

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliche Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

erinnert

IMMUNDIAGNOSTISCHE CHARAKTERISIERUNG
DER BOVINEN
PROTOTHOKENMASTITIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctormedicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von

Uwe Rösler

aus Langburkersdorf

Leipzig, 2001

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Jürgen Gropp

Betreuer: Professor Dr. Dr. Andreas Hensel

Gutacher:

1. Gutachter Professor Dr. Dr. Andreas Hensel,
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig Leipzig

2. Gutachter Professor Dr. Axel Sobiraj,
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig Leipzig

3. Gutachter Professor Dr. Renate Blaschke-Hellmessen,
ehemaliges Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät
der Technischen Universität Dresden Dresden

Tag der Verteidigung:

Meinen Eltern
in
Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Charakterisierung der Gattung <i>Prototheca</i>	2
2.1.1 Taxonomie der Prototheken	2
2.1.2 Morphologie der Prototheken	6
2.1.3 Physiologie der Prototheken	7
2.1.4 Ökologie der Gattung <i>Prototheca</i>	9
2.2 Protothekose beim Mensch und Tier	9
2.2.1 Protothekose beim Menschen	10
2.2.2 Protothekose beim Hund	11
2.2.3 Protothekose bei anderen Spezies	12
2.3 Die Protothekenmastitide des Rindes	12
2.3.1 Ätiologie und Pathogenese der Protothekenmastitis	13
2.3.2 Klinik der Protothekenmastitis	15
2.3.3 Pathomorphologie der Protothekenmastitis	16
2.3.4 Diagnostik der Protothekenmastitis	17
2.3.5 Therapie und Bekämpfung der Protothekenmastitis	19
3 Eigene Untersuchungen	21
3.1 Tier und Material	21
3.1.1 Versuchsbetriebe	21
3.1.2 Klinische Untersuchung	22
3.1.3 Probenentnahme und -bearbeitung	23
3.1.4 Verwendete Stämme der Gattung <i>Prototheca</i>	24
3.2 Methoden	26
3.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau	26
3.2.2 Anzucht und Isolierung des Erregers	27
3.2.3 Biochemische Differenzierung von Prototheken	27
3.2.4 Speziesidentifikationsmittel Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.2.4.1 Präparation von genomischer DNA	28
3.2.4.2 Genetische Vergleichsmittel 8S rDNA-Analyse	29
3.2.5 Bestimmung von Wachstumskurven	30
3.2.6 Herstellung der Hyperimmunseren	30
3.2.7 Gel-Elektrophorese	31
3.2.8 Färbung der Polyacrylamid-Gele	32
3.2.9 Immuno-Blot	32
3.2.10 Enzym-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	34
3.2.11 Statistische Auswertung	36
4 Ergebnisse	38
4.1 Vergleich verschiedener Isolate von <i>Pzopfii</i>	38
4.1.1 Auxanographische Vergleich der C-Quellen-Assimilation	38
4.1.2 Vergleich der Isolate mittels des Identifikationssystems BBL-Crystal™	39
4.1.3 Vergleich der Vermehrungsintensitäten	41
4.1.4 Serologischer Vergleich mittels Immuno-Blot	41
4.1.5 Genetischer Vergleich durch PCR-Sequenzanalyse	44

4.2	Entwicklungstypspezifische ELISAs	46
4.2.1	Auswahl geeigneter Antigenpräparation	46
4.2.2	Auswahl geeigneter Mikrotiterplatter für die ELISA-Systeme	47
4.2.3	Antigenkonjugat und Serumauswertung	48
4.2.4	Intra-Assay-Variationen	50
4.2.5	Inter-Assay-Variationen	51
4.2.6	Kreuzreaktivität der ELISA-Testsysteme miteinander Mastitisserregern	53
4.3	Lokal- und systemische Immunantwort	54
4.3.1	Immunogenität der ELISA-Antigene bei Kaninchen	54
4.3.2	Lokal- und systemische Antikörperantwort bei Protothekenmastitis des Rindes	55
4.3.3	Lokal- und systemische Immunantwort bei Protothekenmastitis des Rindes	59
4.4	Auswertung der ELISAs	63
4.5	Validierung der Prototheken-ELISAs	65
4.6	Kulturell- und serologische Charakterisierung des Verlaufes der bovinen Protothekenmastitis	73
5	Diskussion	76
5.1	Vergleich verschiedener Isolate von <i>Pzopfii</i>	77
5.1.1	Auxanographischer Vergleich	77
5.1.2	Biochemische Charakterisierung mittels Identifikationssystems BBL-Crystal®	79
5.1.3	Serologischer Vergleich verschiedener <i>Pzopfii</i> -Isolate	80
5.1.4	Genetischer Vergleich verschiedener Isolate von <i>Pzopfii</i>	82
5.2	Lokal- und systemische Immunantwort bei der Protothekenmastitis des Rindes	85
5.3	Entwicklung und Validierung der ELISA-Systeme	88
5.3.1	Entwicklung von indirekten ELISA-Testsystemen	88
5.3.2	Bewertung entwickelter ELISA-Testsysteme	90
5.3.3	Validierung der ELISA-Systeme	92
5.4	Zum Verlauf der Protothekenmastitis des Rindes im Bestand	95
5.5	Zum Verlauf der Erregerausscheidung bei der Protothekenmastitis	97
Zusammenfassung		99
6.1	Summary	101
Literaturverzeichnis		103
Anhang		119
Tabellen und Abbildungen		119
Chemikalien und Reagenzien		131
ELISA-Gebrauchslösungen		131
Pufferlösungen und Reagentien für Elektrophoresen und Immuno-Blot		132
Erklärung		134
Danksagung		135

TABELLENVERZEICHNIS

Tabell 1	Taxonomische Stellung der Gattung <i>Prototheca</i>	3
Tabell 2	Identifikationskriterien der verschiedenen <i>Prototheca</i> -Spezies.....	4
Tabell 3	Differenzierungsmerkmale der Varianten von <i>Pzopfii</i>	5
Tabell 4	Bestandsdaten der untersuchten Betriebe	21
Tabell 5	Übersicht für die Untersuchung verwendeter <i>Prototheca</i> -Stämme.....	24
Tabell 6	Prinzip der Vierfeldertafel zur Evaluierung von Testsystemen am Beispiel des <i>Prototheca</i> -ELISA.	36
Tabell 7	Vergleich der C-Quellen-Assimilation verschiedener Stämme von <i>Pzopfii</i> mittels Auxanographie.	39
Tabell 8	Assimilationsverhalten unterschiedlicher C- und N-Quellen bei verschiedenen Varianten von <i>Pzopfii</i> sowie bei <i>Pwickerhamii</i>	40
Tabell 9	Gebrauchsverdünnungen des Blutserums und des Milchserums sowie der eingesetzten sekundären Antikörper für verschiedene <i>Pzopfii</i> -ELISA-Testsysteme.....	49
Tabell 10	Intra-Assay-Variationskoeffizienten der ELISA-Systeme zur serologischen Diagnostik der bovinen <i>Pzopfii</i> -Mastitis.....	50
Tabell 11	Inter-Assay-Variation des <i>Pzopfii</i> -ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG im Blutserum laktierender Kühe	51
Tabell 12	Inter-Assay-Variation des <i>Pzopfii</i> -ELISA zum Nachweis von spezifischem IgA im Milchserum laktierender Kühe	52
Tabell 13	Inter-Assay-Variation des <i>Pzopfii</i> -ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG im Milchserum laktierender Kühe	52
Tabell 14	Korrelation der lokalen und systemischen spezifischen Antikörperantwort gegen <i>Pzopfii</i> mit der Zahl der mit der Milch laktierender Kühe ausgeschiedener <i>Prototheca</i> und der Zahl der Mastitiserkrankungen in der Milch.....	60
Tabell 15	Cutoff-Wert für die einzelnen Isotyp-spezifischen ELISA-Systeme zur Diagnostik der <i>Prototheca</i> -Mastitis des Rindes.....	63
Tabell 16	Statistische Parameter der einzelnen ELISA-Systeme (1).....	64
Tabell 17	Statistische Parameter der einzelnen ELISA-Systeme (2).....	65
Tabell 18	Diagnostische Bild einer hochgradigen <i>Pzopfii</i> -Infektion der Milch in der Herde unter Sanierungsbedingungen (Bestand B).....	67
Tabell 19	Exemplarische Darstellung der Anzahl der serologischen und kulturellen Befunde bei der Herdenuntersuchung hochgradig infizierter Milchviehbestände B.....	68
Tabell 20	Exemplarische Darstellung der Anzahl der serologischen und kulturellen Befunde im Anschluss an die Herdenuntersuchung frisch abgekalbten Kühe hochgradig infizierter <i>Pzopfii</i> -Milchviehbestände B.....	69
Tabell 21	Epidemiologische Kenndaten (Prävalenzen und Inzidenzen) der bovinen <i>Pzopfii</i> -Mastitis in einem infizierten Milchviehbestand B.....	70
Tabell 22	Statistische Charakteristika der einzelnen ELISA zum Nachweis der bovinen <i>Prototheca</i> -Mastitis im Milchviehbestand B. .	71
Tabell 23	Epidemiologische Kategorisierung des Verlaufs der Antikörpersekretion in der Milch bei Mastitis des Rindes in einem hochgradig infizierten <i>Pzopfii</i> -Milchviehbestand (Bestand B).....	74
Tabell 24	Vergleich der Extinktionsergebnisse ungeblockter Mikrotitertypen.....	119
Tabell 25	Vergleich der Extinktionsergebnisse geblockter Mikrotitertypen.....	119
Tabell 26	Extinktionswert bei der Konjugat- und Serumauswertung für den Immunglobulin-Isotyp IgG im Blutserum.....	120
Tabell 27	Extinktionswert bei der Konjugat- und Serumauswertung für den Immunglobulin-Isotyp IgA im Milchserum.....	120
Tabell 28	Ergebnisse der Konjugat- und Serumauswertung für den Immunglobulin-Isotyp IgG im Milchserum.....	121

