1983) The mechanisms of milk secretion. In: Lactation, Plenum, Ed NEVILLE MC, u. M.R. NEIFERT (Hrsg.), New York
- Newbould FH. The effect of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. *Can J Comp Med* 1973; 37: 189-94.
- Ng-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley JE, Monardes HG. Environmental influences on protein content and composition of bovine Milk. *J Dairy Sci* 1982; 65: 1993-8.
- Nickel R, A. Schummer u. E. Seiferle (1996) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane, Bd. 3. Ed Hrsg.: K.H. HABERMEHL BV, H. WILKENS u. H. WAIBL, 3. Aufl., Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, Wien
- Nickerson SC, Heald CW. Cells in local reaction to experimental *Staphylococcus aureus* infection in bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 1982; 65: 105-16.
- Nickerson SC, Boddie RL, Owens WE, Watts JL. Effects of novel intramammary device models on incidence of mastitis after experimental challenge. *J Dairy Sci* 1990; 73: 2774-84.
- Norberg E, Hogeveen H, Korsgaard IR, Friggens NC, Sloth KH, Lovendahl P. Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status. *J Dairy Sci* 2004; 87: 1099-107.
- Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1429-49.
- O'Mahony DS, Pham U, Iyer R, Hawn TR, Liles WC. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* 2008; 5: 1-8.
- Oltner R, Emanuelson M, Wiktorsson H. Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 1985; 12: 47-57.
- Opdebeek JP, Frost AJ, O'Boyle D. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet Microbiol* 1988; 16: 77-86.

- Ormerod MG (1990) An introduction to fluorescence technology. In: Flow cytometry - a practical approach. Ed Ormerod MG. IRL Press at Oxford University Press, New York
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patino A, Baizabal-Aguirre VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection* 2007; 54: 399-409.
- Özpinar H (1983) Einfluß der subklinischen Mastitis auf den  $\beta$ -Carotingehalt der Milch bei Kühen. In: Univ., Veterinärmed. Fak., Diss., München
- Paape MJ, Schultze WD, Desjardins C, Miller RH. Plasma corticosteroid, circulating leukocyte and milk somatic cell responses to *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 145: 553-9.
- Paape MJ, Guidry AJ, Kirk ST, Bolt DJ. Measurement of phagocytosis of  $^{32}\text{P}$ -labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *Am J Vet Res* 1975; 36: 1737-43.
- Paape MJ, Guidry AJ. Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977; 155: 588-93.
- Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ, Schultze WD. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv Exp Med Biol* 1981; 137: 555-78.
- Paape MJ, Shafer-Weaver K, Capuco AV, Van Oostveldt K, Burvenich C. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480: 259-77.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003; 34: 597-627.
- Palmquist DL, Beaulieu AD, Barbano DM. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J Dairy Sci* 1993; 76: 1753-71.
- Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J Dairy Sci* 1992; 75: 998-1006.
- Park YH, Joo YS, Park JY, Moon JS, Kim SH, Kwon NH, Ahn JS, Davis WC, Davies CJ. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J Vet Sci* 2004; 5: 29-39.
- Persson K, Sandgren CH, Rodriguez-Martinez H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. *Am J Vet Res* 1992; 53: 2235-40.
- Persson Waller K, Gronlund U, Johannisson A. Intramammary infusion of beta1,3-glucan for prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50: 121-7.
- Petzl W (2005) Untersuchungen zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen bei der Mastitis des Rindes, Diss. vet. med. Arbeitsgruppe Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Yang W, Seyfert HM, Nurnberg G, Schubert HJ. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 2008; 39: 18.
- Pfister T (2009) Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der akuten Mastitis des Rindes. In: Klinik für Wiederkäuer. LMU München
- Piatkowski B, Voigt J, Girschewski H. Einfluss des Rohproteinniveaus auf die Fruchtbarkeit und den Harnstoffgehalt in Körperflüssigkeiten bei Hochleistungskühen. *Arch. Tierernährung* 1981; 31: 497-504.