Tabell 29 Extinktionswert zu Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgG in Serum.	121
Tabell 30 Extinktionswert zu Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgA in Milchserum.	122
Tabell 31 Extinktionswert zu Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgG in Milchserum.	122
Tabell 32 Assimilationsverhalten verschiedener Isolate von <i>Pzopfii</i> und <i>Pwickerhamii</i> bei Verwendung des Identifikationssystems „BBL-Crystal® GranPositive“	123
Tabell 33 Assimilationsverhalten von Isolat von <i>Pzopfii</i> und <i>Pwickerhamii</i> bei Verwendung des Identifikationssystems „BBL-Crystal® Enteric/NF“	124
Tabell 34 Spezifische Antikörper-Aktivitäten in Blut und Milchserum von Tieren mit unterschiedlicher klinischer und kultureller Stadium der Protothekenmastitis.	125
Tabell 35 Verlauf der Erregerausscheidung in der spezifischen Antikörperantwort der Milch bei der Protothekenmastitis des Rindes. ..	128

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Wachstumskurve der Referenzstämme SAC 63-4 und SAC 201 von <i>Pzopfii</i>	41
Abbildung 2 Immuno-Blots verschiedener Varianten von <i>Pzopfii</i>	43
Abbildung 3 Immuno-Blots verschiedener Mastitis isolate und von Stämmen der einzelnen Varianten von <i>Pzopfii</i>	44
Abbildung 4 PCR-Produkte verschiedener Varianten von <i>Pzopfii</i>	45
Abbildung 5 Ablaufschemata korrespondierender Immuno-Blots verschiedener Antigenpräparationen von <i>Pzopfii</i>	46
Abbildung 6 Kreuzreaktivität von <i>Pzopfii</i> Stamm SAC 202 und <i>Cryptococcus neoformans</i> Stamm 841.	53
Abbildung 7 Systemische Immunantwort eines mit Coating-Antigen <i>Pzopfii</i> Stamm SAC 202 immunisierten Kaninchens.	55
Abbildung 8. <i>Pzopfii</i> -spezifische Antikörper-Aktivitäten von IgG in Serum, IgA in Milchserum und von IgG in Milchserum belaktierender Kühe mit unterschiedlicher klinischer Stadium der Protothekenmastitis.	56
Abbildung 9 Immuno-Blot zum Nachweis spezifischer Antikörper des Immunglobulin-Isotypes IgG in Serum und von IgA in Milchserum einer infizierten Milchkuh.	58
Abbildung 10 Gehalte der somatischen Zellen bei Kühen mit unterschiedlichen klinischer Stadium der Protothekenmastitis.	59
Abbildung 11 Korrelation der Zahl somatischer Zellen in der Milch und der Anzahl der somatischen Zellen in der Milch aus geschiedener Protothekenmastitis.	61
Abbildung 12 Anzahl der somatischen Zellen in der Milch aus geschiedener Protothekenmastitis bei verschiedenen klinischer Stadium der boviner Protothekenmastitis.	61
Abbildung 13 Korrelation zwischen der Lokalen und der systemischen Antikörperantwort und der Zahl der somatischen Zellen in der Milch aus geschiedener Protothekenmastitis.	62
Abbildung 14 Vergleich der partiellen Sequenzen der 8S rDNA von verschiedenen <i>Pzopfii</i> -Stämmen.	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Adest.	Aqua destillata
Abidest.	Aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Cneoformans</i>	<i>Cryptococcuscneoformans</i>
CFU	Colony forming unit/Koloniebildende Einheit
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribo-nucleic-acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylene diamine tetraacetic acid)
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
EU	ELISA-Einheiten (ELISA units)
h	Stunden
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin(isotyp)A
IgG	Immunglobulin(isotyp)G
IgG ₁	Immunglobulin(isotyp)G ₁
IgM	Immunglobulin(isotyp)M
kDa	Kilodalton
log	Logarithmus/logarithmisch
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minuten
n.u.	nicht untersucht
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween [®] 20
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase-chain-reaction)
PIM	Prototheken-Isolations-Medium
<i>Pmoriformis</i>	<i>Protothecamoriformis</i>
<i>Pstagnora</i>	<i>Protothecastagnora</i>
<i>Pwickerhamii</i>	<i>Protothecawickerhamii</i>
<i>Pzopfii</i>	<i>Prototheczopfii</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
U/minrpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sec	Sekunden
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
z.B.	zum Beispiel
(vol/vol)	Volumenprozent
(w/vol)	Gewichtsprozent

1 EINLEITUNG

Die einzigen bisher bekannten, durch Pflanzen verursacht enklinischen Erkrankungen bei Mensch und Tier werden Vertreter des Genus *Prototheca* zugeschrieben. Die bei Rindern beschriebene Protothekenmastitis ist eine therapieresistente, weltweit vorkommende Infektionskrankheit der Milchdrüse. Das ätiologische Agens, die farblose Alge *Prototheca (P.) zopfii*, kommt ubiquitär in feuchten Habitaten vor und verursacht fakultativ akute bis chronische Entzündung des bovinen Euters. Es gibt Hinweise auf das Vorkommen eines speziellen, Mastitis-assoziierten Biotyps von *P. zopfii* der sogenannten Variante ID. Durch die oft zu beobachtende endemische Ausbreitung in Milchviehbeständen sowie durch die nachhaltige Therapieresistenz, welche oft zum wirtschaftlichen Totalverlust der betroffenen Milchkühe führt, stellen Protothekenmastitiden beim Rind ein großes ökonomisches Problem für den betroffenen Betriebsdar. Eine Sanierung solcher Bestände gestaltet sich bisher sehr aufwendig und langwierig, da der routinemäßig durchgeführte kulturelle Erregernachweis aufgrund der intermittierenden Ausscheidung der Prototheken nicht immer gelingt. Die wenigen in der Vergangenheit unternommenen Versuche, mittels serologischer Nachweisverfahren die Diagnostik in Herdenmaßstab zu verbessern, scheiterten bisher entweder zu geringen Sensitivität oder an der ungenügenden Praktikabilität der Testsysteme. Gleichwohl sind spezifische Antikörper gegen *P. zopfii* sowohl im Blutserum als auch im Milchserum infizierter Tiere nachweisbar. Eine Diskriminierung der verschiedenen klinischen Verlaufsformen gelang jedoch bisher nicht.

Ziel dieser Arbeit sollte es deshalb sein, zuerst mittels neu entwickelter ELISA-Systeme die lokale und systemische Antikörperantwort bei der Protothekenmastitis des Rindes in Abhängigkeit von jeweiligem Infektionsstadium zu charakterisieren. Anschließend galt es, die Eignung dieser ELISAs zum serologischen Nachweis klinischer und subklinischer Infektionen mit *P. zopfii* abzuklären. Im Rahmen der Bestandssanierung eines hochgradig von Protothekenmastitiden betroffenen Bestandes erfolgte dann die Identifikation infizierter Tiere, um die Praxistauglichkeit der entwickelten Tests unter Beweis zu stellen. Durch eine Langzeitbeobachtung infizierter Milchkühe konnte dann das Erreger-Ausscheidungsverhalten im Verlaufe einer natürlichen Infektion mit *P. zopfii* untersucht werden. Die vorliegenden Daten ergänzen das Wissen zur Epidemiologie der Erkrankung. Mittels kulturmorphologischer, biochemischer, serologischer und genetischer Untersuchungen konnte zudem das Vorkommen unterschiedlicher Bio-, Sero- und Genotypen bei *P. zopfii* belegt werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Charakterisierung der Gattung *Prototheca*

2.1.1 Taxonomie der Prototheken

Seit ihrer Erstbeschreibung durch KRÜGER (1894) sind nicht nur die Stellung der Prototheken im Pflanzenreich, sondern auch die Anzahl und Art der Spezies innerhalb der Gattung starken Veränderungen unterworfen.

KRÜGER ordnetesie den Pilzen zu, da ihre heterotrophe Lebensweise, verbunden mit einer Chlorophyllosigkeit, einer zellulosehaltigen Zellwand und der Fortpflanzung durch endogene Sporenbildung, dies nahe legt. Hingegen fehlenden Prototheken jegliche anderen, den Pilzen eigenen Fortpflanzungsformen, wie Mycel, Arthrosporen oder Blastosporen. Deshalb ordnet er bereits CHODAT (1913) und PRINTZ (1927) sie der Chlorophyceen und damit den Algen zu.

Als "Yeast-like algalae" ordnetesie CIFERRI (1956) wieder in die Nachbarschaft der Saccharomycetales ein, wobei er sich auf die heterotrophe Lebensweise und den Thiaminbedarf berief. Ebenfalls den Pilzen näherstehend, aber dennoch als Verbindungsglied zwischen Algen und Pilzen, werden die Prototheken von TUBAKI und SONEDA (1959) gesehen. Nachdem sie mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen das Vorhandensein von Leukoplasten bestätigen konnten, ordnet MENKE und FRICK (1962) die Prototheken den *Protococcaceae*, welche infolge einer Mutation die Fähigkeit der Pigmentbildung verloren haben zu.

PRINGSHEIM (1963) hingegister der Meinung, dass die Prototheken direkt von den grünen Algen abstammen und durch Apochlorose (Chlorophyllverlust) entstanden sind. Er ordnetesie deshalb den apochlorotischen *Chlorococcaceen* zu. Aufgrund des Fehlens von Glukosamin und Mureinsäuren bei *P. segbwema* typischer Merkmale von Pilzen und Bakterien stellen DAVIES und WILKINSON (1967) die Prototheken ebenfalls in die Nähe der Algen. Dem widersprechend gelingt LLOYD und TURNER (1968) der Nachweis von Glukosamin bei *P. zopfii*. NADAKAVUKAREN und McCracken (1973) können Plastiden nachweisen, die Stärkegranula enthalten. Da diese bei Pilzen nicht zu finden sind, halten diese Autoren die Prototheken für "nicht photosynthetisierende Algen".

Seit Anbeginn der taxonomischen Diskussion ist auch der Verwandtschaftsgrad zur Grünalgen gattung *Chlorella* (*C.*) umstritten. Eine Vielzahl von Autoren sieht in den

Prototheken Abkömmlinge von Chlorellen, die durch Mutation ihre Chloroplasten und damit die Fähigkeit zur autotrophen Assimilation verloren haben (ANDERSON, 1944b; CIFERRI, 1956; COOKE, 1968; SEFFNER, 1987; SUDMAN und KAPLAN, 1974). Dabei stützt sich zum einen auf Ähnlichkeiten in der Morphologie und Reproduktion sowie zum anderen auf das Auftreten von Übergangsformen mit Merkmalen von Chlorellen und Prototheken. So gibt es mit *C. variegata* und *C. protothecoides* zwei Vertreter der Gattung *Chlorella*, die bei gutem Nährstoffangebot kaum noch Chlorophyll bilden und auch heterotroph assimilieren. Als Unterscheidungsmerkmal gilt hingegen der Bedarf an Thiamin bei Prototheken (PRINGSHEIM, 1963). *C. protothecoides* hingegen hat auch dieses Merkmal sowie die fehlende Nitratassimilation mit den Prototheken gemein (CONTE und PORE, 1973; PORE, 1972).

Eine Reihe anderer Autoren äußert hingegen Zweifel an der Protothekenabstammung von *Chlorella*. So zeigen ANDERSON (1944a), CASSELTON (1967), CIFERRI (1956), COOKE (1968), PRINGSHEIM (1963) sowie TUBAKI und SONEDA (1959) erhebliche Unterschiede in der C- und N-Assimilation. ARNOLD und AHEARN (1972), LLOYD und TURNER (1968) sowie MANNERSETAL (1973) stellen bei vergleichenden Zellwand-Untersuchungen zum Teil erhebliche Unterschiede in Ultrastruktur und Zusammensetzung fest und gehen deshalb nicht von einer engen Verwandtschaft von *Prototheca* mit *Chlorella* aus. Bei ihren biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnte KESSLER (1977) sowie KERFIN und KESSLER (1978) zwar eine enge Verwandtschaft der Prototheken zu *C. protothecoides* nicht abzu dem anderen Vertreter der Gattung *Chlorella* aufzeigen. Molekularbiologische Untersuchungen der SSUrRNA stellen die Prototheken schließlich phylogenetisch wieder in die Nähe der Chlorellen (HUSS und SOGIN, 1990; WOLFF und KUCK, 1990). Nach heutiger Sicht werden die Prototheken deshalb wie in Tabelle 1 dargestellt eingeordnet.

Tabelle 1. Taxonomische Stellung der Gattung *Prototheca* (Stand Juni 2001)

Überreich	<i>Eukaryota</i>
Reich	<i>Viridiplantae</i>
Abteilung	<i>Chlorophyta</i>
Klasse	<i>Trebouxiophyceae</i>
Ordnung	<i>Chlorellales</i>
Familie	<i>Chlorellaceae</i>
Genus	<i>Prototheca</i>

Über die Anzahl und Art der verschiedenen Spezies innerhalb der Gattung *Prototheca* gibt es ebenfalls stark divergierende Meinungen. So gibt es eine große Anzahl von Erstbeschreibungen, die inzwischen meistens als Synonyme von *P. zopfii* reklassifiziert werden konnten.

Die Ursache für derartige fachliche Unstimmigkeiten hinsichtlich der Taxonomie der Protothekenspezies ist hauptsächlich in den unterschiedlichen Methoden zu sehen, mit denen die Autoren physiologische und morphologische Kriterien untersucht haben (SCHUSTER und SCHUSTER, 1982). Des Weiteren sind Differenzen bei der Speziesidentifikation in der teilweise beträchtlichen Variabilität der physiologischen und morphologischen Parameter zu suchen (ARNOLD und AHEARN, 1972; KESSLER, 1982; PRINZ, 1988; SUDMAN und KAPLAN, 1973). Nach der heute geltenden Nomenklatur (siehe Tabelle 2) ist eine sichere Identifikation der anerkannten Protothekenspezies anhand des Assimilationsverhaltens verschiedener C-Quellen in Kombination mit der Wachstumstemperatur und dem Nachweis einer etwaig vorhandenen Schleimkapsel gut möglich (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1985a).

Tabelle 2 Identifikationskriterien der verschiedenen *Prototheca*-Spezies

Merkmal	<i>P. zopfii</i>	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. stagnora</i>	<i>P. moriformis</i>
Kolonieform	flach, gekörnt, zentraler Knopf und ausgebogener Rand	halbkugelig, glatt mit glattem Rand	flach, glatt mit glattem Rand	halbkugelig, glatt mit glattem Rand
Zelldurchmesser [µm]	7-30	4-10	7-14	4-20
Assimilation von				
Glukose	+	+	+	+
Saccharose	-	-	(+) ^a	-
Trehalose	-	+	-	-
n-Propanol	+	-	-	-
Wachstum bei 37°C	+	+	-	+/-
Kapselbildung	-	-	+	+

^aWachstumszeit nach längerer Inkubationszeit (>14d)

Heute anerkannte Spezies der Gattung *Prototheca* sind *P. wickerhamii*, *P. zopfii* und *P. stagnora*. Die Existenz von *P. moriformis* wird nach wie vor bezweifelt (PORE, 1985b; PRINZ, 1988), da die Mehrzahl der Autoren diese Spezies aufgrund einer bestehenden

Kreuzantigenität und fast identischen Assimilationsmuster als ein Synonym von *Pzopfii* ansieht (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1985b; DE CAMARGO und FISCHMAN, 1979; DIEUDONNÉ, 1997; GEDEK und WEBER, 1978; JOSHI et al., 1975; MÜLLER, 1988; PADHYE et al., 1979; PATNI und AARONSON, 1974; SUDMAN und KAPLAN, 1973; SUDMAN und KAPLAN, 1974; THIELE, 1997).

Nach Untersuchung einer Vielzahl von Isolatenaus der Umweltsowie aus Rindermastitiden unterteilen BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) *Pzopfii* in drei Varianten respektive Biotypen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Differenzierungsmerkmale der Varianten von *Pzopfii*

Merkmale	Variante I	Variante II	Variante III
Zellgröße der Sporangiosporen [µm]	11-30	5-15	12-22
Zellform	sphärisch/zylindrisch	sphärisch/zylindrisch	sphärisch
Anteil von Teilungsformen	15%	3,4%	nicht untersucht
Galaktoseassimilation ^a	++ ^b	(+) ^c	+
Glycerolassimilation ^a	+++	+++	-
pH-Toleranz	2,4-9,5	2,1-10,5	4,0-10,5
NaCl-Toleranz bei	4,0%	6,0%	4,0%
Wachstum bei 37°C	+	++	+
Herkunft	Aus Rinder- und Schweineställen	Überwiegend aus Rinderställen oder kommunalen Abwässern	Überwiegend aus Schweineställen
Nachweis bei bovinen Mastitiden	nein	ja	nein

^anach 7 Tagen Inkubationsdauer

^b Wachstumsintensitäten: - = kein Wachstum, (+) = spärliches und zeitlich stark verzögertes Wachstum, += schwaches Wachstum, +++ = gutes Wachstum, ++++ = sehr gutes Wachstum

^cringförmige Wachstumszone bei Variante II

Die Differenzierung erfolgte dabei auxanographisch (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1987; SEFFNER, 1994) anhand des Assimilationsmusters vor Galaktose und Glycerol sowie mikroskopisch anhand der Zellgröße und Teilungsaktivität (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1987; SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN, 1983; SEFFNER, 1994). Als zusätzliche epidemiologische Kriterien zur Differenzierung werden das Vorkommen in bestimmten Habitaten sowie die Pathogenität der Isolate herangezogen (BAUMGÄRTNER, 1997; SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN, 1983). Schließlich lieferten Untersuchungen von verschiedenen Protothekenisolaten mittels der Fourier-transformierten Infrarot-Spektroskopie ebenfalls deutliche Hinweise für das Vorkommen verschiedener Cluster innerhalb von *P. zopfii*, wobei sich dabei die Variante III am deutlichsten von den übrigen Isolaten unterscheiden ließ (SCHMALRECK et al., 1998). Vergleichende taxonomische Studien zum Vorkommen von Biotypen innerhalb der Spezies *P. zopfii* auf der Basis molekular genetischer Untersuchungen erfolgten bisher nicht.