- Pociecha JZ. Influence of *Corynebacterium bovis* on constituents of milk and dynamics of mastitis. *Vet Rec* 1989; 125: 628.
- Prakash BS, Meyer HH, Schallenger E, van de Wiel DF. Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J Steroid Biochem* 1987; 28: 623-7.
- Puppione DL. Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. *J Dairy Sci* 1978; 61: 651-9.
- Pyorala S, Pyorala E. Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci* 1997; 80: 2820-5.
- Pyorala S. New strategies to prevent mastitis. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 211-6.
- Pyorala S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 565-78.
- Pyorala S. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 Suppl 2: 252-9.
- Radbruch A (1992) Flow cytometry and cell sorting. In: Immunofluorescence: basic considerations. Ed Radbruch A. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Rausch PG, Moore TG. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. *Blood* 1975; 46: 913-9.
- Redetzky R (2000) Biochemisches Blutprofil, Milchinhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender HF - Kühe in Anbindehaltung. In: Tierärztlichen Hochschule, Dissertation, Hannover
- Reichmuth J. Somatic cell counting-interpretation of results. *IDF* 1975; 85: .
- Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evock-Clover C, Silva MV, Paape MJ, Van Ryssen B, Burvenich C, Capuco AV. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics* 2009;
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 161-7.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1077-84.
- Rivas AL, Quimby FW, Coksaygan O, Olmstead L, Lein DH. Longitudinal evaluation of CD4+ and CD8+ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res* 2000; 64: 232-7.
- Rivas AL, Quimby FW, Blue J, Coksaygan O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 399-407.
- Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Besser TE. Coagulase-positive *Staphylococcus* intramammary infections in primiparous dairy cows. *J Dairy Sci* 1994; 77: 958-69.
- Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, Gennaro R. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 1988; 263: 9573-5.
- Rook JAF. The role of carbohydrate metabolism in the regulation of milk production. *Proc Nutr. Soc.* 1979; 38: 309-14.
- Rosenberger G (1990) Die klinische Untersuchung des Rindes, 3. edn. Parey, Berlin; Hamburg;

- Roy JP, Du Tremblay D, Descoteaux L, Messier S, Scholl D, Bouchard E. Evaluation of the California Mastitis Test as a precalving treatment selection tool for Holstein heifers. *Vet Microbiol* 2009; 134: 136-42.
- Ryniewicz Z, Wojcik W (1985) Lactose content in quarter milk during milking and cow's milk. In: IDF Seminar „Progress in the control of bovine mastitis“, Kiel
- Sandholm M, Mattila T. Merits of different indirect tests in mastitis detection (cell counting, NAGase, BSA, antitrypsin). *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.* 1985; 37: 334 – 9.
- Savoini A, Marzari R, Dolzani L, Serrano D, Graziosi G, Gennaro R, Romeo D. Wide-spectrum antibiotic activity of bovine granulocyte polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 405-7.
- Scaletti RW, Trammell DS, Smith BA, Harmon RJ. Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 2003; 86: 1240-9.
- Schalm OW, Lasmanis J, Carroll EJ. Pathogenesis of Experimental Coliform (*Aerobacter Aerogenes*) Mastitis in Cattle. *Am J Vet Res* 1964; 25: 75-82.
- Scheibl P, Zerbe H. [Effect of progesterone on the immune system in consideration of bovine placental retention]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2000; 107: 221-7.
- Scheler D (1985) Untersuchungen über den Lactosegehalt im Harn bei DSB-Kühen mit Eutergesundheitsstörungen nach intrazisternaler Verabreichung eines Kälberblutextraktes (Solcoseryl®). In: Tierärztl. Hochschule, Dissertation, Hannover
- Schukken YH, Mallard BA, Dekkers JC, Leslie KE, Stear MJ. Genetic impact on the risk of intramammary infection following *Staphylococcus aureus* challenge. *J Dairy Sci* 1994; 77: 639-47.
- Schukken YH, Leslie KE, Barnum DA, Mallard BA, Lumsden JH, Dick PC, Vessie GH, Kehrl ME. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *J Dairy Sci* 1999; 82: 2393-401.
- Schulz J, Hanisch T, Dumke S, Springer S, Beck K. Abfall der Laktosekonzentration in der Kuhmilch als Ausdruck erhöhter Permeabilität der Schranken zwischen Hohlraumssystem des Euters und Blut. *Prakt. Tierarzt* 1998; 79: 657 – 65.
- Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 2003; 34: 475-91.
- Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 1992a; 267: 4292-5.
- Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol* 1992b; 118: 929-36.
- Shafer-Weaver KA, Pighetti GM, Sordillo LM. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 212: 271-80.
- Shafer-Weaver KA, Sordillo LM. Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 56: 53-64.
- Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, Mabeesh SJ. Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2005; 88: 569-76.
- Shennan DB, Peaker M. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev* 2000; 80: 925-51.
- Shoshani E, Leitner G, Hanochi B, Saran A, Shpigel NY, Berman A. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. *J Dairy Res* 2000; 67: 155-69.



- Shuster DE, Harmon RJ, Jackson JA, Hemken RW. Reduced lactational performance following intravenous endotoxin administration to dairy cows. *J Dairy Sci* 1991; 74: 3407-11.
- Shuster DE, Kehrli ME, Jr., Baumrucker CR. Relationship of inflammatory cytokines, growth hormone, and insulin-like growth factor-I to reduced performance during infectious disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 210: 140-9.
- Shuster DE, Lee EK, Kehrli ME, Jr. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am J Vet Res* 1996; 57: 1569-75.
- Smith CW, Anderson DC. PMN adhesion and extravasation as a paradigm for tumor cell dissemination. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 61-78.
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J Dairy Sci* 1985; 68: 402-17.
- Smith KL, Hogan JS. Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993; 9: 489-98.
- Sordillo LM, Nickerson SC, Akers RM, Oliver SP. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int J Biochem* 1987a; 19: 1165-72.
- Sordillo LM, Nickerson SC, Akers RM, Oliver SP. Influence of bacterial isolation on composition of bovine mammary secretion throughout involution and early lactation. *J. Dairy Sci.* 1987b; 70: Suppl. 1: 247.
- Sordillo LM, Nickerson SC. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1112-20.
- Sordillo LM, Babiuk LA. Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following in vitro exposure to recombinant bovine interferon gamma. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 27: 393-402.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1851-65.
- Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 135-46.
- Stelwagen K (2003a) Lactose. In: *Encyclopedia of dairy sciences*. Ed ROGINSKY H, J.W. FUQUAY u. P.F. FOX (Hrsg.). Academic Press, London. 1842-7
- Stelwagen K (2003b) Milk protein. In: *Encyclopedia of dairy sciences*. Ed ROGINSKY H, J.W. FUQUAY u. P.F. FOX (Hrsg.). Academic Press, London. 1835-42
- Suriyasathaporn W, Heuer C, Noordhuizen-Stassen EN, Schukken YH. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet Res* 2000a; 31: 397-412.
- Suriyasathaporn W, Schukken YH, Nielen M, Brand A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci* 2000b; 83: 1248-55.
- Sutra L, Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1994; 40: 79-89.
- Takeda Y, Watanabe H, Yonehara S, Yamashita T, Saito S, Sendo F. Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Int Immunol* 1993; 5: 691-4.
- Targowski SP. Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1781-9.
- Taylor BC, Keefe RG, Dellinger JD, Nakamura Y, Cullor JS, Stott JL. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol* 1997; 182: 68-76.
- Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2542-51.