2.1.2 Morphologie der Prototheken

Kulturmorphologisch sind Kolonien von *Prototheca* spp. durch eine cremeweiße bis beige Farbe, eine glatte bis matt glänzende Oberfläche und eine weiche, pastenartige Konsistenz gekennzeichnet. Gemeinsam mit dem Auftreten der hefeähnlichen Gerüche kommt es auf den gebräuchlichen Pilznährmedien makromorphologisch leicht zu Verwechslungen mit Hefen (KAPLAN, 1977; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977). Wie auch bei Bakterien und Pilzen so variieren auch bei der Protothekensowohl die Zellmorphologie wie auch die Sporenzahlen Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium, von den untersuchten Spezies, vom einzelnen Isolat und vom Entwicklungsstadium der Kultur (ARNOLD und AHEARN, 1972; KAPLAN, 1977).

Während die Kolonien von *P. zopfii* und *P. stagnora* flach sind, weisen diejenigen von *P. wickerhamii* eine halb kugelige Form auf. Die Oberfläche der *P. wickerhamii*-Kolonien ist glatt, die von *P. stagnora* glatt bis leicht gekörnt und die von *P. zopfii* gekörnt mit zentralem Knopf und ausgebogenem Rand (DECAMARGO und FISCHMAN, 1979; PADHAY et al., 1979; THIELE, 1997).

Mikromorphologisch sind Prototheken runde bis ovale einzelne Organismen mit einer von der Teilungsphase abhängigen Zellgröße zwischen 3 und 30 µm (GÖDEKUND WEBER, 1978). Die zu großen Teilen aus Zellulose und Sporopollenin bestehende Zellwand von

P.zopfii zeigt bei Zellwandanalyse eine zweischichtige Aufbau- und eine Dicke von etwa 1000 Ångström (LLOYD und TURNER, 1968; MENKE und FRICKE, 1962). LOU PALET al. (1992) fanden allerdings einen von Entwicklungszustand abhängigen Zellwandaufbau, der bei jungen Zellen ein- bei älteren Zellen hingegen zweifach und dreischichtig war.

Im Inneren der Zellen von *P.zopfii* und *P.wickerhamii* konnten ein Zellkern mit Nucleolus, ein Golgiapparat, Ribosomen, meist peripher liegende Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum dargestellt werden (NADAKAVUKAREN, 1973; PATNI und AARONSON, 1974). Des Weiteren wurden Plastiden nachgewiesen, welche Glykogen sowie einen stärkeartigen Speicherstoff enthielten. Diese wurden daraufhin als Leukoplasten, Glycophoren oder Amyloplasten bezeichnet (MENKE und FRICKE, 1962; NADAKAVUKAREN und McCracken, 1973).

Auffälligstes Merkmal für die mikroskopische und pathohistologische Identifizierung der Gattung *Prototheca* ist jedoch das Auftreten einer je nach Spezies und Entwicklungsstadium unterschiedlich großen Anzahl von Tochterzellen, den Endo-, Auto- oder Sporangiosporen. Diese entwickeln sich innerhalb der Mutterzelle, dem Sporangium. Platz für diese auf, ist die leere Hülle mikroskopisch ebenfalls noch gut zu identifizieren (JANOS et al. 2001a).

2.1.3 Physiologie der Prototheken

Prototheken gewinnen ihre Energie durch heterotrophe Assimilation, also durch Oxidation organischer Verbindungen. Den Hauptanteil stellen dabei Kohlenstoffquellen, so verschiedene Zucker, aber auch Alkohole wie Glycerol und Propanol dar. Für diese Stoffwechselprozesse werden vollfunktionstüchtige Mitochondrien benötigt (WOLFF et al., 1993). Die nutzbaren Stickstoffquellen sind ebenfalls vorwiegend organischer Natur (z. B. Pepton, Lysin, Arginin), während anorganischer Stickstoff schlecht, Nitrat gar nicht und Ammoniumsalze nur mäßig verwertet werden können (PRINGSHEIM, 1963). Die Nutzung von Stickstoffquellen ist dabei immer an N-freie Kohlenstoffverbindungen, welche dann als Energielieferanten dienen gebunden.

Alle Vertreter der Gattung *Prototheca* sind thiamindefizient. Sie benötigen für ihre Entwicklung Vitamin B₁, das sie selbst nicht synthetisieren können (CIEFERRI, 1956). ANDERSON (1944a) wies nach, dass auch die Zugabe beider Bestandteile des Thiamins, das Thiazol und die Pyrimidin für das Wachstum von *P.zopfii* ausreichend ist.

Protothekensind in wesentlich größerem Umfang als ihre autotrophen Verwandten in der Lage, Speicherstoffe anzulegen. Als Reservestoffe dienen dabei Glykogen und Fett, das in Algen dann in flüssiger Form als Öl eingelagert wird. Unter schlechten Wachstumsbedingungen werden diese Speicherstoffe in großem Umfang eingelagert. So sind die Dauerformen mikroskopisch oft ein regelrechter Öltropfen sichtbar, wohingegen man diese bei guten Wachstumsbedingungen meist nicht findet kann (PRINGSHEIM, 1963).

Die Vermehrung der Protothekener erfolgt algentypisch, asexuell durch Zellteilung. In der Mutterzelle, dem Sporangium, bilden sich in Abhängigkeit von Temperatur und Wachstumsrate bis zu 30 Endo- oder Sporangiosporen (ARNOLD und AHEARN, 1972; POYTON und BRANTON, 1972). In Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen kommt es zum Aufbau zweier verschiedener Sporentypen. Die kleinen, dickwandigen und mit reichlich Vorratsstoffen ausgestatteten Ruhe- oder Hypno sporen werden nur zu einem geringen Prozentsatz gebildet und dienen wahrscheinlich dem Überdauern widriger Umweltbedingungen. Bei günstigen Bedingungen entstehen dünnwandige, große und mit relativ wenig Speicherplastid ausgestattete Sporen (ARNOLD und AHEARN, 1972; JOSHI et al., 1975; KOCKOVA-KRATOCHVILOVA und HAVELKOVA, 1974). Schlechte Umweltbedingungen überleben die Sporen von *P. zopfii* und *P. wickerhamii* ohne weitere Teilung unter Aufbrauch der vorhandenen Reservestoffe.

Die Tenazität dieser beiden Spezies ist sehr groß. So sind sie in Trinkmilch, Abwässern sowie auch bei Trockenheit monatelang lebensfähig und waren in Rinder- und Schweinegülle auch nach 100 Tagen noch nachweisbar (BLASCHKE-HELLMESSEN und SCHUSTER, 1984). In diesem Zusammenhang ist die hohe Tenazität gegenüber höheren Temperaturen ebenfalls bemerkenswert. So ist *P. zopfii* in der Lage, verschiedener Pasteurisationsprozeduren sehr gut zu widerstehen (MELVILLE et al., 1999). Von den 40 untersuchten *P. zopfii*-Isolaten wurden 62,5% bei einer Behandlung mit 75°C über 15 Sekunden nicht inaktiviert. Immerhin noch 45% der untersuchten Isolate widerstanden einer Pasteurisation bei 75°C für 20 Sekunden, und 62,5% konnten mit einer Temperatur von 65°C über einen Zeitraum von 30 Minuten nicht inaktiviert werden. Insgesamt waren 22,5% der untersuchten Isolate für alle angewandten Pasteurisationsmethoden unempfindlich.

2.1.4 Ökologie der Gattung *Prototheca*

Prototheken sind typische Saprophyten mit ubiquitärem Vorkommen und einer Vorliebe für Standorte mit abgestorbenen organischen Bestandteilen von Pflanzen und Tieren (METTLER, 1983; SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN, 1983). So wurden die verschiedenen Prototheken-Spezies aus dem Saftfluß von Laubbäumen (besonders dem von Ulmen), aus kommunalen und landwirtschaftlichen Abwässern, Oberflächengewässern, dem Erdboden, Kartoffel- und Bananenschalen, aber auch so exotischen Medien wie dem Ölschlamm einer Erdölraffinerie isoliert (DE CAMARGO und FISCHMAN, 1979; KOCKOVA-KRATOCHVILOVA und HAVELKOVA, 1974; KRÜGER, 1894; PORE, 1985a). Auch aus der Umgebung landwirtschaftlicher Nutztiergelede nachweishäufig und dies mit hohen Keimgehalten (SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN, 1983). Die Besiedlung des Darmes von Rindern, Schweinen und Pferden wird als physiologisch angesehen (ENDERS und WEBER, 1993a; ENDERS und WEBER, 1993b; WEBER und ENDERS, 1993). Die postulierten Varianten bzw. Biotypen von *P. zopfii* zeigen dagegen ein tierartsspezifisches Vorkommen. Variante I und II sind zu gleichen Teilen in Rinderställen anzutreffen. Nur Variante II wurde bisher als pathogenes Agens bei der Protothekenmastitis des Rindes isoliert, und scheint deshalb eine besondere Rolle in der Ätiologie dieser Erkrankung zu spielen (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1985a; JANOS et al., 2001b; SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN, 1983). Variante III hingegen konnte bisher meist nur aus Schweinehaltungen isoliert werden.

2.2 Protothekose beim Mensch und Tier

Unter der Bezeichnung „Protothekosen“ werden die beim Mensch und Tier durch Prototheken hervorgerufenen Krankheitsbilder zusammengefaßt (SONCK und KOCH, 1971). Obwohl die Vertreter der Gattung *Prototheca* weltweit ubiquitär vorkommen, gehören durch diese pflanzlichen Erreger bedingten Erkrankungen sowohl beim Menschen wie auch beim Tier zu den eher seltenen Infektionen. Bei gleichzeitigem Einwirken bestimmter prädisponierender Faktoren können jedoch sowohl *P. wickerhamii* als auch *P. zopfii* beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten eine Reihe unterschiedlichster Krankheitsbilder auslösen (SCHÖNBORN et al., 1974).

2.2.1 Protothekosen des Menschen

Die Protothekeninfektion des Menschen ist eine seltene, weltweit vorkommende Erkrankung, von der die meisten Fallberichte aus Asien und Nordamerika vorliegen. Ausgelöst wird die Protothekose des Menschen in der überwiegenden Zahl durch *P. wickerhamii*, während die *P. zopfii*-Infektion nur sporadisch auftritt (THIELE, 1997). Interessanterweise konnte allerdings durch BLASCHKE-HELLMESSEN (2001) mehrfach *P. zopfii*, Variante III aus Onychomykosen isoliert werden. Die Kausalfrage konnte jedoch nicht abschließend beantwortet werden.

Anhand der Lokalisation des Infektionsgeschehens erfolgt die Einteilung der Protothekeninfektion des Menschen in folgende drei Gruppen (LEE, 1989; MATSUDA und MATSUMOTO, 1992): Haut- und Unterhautprotothekosen, die Schleimbeutel-, Fascien- und Sehnenscheidenprotothekosen und die systemischen Protothekosen. Darüber hinaus können Prototheken aber auch als harmlose Hautbesiedler isoliert werden (ARNOLD und AHEARN, 1972; SCHÖNBORN et al., 1974). Auch die Isolierung aus menschlichen Faeces gelang mehrfach (ASHFORD et al., 1930; CASALET et al., 1983; CASAL und GUTIERREZ, 1983a). Die ätiologische Bedeutung dieser Algenisolate konnte jedoch bisher nicht schlüssig geklärt werden, obgleich es Hinweise gibt, dass Prototheken beim Menschen, ähnlich wie beim Hund auch Enteritiden verursachen können (CASAL et al., 1983).

Einen umfassenden Überblick über die in der Humanmedizin beschriebenen Fälle von Protothekeninfektionen gibt THIELE (1997). Anhand der 73 aufgeführten Fallbeschreibungen wird deutlich, dass für die Entstehung der humanen Protothekosen das Einwirken von prädisponierenden Faktoren als Grundvoraussetzung anzusehen ist. So gingen den oft beschriebenen Infektionen der *Bursa olecrani* in der Regel Ellenbogenverletzungen voraus (AHBEL et al., 1980; MATSUDA und MATSUMOTO, 1992; METTLER, 1983). Als wichtigster prädisponierender Faktor ist aber sowohl für die lokal als auch für die systemischen, disseminierten humanen Protothekosen eine Beeinträchtigung der zellulären und humoralen Immunität anzusehen. So konnte gezeigt werden, dass Protothekeninfektionen iatrogen durch lokale oder systemische Glukokortikoid- oder Zytostatikaapplikation begünstigt werden (COCHRAN et al., 1986; HEITZMAN et al., 1984; HOLCOMB et al., 1981; NARYSHKIN et al., 1987; TSUJI et al., 1993). Es liegen auch Berichte über prädisponierende Stoffwechselerkrankungen, wie *Diabetis mellitus*, vor. Die mit diesen Erkrankungen einhergehende Immunsuppression wird für verschiedenste Manifestationsformen verantwortlich gemacht (CONNOR et al., 1982; GIBB et al., 1991;

LEEetal.,1975;MATSUDAundMATSUMOTO,1992).IndiesemZusammenhangsind auch nichtinfektiöse Defekte der zellulären Abwehrmechanismen und Tumoren des hämatopoetischen Systems als prädisponierende Faktoren identifiziert worden (HENEYetal., 1991; VENEZIOetal.,1982).DiegrößteBedeutungmußindenletztenJahrenjedochder Infektion durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) zugesprochen werden, die neben anderen selteneren Krankheitsbildern, wie Systemmykosen, auch für eine Häufung der Fälle von lokalen und systemischen Protothekosen verantwortlich gemacht werden konnten (BIANCHI et al., 2000; CAREY et al., 1997; KAMINSKI et al., 1992; POLK und SANDERS,1997;WOOLRICHetal.,1994).

2.2.2 Protothekosen des Hundes

Neben Krankheitsbeschreibungen bei Rind und Mensch stammen die meisten Fallberichte über Prototheken-bedingte Erkrankungen vom Hund. Unterschiede zum Menschen bestehen einerseits in den klinischen Erscheinungsformen selbst, andererseits unterscheidet sich auch das Erregerspektrum (THIELE,1997).Während beim Menschen vorwiegend *P.wickerhamii* für die Infektion verantwortlich ist, werden bei Erkrankung des Hundes *P.zopfii* und *P.wickerhamii* zu annähernd gleichen Teilen isoliert (MIGAKIetal., 1982).TYLERetal. (1980)berichtet sogar über das gleichzeitige Auftreten beider Spezies innerhalb eines selbsten Krankheitsgeschehens. Anders als beim Menschen handelt es sich beim Hund in der Regel um eine disseminierte Infektion mit Manifestation in verschiedenen Organsystemen (QUINN et al., 1999). Die daraus resultierenden, meist therapieresistenten klinischen Erscheinungen äußern sich als Dermatitis (GINELetal.,1997;MACARTNEYetal.,1988; METTLER,1983;PEREZetal.,1997), hämorrhagische Enteritide (GAUNTetal.,1984; MIGAKI et al., 1982; THOMAS und PRESTON, 1990) sowie in zentralnervösen Ausfallserscheinungen, wie plötzlicher Erblindung, Taubheit oder Lahmheiten (BLOGGund SYKES,1995;BUYUKMIHÇIetal.,1975;COOKetal.,1984;FONTundHOOK,1984; MOOREetal.,1985;TYLERetal.,1980) Pathomorphologische Veränderungen finden sich in Form von disseminierten pyogranulomatösen Läsionen überall in Darm, Konjunktiva, Retina, Nieren, Leber, Milz, Herz, Lunge sowie der retrokavitären Lymphknoten (BLOGGund SYKES,1995;COOKetal.,1984;IMESetal.,1977;TYLERetal.,1980).Hierbei ist auffällig, dass es dabei nur zu einer zahlenmäßig geringen Immunmigration von Entzündungszellen in den Infektionsherd kommt. Die Rolle prädisponierender Faktoren wird

diskutiert, da es auch beim Hund Hinweise darauf gibt, dass eine Suppression der zellulären Immunantwort das Infektionsgeschehen begünstigen kann (PEREIRA und LATIMER, 1984). Im Gegensatz zum Menschen ist die systemische Therapie mit Antimykotika, wie Amphotericin B und Ketokonazol, in der Regel erfolglos, sodass die meisten betroffenen Tiere entweder dem euthanasiert werden müssen.

2.2.3 Protothekose anderer Spezies

Natürliche Infektionen mit *Prototheca*-Spezies wurden außerhalb von Mensch, Hund und Rind nur als Einzelfallbeschreibungen bei der Katze, dem Reh, dem Flughund sowie bei Karpfen und Atlantischer Lachs beschrieben:

Bei der Katze konnte als pathogenes Agens bisher nur *Prototheca wickerhamii* isoliert werden. Klinisch fand sich lokale Affektion der Haut, wobei eine besondere Affinität zum Bereich des Kopfes beobachtet wurde. Pathologisch handelte es sich bei diesen Fällen um pyogranulomatöse Entzündungen (COLOE und ALLISON, 1982; DILLBERGER et al., 1988; KAPLAN et al., 1976; QUINN et al., 1999).