- Tizard IR (2004) *Veterinary Immunology*, 7. Auflage edn. Elsevier, Saunders, Philadelphia
- Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS, Schoenberger PS. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am J Vet Res* 1991; 52: 184-8.
- Tolle A. Die subklinische Kokkenmastitis des Rindes. *Zbl. Vet. Med.* 1982; 29: 329-58.
- Tomita GM, Nickerson SC, Owens WE, Wren B. Influence of route of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2159-64.
- Torres Anjel MJ, Guaqueta Rincon A, Melani Martinez J. Prevalencia de *Clostridium perfringens (welchii)* en la ubre bovina (Prävalenz von *Clostridium perfringens (welchii)* im Euter der Kuh). (span.). *Rev. Latinoam. Microbiol.* 1976; 18: 189 – 95.
- Van Kampen C, Mallard BA. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 59: 79-91.
- Vangroenweghe F, Rainard P, Paape M, Duchateau L, Burvenich C. Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. *J Dairy Sci* 2004; 87: 4132-44.
- Vanselow J, Yang W, Herrmann J, Zerbe H, Schuberth HJ, Petzl W, Tomek W, Seyfert HM. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 463-77.
- Verbeke R, Roets E, Peeters G. Variations in the concentrations of free amino acids in the plasma of the dairy cow at parturition. *J Dairy Res* 1972; 39: 355-64.
- Wagner SA, Jones DE, Apley MD. Effect of endotoxic mastitis on epithelial cell numbers in the milk of dairy cows. *Am J Vet Res* 2009; 70: 796-9.
- Waller KP. Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480: 231-45.
- Weber L, Peterhans E, Wyler R. The chemiluminescent response of bovine polymorphonuclear leucocytes isolated from milk and blood. *Vet Immunol Immunopathol* 1983; 4: 397-412.
- Wegner TN, Schuh JD, Nelson FE, Stott GH. Effect of Stress on Blood Leucocyte and Milk Somatic Cell Counts in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 1976; 59: 949-56.
- Welty FK, Smith KL, Schanbacher FL. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 1976; 59: 224-31.
- Wendt K, Bosted H, Mielke H, Fuchs H-W (1994) *Euter- und Gesäugekrankheiten*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson RJ. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3408-12.
- Wessendorf G, Scheibl P, Zerbe PS. [Effect of estrogens on the immune system with regard to bovine placental retention]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1998; 105: 32-4.
- Wever P, Emanuelson U. Effects of systematic influences and intramammary infection on differential and total somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows. *Acta Vet Scand* 1989; 30: 465-74.
- Wiesner E, Ribbeck R (2000) *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4. Auflage edn. Enke Verlag, Stuttgart
- Wittkowski G (1979) Meßwerte verschiedener für die Rindermastitis-Diagnostik empfohlener Parameter in Abhängigkeit von der Gemelkfraktion. In: Univ., Veterinärmed. Fak., Diss., München
- Yamaguchi T, Hiratsuka M, Asai K, Kai K, Kumagai K (1999) Differential Distribution of T Lymphocyte Subpopulations in the Bovine Mammary Gland During Lactation. 1459-64

- Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 2008; 45: 1385-97.
- ZAHTM (1998) Kompendium der Milchhygiene. In: Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch, Tierärztliche Hochschule, Hannover
- Zecconi A, Bronzo V, Piccinini R, Spreafico G, Ruffo G. Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *J Dairy Res* 1994; 61: 271-9.
- Zhoa FQ, Glimm DR, Kennely JJ. Distribution of mammalian facilitative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues. *Int. J. Biochem.* 1993; 25: 1897-903.
- Zhoa FQ, Dixon WT, Kennely JJ. Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem.* 1996; 115: 127-34.

## **9 Danksagung**

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Bereitstellung des Themas und für die engagierte und motivierende Betreuung. Sein großes persönliches Engagement und seine stets prompte Hilfeleistung haben sehr zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Wolfram Petzl für hervorragende Betreuung und gute Einarbeitung in die Flowzytometrie. Seine fachliche Kompetenz, sein praktisches Können und seine aufbauenden Worte haben mir sehr geholfen, so manche Hürde zu meistern.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung des Projekts.

Für die intensive Einarbeitung in die Technik und die Methoden sowie die Hilfestellung bei vielen Fragen danke ich Frau Heidi Mayrhofer, Herrn Dr. Frank Weber und Frau Dr. Sonja Drees.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Tobias Pfister, der mir beim Tierkauf, den Voruntersuchungen und nicht zuletzt während den Versuchen eine große Hilfe war.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München für die umsichtige Versorgung und Betreuung der Versuchstiere. Namentlich möchte ich mich bei Herrn Peter Büsching und Herrn Tony Schamberger für die stets unkomplizierte Hilfe, vor allem beim Transport der Versuchstiere, besonders herzlich bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau Dr. Carola Sauter-Louis für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Frau Christina Beyer und Frau Ingrid Hartmann vom klinischen Labor der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München möchte ich danken für die zuverlässige, zügige Bearbeitung der Proben und die nette Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Hafner-Marx und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Oberschleißheim für die zuvorkommende Hilfe bei der Sektion der Versuchstiere und für die Aufarbeitung und Beurteilung der Histologischen Proben.

Bei Katharina Waldmüller, Monique Lind und Katharina Mühlbauer möchte ich mich ganz herzlich fürs Korrekturlesen bedanken.

Bei meiner geliebten Frau Melanie möchte ich mich ganz besonders für die Unterstützung, das Korrekturlesen und den Ansporn endlich zum Ende zu kommen bedanken. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich an dieser Stelle meinem Opa, ohne ihn hätte ich nie Tiermedizin studiert.