Die einzig beschriebene Protothekose eines Rehs wurde durch *P. wickerhamii* ausgelöst und war auf den Kopf und die Vordergliedmaßen beschränkt, wobei auch die regionalen Lymphknoten involviert waren (FRESE und GEDEK, 1968; SUDMAN und KAPLAN, 1973). Beim Flughund wurde eine generalisierte, durch *P. wickerhamii* ausgelöste Protothekose mit pyogranulomatösen Veränderungen an vielen inneren Organen beschrieben (METTLER, 1975). Protothekosen bei Fischen (Karpfen und Atlantischer Lachs) wurden bereits mehrfach beschrieben (GENTLE und BOND, 1977; LOUPA et al., 1992). Es waren dabei verschiedene innere Organe, insbesondere die Schwimmblase, vom Infektionsgeschehen betroffen.

2.3 Die Protothekenmastitis des Rindes

Bei der Protothekenmastitis des Rindes handelt es sich um eine durch *P. zopfii* verursachte, lokale Infektion der Milchdrüsen mit Beteiligung der Euterlymphknoten.

Darüber hinaus sind auch sporadische Fälle einer granulomatösen Lymphadenitis der Retropharyngeallymphknoten und anderer Körperlymphknoten (MIGAKI et al., 1969) sowie der Fall einer granulomatösen Peritonitis beschrieben worden (ROGERS, 1974). Der Erreger wurde in diesen Fällen zuerst als Alge der Gattung *Prototheca* bezeichnet. Später ließ sich jedoch in all diesen Fällen Grünalge der Gattung *Chlorella* als krankmachende Erreger identifizieren, wodurch sich auch die grüne Färbung der beobachteten Granulome erklären ließ (CHANDLER et al., 1978; SUDMAN und KAPLAN, 1973).

2.3.1 Ätiologie und Pathogenese der Protothekenmastitis

Die Infektion mit *P. zopfii* erfolgt in der Regel galaktogen-aszendierend. Zitzenverletzungen werden ebenfalls als Eintrittspforten für die Erreger angesehen. Die weitere Verbreitung der Erreger erfolgt im Hohlraumssystem des Euters. Diese sezernierenden Alveolen scheinen günstige Vermehrungsbedingungen für *P. zopfii* zu bieten, da eine Mastitis gehäuft bei Kühen in der Hochlaktation beobachtet werden kann (DION, 1982; FRANK et al., 1969; LERCHE, 1952; SCHIEFER und GEDEK, 1968; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977; SEFFNER, 1994; SPALTON, 1985). Für einen bevorzugt galaktogenen Infektionsweg spricht auch, dass die experimentelle Induktion von Mastitiden bisher stets nur auf diesem Wege gelang (BERGMANN, 1993b; DION, 1982; LERCHE, 1952).

Darüber hinaus wird ebenfalls ein endogener Infektionsweg mit hämatogener oder lymphogener Ausbreitung der Erreger im Euter vermutet (WILHELM et al., 1992). So wurde gezeigt, dass Prototheken in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten überleben können und dort sogar vermehrungsfähig bleiben (GINEL et al., 1997; JENSEN et al., 1998). Eine Ausbreitung in Gewebe auf diesem Weg ist sehr wahrscheinlich. Der lymphogene Transport der Erreger erscheint auch deshalb als möglich, da Prototheken häufig aus den Euterlymphknoten infizierter Rinder isoliert werden können. SEFFNER (1994) vermutet als Erregerwirkung Toxine. Durch deren Wirkung soll es zu Alveolarrepithelschädigungen kommen, die dann eine weitere intraalveoläre Ausbreitung der Prototheken begünstigen. Nach Studien zum Migrationsverhalten verschiedener Entzündungszelltypen vermuten PEREZ et al. (1997), dass Prototheken entweder die Migration und Proliferation von Entzündungszellen wirkungsvoll herabsetzen, oder dass nur abgetötete Algenzellen eine ineffektive lokale Immunantwort führen können.

Die Fähigkeit, im Makrophagen zu überleben und der Phagozytose wirksam widerstehen zu können, scheint ein Hauptgrund für die Chronizität der Protothekenmastitiden zu sein. Zwar vermag der Körper durch Kapsel- und Abszeßbildung die Erregergegnüber dem anderen Eutergewebe abzugrenzen und damit auch eine weitere Ausbreitung zu verhindern, eine Abtötung der Erreger gelingt jedoch nicht. Vermutlich durch Aufbrechen der abgekapselten Erregerherde kommt es dann häufig zu intermittierenden Ausscheidungen der Erreger. Dies führt zu diagnostischen Schwierigkeiten, aber auch zu einer länger persistierenden Infektion (SCHICK und KUTZER, 1982). Auf der Basis dieser Hypothese ist erklärbar, dass viele Tiere auch nach dem Trockenstehen erneut die Erreger ausscheiden und Symptome einer Mastitis entwickeln (DION, 1982). Durch die fortschreitende bindegewebige Induration und Atresie des Euterepithels kommt es schließlich zu irreversiblen und starken Rückgang der Milchleistung. Sind ganze Herden betroffen, führt dies letztendlich zu großen ökonomischen Verlusten in der betroffenen Betriebe (GEDEK und WEBER, 1978; SEFFNER, 1994).

Wie bei anderen Infektionen mit Pilzen und Hefen, so spielen wahrscheinlich auch bei Infektionen mit Vertretern der Gattung *Prototheca* prädisponierende Faktoren eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu pilzbedingten Mastitiden ist in die bisher bekannten Parameter nur sporadisch untersucht worden, und eine Interpretation klinischer Befunde ist somit entsprechend schwieriger.

Die Hypothese, dass es sich bei *Prototheca* spp. um opportunistische Erreger handelt, die nur unter besonderen prädisponierenden Faktoren infektiös sind, wird einerseits durch das seltene Auftreten von Protothekeninfektionen und andererseits durch die meist vergeblichen Versuche, unterschiedliche Labortier-Spezies zu infizieren, unterstützt (DECAMARGO und FISCHMAN, 1979; LERCHE, 1952). Nur mit sehr hohen Inokulationsdosen gelang es bei Mäusen, in einigen wenigen Individuen metastatische Herde im Hirn, Milz und Nieren zu erzeugen (SCHIEFER und GEDEK, 1968; SCHÖNBORN et al., 1974).

Anhand der Fallberichte zu humanen Protothekosen ist die Bedeutung prädisponierender Faktoren in der Vergangenheit analog nachvollziehbar. Dort konnte bei immunsupprimierten Patienten nach lokaler oder systemischer Glukokortikoidtherapie odemach Krankheitendes Immunsystems, wie AIDS oder dem Hodgkin-Lymphom, ein verstärktes Auftreten lokaler und systemischer Protothekosen beobachtet werden (COCHRAN et al., 1986; HENEY et al., 1991; JACOVIELLO et al., 1992; KAMINSKI et al., 1992; LAENG et al., 1994; TEJADA und PARKER, 1994; TSUJI et al., 1993; WOOLRICH et al., 1994). Andererseits zeigten GEDEK und WEBER (1978), dass die Verabreichung von Antibiotika keinen Einfluß auf die

Ansiedlung und Ausbreitung der Prototheken im Eutergewebe von Rindern hatte. Im Vergleich zu den Protothekosen des Hundes konnten prädisponierende Faktoren bisher ebenfalls nicht eindeutig identifiziert werden, obwohl auch hier in Zusammenhang mit einer Immunsuppression wahrscheinlich ist. Für das Entstehen einer klinisch manifesten Mastitis des Rindes scheinen prädisponierende Faktoren hingegen eine große Rolle zu spielen, da Prototheken auch in der Milch eutergesunder Kühe und in trockenstehenden Eutern nachgewiesen worden sind (SEFFNER, 1994; WILHELM et al., 1992) und Infektionen durchaus mild oder sogar klinisch inapparent verlaufen können (GEDEK und WEBER, 1978).

Als prädisponierende Faktoren für die Protothekenmastitis des Rindes gelten unvorschriftsmäßiges Melken, Hochlaktation oder eine Vorbeschädigung des Euters durch andere Mastitiserreger (DACOSTA et al., 1996; JANOSI et al., 2001a; SEFFNER, 1994). Chronisch mit *Streptococcus agalactiae* infizierte Rinderbestände sowie Bestände mit erhöhtem Milchzellgehalt oder vermehrten bakteriellen Infektionen gelten als prädisponiert für das Angehen einer Herdenprotothekose (TENHAGEN et al., 1999; WILHELM et al., 1992). Eine Weide- oder Auslaufhaltung auf Gelände mit *Prototheca*-kontaminierten Feuchtstellen begünstigt wahrscheinlich ebenfalls das Entstehen dieser Erkrankung (COSTA et al., 1996; COSTA et al., 1997; GORR, 1982).

2.3.2 Klinik der Protothekenmastitis

Die Protothekenmastitis des Rindes beginnt als akute bis subakute Entzündung der Milchdrüse und geht später in der Regel in das chronische Stadium über. Dies führt schließlich in den meisten Fällen zum vollständigen Funktionsverlust des betroffenen Eutergewebes (FRANK et al., 1969; SEFFNER, 1994; SPALTON, 1985). Die *Restitutio ad integrum* in klinisch auffällig gewordenen Tieren ist die Ausnahme. Das Auftreten klinisch inapparent infizierter Tiere und intermittierender Erregerausscheider wurde dagegen häufig beobachtet (SCHICK und KUTZER, 1982).

Im akuten Stadium ist das Euter von einer derben Konsistenz und ballonartigem Aussehen, wobei weitere typische Entzündungserscheinungen, wie Rötung und Ödembildung, in der Regel fehlen (COSTA et al., 1996; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977; SEFFNER, 1994). Die Milchleistung geht in kürzester Zeit stark zurück und kann vollständig versiegen und der

Gehalt der Milch an somatischen Zellen ist mäßig bis stark erhöht (FRANK et al., 1969). Sekretveränderungen werden zu diesem frühen Zeitpunkt selten bemerkt. Die im Anschluß auftretenden Sekretveränderungen manifestieren sich durch schleimig-wässrige Beschaffenheit der Milch, oft versetzt mit weißen oder gelblichen, quarkähnlichen Ausfällungen (GEDEK und WEBER, 1978; GRUNERT et al., 1996). Im folgenden chronischen Stadium kommt es zu einer Zunahme der Atresien der betroffenen Euterviertel mit deutlich tastbaren, klein- oder großknotigen Gewebeverdichtungen. Diese pathologischen Veränderungen gehen mit einer ständigen Milchmengenabnahme und einer erhöhten Infektionsanfälligkeit des betroffenen Euterviertels für andere Krankheitserreger einher. Schließlich kommt es in der überwiegenden Mehrzahl aller Fälle zum vollständigen Funktionsverlust des Drüsenepithels und zum Sistieren der Milchproduktion (JENSEN et al., 1998; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977). Als typisches Anzeichen für das endemische Vorliegen einer Protothekenmastitis ist daher eine erhöhte Prävalenz von Tieren mit einem oder mehreren atretischen Eutervierteln anzusehen.

2.3.3 Pathomorphologie der Protothekenmastitis

Pathohistologisch handelt es sich bei der Protothekenmastitis des Rindes um eine interstitielle pyogranulomatöse Entzündung der Milchdrüse (MCDONALD et al., 1984b). Im akuten Infektionsstadium findet man eine Vielzahl von Algen in den Alveolen und den *Ductuli lactiferi*. Mechanisch bedingt kann es zu massiven Stauungserscheinungen kommen, welche dann zur beschriebenen Klinik mit ballonartigen Eutern und abruptem Milchleistungsrückgang führen können (FURUOKA et al., 1989; GEDEK und WEBER, 1978). Die Immigration von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in das Eutergewebe ist gering ausgeprägt, und auch die Zahl der in die Milch ausgewanderten Entzündungszellen ist themäßig (HODGES et al., 1985; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977). Im chronischen Stadium weist das pathohistologische Bild der Protothekenmastitis ähnliche charakteristische Merkmale auf, wie sie auch bei anderen, lang andauernden, persistierenden und schwer zu therapierenden Infektionen der bovinen Milchdrüse zu finden sind. So ist die Immigration der Erreger ins Interstitium und eine anschließende bindegewebige Abkapselung typisch (FURUOKA et al., 1989; HODGES et al., 1985). Bei einsetzender Granulombildung wird ein Wall aus Lymphozyten und Epitheloidzellen sichtbar, in dem dann die E mittels der PAS-Färbung

dargestellten Algenzellen zu finden sind (GRUNERT et al., 1996; HODGES et al., 1985; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977; TUZUKI, 1987). Wie die oft auftretenden, intermittierenden Erregerausscheider in betroffenen Herden vermuten lassen, bleiben die Erreger in diesen Granulomen und Mikroabszessen jedoch über lange Zeiträume vital und können nach einem Aufbrechen zu einem erneuten Ausflammen der Infektion führen (SCHICK und KUTZER, 1982). JENSEN et al. (1998) zeigten, dass Zellen von *P. zoophilus* intrazellulär in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten über längere Zeiträume vital bleiben. Die Autoren vermuten, dass die Algen sogar in der Lage waren, sich dort durch Endosporulation zu vermehren.

2.3.4 Diagnostik der Protothekenmastitis

Die Diagnostik der Protothekenmastitis erfolgt in der Routine durch den kulturellen Erregernachweis in der Milch (BERKHOF et al., 1982; SCHICK und KUTZER, 1982). Hierbei wird ein Aliquot der Milchprobe aufentsprechendeste Nährmedien ausgebracht und inkubiert. Als besonders geeignet erwiesen sich die meisten in der Pilzdiagnostik eingesetzten Kultivierungsmedien, wie Sabouraud-Glukose-Agar, Kimmig-Agar oder Kartoffel-Agar. Allesamt können diese zur Unterdrückung der bakteriellen Begleitflora noch mit Antibiotika versetzt werden (AALBAEK et al., 1998; POORE et al., 1987; SEFFNER, 1994; WILHELM et al., 1992). Zur Anzucht aus stark kontaminierten Proben eignen sich besonders das mit Antibiotika und Antimykotika versetzte selektiv-nährmedium nach PORE (1973).

Nach positivem Kulturmorphologischem Befund erfolgt in der Routinemäßigen Diagnostik stets die mikroskopische Begutachtung der verdächtigen Kolonien und entsprechender Ausstrichpräparate (AALBAEK et al., 1998; BERKHOF et al., 1982; SCHICK und KUTZER, 1982). Dabei kommen die verschiedensten, im folgenden kurz beschriebenen Methoden zum Einsatz:

Weit verbreitet ist die monochromatische Färbung von Nativpräparaten mit Methyleneblau oder Lactophenol-Baumwoll-Blau, bei der die Protothekenzellen als ovale bis runde, lichtbrechende, doppeltkonturierte Gebilde zu erkennen sind. Weitere Färbemethoden für Nativpräparate nutzen zum einen den Fluoreszenz-Farbstoff Fungiquale® (Fa. Ciba-Corning Diagnostics, Fernwald) und zum anderen eine spezielle morphologische Untersuchungen

an Pilzen und Prototheken entwickelte Färbelösung mit dem Namen "PHOL" (DEUTZ und KUTTIN, 1990; PALETAL, 1990) in pathohistologischer Präparatvorbiopsieproben lassen sich Prototheken mittels PAS- oder Gridley-Färbung sowie mit der Gomori-Silberimprägnation verlässlich darstellen, während sie sich mit Hämatoxylin-Eosin wenig oder gar nicht anfärben lassen (MULLER et al., 1993).

Für die schnelle Differenzierung der kulturell morphologisch sehr ähnlichen Prototheken- und *Candida*-Spezies stehen inzwischen ebenfalls mehrere Methoden zur Verfügung. Unter Nutzung der kommerziell erhältlichen Identifikationssysteme API20C[®] und RapID Yeast Plus[®] sind eine sichere Identifizierung von *P. zopfii*, *P. wickerhamii* und *P. stagnora* sowie die Abgrenzung von den Vertretern der Gattung *Candida* möglich (ESPINEL-INGROFF et al., 1998; PADHYE et al., 1979). Eine gute Differenzierung gelingt auch mit Ribostamycin (60 µg/Blättchen), wobei *Prototheca* spec. gehemmt werden und sich Arten der Gattung *Candida* als resistent erweisen (CASAL und GUTIERREZ, 1983a; CASAL und GUTIERREZ, 1986). Ein Aggregationstest als Schnellmethode zur Abgrenzung der Gattung *Prototheca* von verschiedenen Arten der Gattung *Candida* ist ebenfalls eingeführt (MÜLLER, 1988). Dabei wird das Kulturmaterial nach einer Vermischung mit einem Tropfen Leitungswasser, anschließendem Objektträgerausstrich und nachfolgender Trocknung makroskopisch oder mit der Lupe untersucht und anhand charakteristischer Differenzierungsmerkmale eingeordnet. So finden sich bei *Prototheca* spec. grobschollige Aggregationen mit relativ großen Zwischenräumen, bei Vertretern der Gattung *Candida* hingegen eine diffuse feinkörnige Verteilung in sehr kleinen Zwischenräumen. Innerhalb des Genus *Prototheca* lassen sich die beiden pathogenen Spezies durch die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Clotrimazol unterscheiden. *P. zopfii* gilt als resistent, wohingegen *P. wickerhamii* sensibel gegenüber diesem Antimykotikum reagiert (CASAL und GUTIERREZ, 1983b).

Bis heute wurde nur sporadisch versucht, eine serologische Diagnostik der Protothekenmastitis zu etablieren. Die bisher beschriebenen Testsysteme waren dabei nicht für die Routinediagnostik geeignet. DION (1982) wies anhand serologischer Untersuchungen an vier erkrankten Kühen erstmals die Induktion von spezifischen Antikörpern gegen Protothekennach. Dabei waren Antikörper sowohl im Serum als auch im Milchserum der infizierten Rinder nachweisbar. Es zeigte sich, dass Kühe, welche schon Monate vor der Trockenstehperiode infiziert worden waren, während des Trocknens ihren Abfall des Serum-Antikörperspiegels aufwiesen. Dies steig mit Beginn der Laktation wieder stark an,

was auf eine neue Aufflamme der Infektion hindeutete. Im Serum von Kälbern dieser
 Kühe waren nebenfallsspezifische Antikörper nachweisbar, die diese wahrscheinlich über das
 Kolostrum aufgenommen hatten. Der von DION (1982) eingeführte Immundiffusionstest ist
 aufgrund des hohen zeitlichen Aufwandes jedoch nicht für ein Routinediagnostikgeeignet.
 BLASCHKE-HELLMESSENETAL. (1987) fanden bei einem Blutserum-Screening von 260
 Rindern mittels Gegenstromelektrophorese bei 87,5 % der Kühe mit chronischer
 Protothekenmastitis, bei 36,4 % der Tiere mit subklinischer Mastitis, bei 42,6 % der
 Protothekenausscheider ohne Klinik und bei 2,5 % der Tiere ohne Erregernachweis
 spezifische Antikörper gegen *P. zopfii*. Bei Kühen aus gesunden, protothekenfreien Herden
 waren dagegen spezifische Antikörper nicht nachweisbar. Die Autoren sahen im
 Antikörpernachweis ein gutes Hilfsmittel zur Diagnose der klinischen und subklinischen
 Protothekenmastitis des Rindes. Ein Einsatz als alleiniges Routinediagnostikum war jedoch
 aufgrund der geringen Sensitivität und des relativ hohen technischen und materiellen
 Aufwandes der Gegenstromelektrophorese auch hier nicht möglich. Bei vergleichenden
 serologischen Untersuchungen mit Stämmen, die biochemisch und epidemiologisch den
 Varianten I, II und III von *P. zopfii* zuzuordnen waren, zeigte sich in der
 Gegenstromelektrophorese, dasses anders als bei Antigenen der Varianten I und II mit dem
 Serum infizierter Rinder zur Bildung von zahlenmäßig mehr und stärker ausgeprägten
 Präzipitationslinien gegenüber dem Antigen von Variante I kam (BLASCHKE-
 HELLMESSENETAL., 1987) JENSENETAL. (1998) testeten 6 Tiere mittels eines indirekten
 ELISAs auf *P. zopfii*-spezifische Serum-Antikörper des Immunglobulinisotyps G. Hierbei
 waren die höchsten Antikörperkonzentrationen bei infizierten Tieren feststellbar. Die
 Unterschiede zu nicht infizierten Tieren waren jedoch nicht signifikant und eine
 Diskriminierung infizierter Tiere war daher mit diesem Testsystem ebenfalls nicht möglich.

2.3.5 Therapie und Bekämpfung der Protothekenmastitis

Ungeachtet der zahlreichen Versuche einer Therapie, erwies sich die Protothekenmastitis des
 Rindes bisher als therapieresistent. Die Merzung der infizierten Tiere gilt daher als Mittel der
 Wahl zur Sanierung betroffener Rinderbestände (DEVARGAS ETAL., 1998; GRUNERT ETAL.,
 1996; SCHICK UND KUTZER, 1982; EFFNER, 1987; EFFNER, 1994).

Bei In-vitro-Untersuchungen erwies sich *Prototheca* spec. als empfindlich gegenüber
 Antimykotika, wie Nystatin, Ketokonazol und Amphotericin B, sowie für Antibiotika, wie

Tylosin und Oxytetracyclin. Aufgrund der starken Gewebereizung und durch die Mastitis hervorgerufenen pathomorphologischen Veränderungen waren Therapieversuche mit diesen Wirkstoffen in der Regel erfolglos (CASAL und GUTIERREZ, 1983a; LAMPEN und ARNOW, 1961; MATSUDA und MATSUMOTO, 1992; MCDONALD et al., 1984a; PERLMAN, 1964; SEGAL et al., 1976; SHAHAN und PORE, 1991). Zusätzlich sprechen die hohen Kosten einer solchen Therapie und die für einen ausreichenden Wirkstoffspiegel im Eutergewebe erforderlichen relativ großen Applikationsvolumina gegen derartige Therapiemaßnahmen (GEDEK und WEBER, 1978; MUGGLI, 1977).

BERGMANN (1993a) zeigte die gute intramammäre Euterverträglichkeit von Tetra- und Levamisolhydrochlorid-Präparationen bei Konzentrationen von 4% (vol/vol). Der daraufhin durchgeführte Therapieversuch bei einer experimentell infizierten Kuh mit jeweils 20 ml pro Viertel einer 4%igen Tetramisolhydrochlorid-Lösung brachte eine Reduktion der Algenzahl in der Milch und eine Verminderung der klinischen Symptome (BERGMANN, 1993a; BERGMANN, 1993b).

Bei In-vitro-Untersuchungen mit Lugolscher Lösung und Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Iod-Lösung konnte THIELE (1997) die Wirksamkeit dieser beiden Stoffe gegenüber *P. zoofii* nachweisen. Die für eine Abtötung der Erreger notwendigen Wirkstoffkonzentrationen von 0,5% (vol/vol) bei Lugolscher Lösung und 2,0% bei PVP-Iod-Lösung erwiesensich im Modell des isoliert perfundierten Rindereuters als gut verträglich, klinische Studien wurden aber nicht durchgeführt.

Auf der hohen Empfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber Iod-Lösungen basiert auch das Zitzentauchen mit iodhaltigen Mitteln nach dem Melkakt, welches als eine der wichtigsten Maßnahmen zur Bekämpfung der Protothekenmastitis angesehen wird (GRUNERT et al., 1996; SCHICK und KUTZER, 1982; SCHUSTER und SCHUSTER, 1982; SEFFNER, 1994). Weitere erprobte Bekämpfungsmaßnahmen sind die Merzung aller euterkranken Tiere mit positivem Protothekennachweis, die Abgrenzung latenter und intermittierender Prototheken-Ausscheider, eine algizid wirkende Keimdekontamination im Haltung- und Melkbereich und das Abstellen infektionsbegünstigender Faktoren (COSTA et al., 1996; SEFFNER, 1994). Als initiale Maßnahmen für eine erfolgreiche Sanierung werden zudem die schnelle Erfassung und Infizierung von Kühen, deren Euterung vom Rest des Bestandes isoliert werden muss, und die anschließende, möglichst schnelle Merzung dieser Tiere gefordert (DEVARGAS et al., 1998; JANOSI et al., 2001a; SCHICK und KUTZER, 1982; SCHUSTER und SCHUSTER, 1982).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Tier und Material

3.1.1 Versuchsbetriebe

Für die vorliegende Arbeit wurden kulturelle und serologische Untersuchungen in drei rinderhaltenden Betrieben aus den sächsischen Landkreisen Bautzen, Muldetalkreis und Sächsisch-Schweiz durchgeführt.

Der Bestandaus den Landkreis Bautzen (Betrieb A) gal als endemischer Protothekenbestand und wurde bereits seit mehreren Jahren speziell auf Prototheken hin untersucht. Im Rahmen der Sanierung wurden die kulturell positiven Tiere zu einer, y oder anderen Tiererräumlich isolierten Gruppe ("Protothekengruppe") zusammengestellt. Die se Gruppe sollte als positive Kontrollgruppe dienen. An den übrigen Kühen des Bestandes wurden die Untersuchungen zur Entwicklung und Evaluierung eines ELISA zur Identifizierung von mit *P.zopfii* infizierten Milchkühen sowie die Untersuchungen zur systemischen und lokalen Immunantwort durchgeführt.

Tabell 4 Bestandsdaten der untersuchten Betriebe

Charakteristika	Betrieb A	Betrieb B	Betrieb C
Untersuchte Tiere	85	ca. 300	14
Rasse	Schwarzbunt	Schwarzbunt	Rotbunt
-Kühe -Jungvieh	~1100 ~400	~360 ~100	~100 ~30
-Haltung -Entmistung	Boxenlaufstall, Spaltenboden	Boxenlaufstall, Schubentmistung	Boxenlaufstall, Schubentmistung
Weidegang	Nein	Nein	Ja
Zukauf	Nein	Nein	Nein

Im Bestand B (Muldetalkreis) erfolgte im Rahmen einer Bestandssanierung die Validierung der entwickelten ELISA-Systeme sowie die Untersuchung zur Kinetik der Erregerausscheidung. In diesem Betrieb kam es sechs Monate vor Beginn der Untersuchung zu einem starken Anstieg von therapieresistenten Euteren zündungen, dies in Anläßlicheiner

amtlichen Untersuchung als Protothekenmastitiden erwiesen. Als Ursache wurde die
Einstellung von etwa 100 Tieren aus mehreren anderen, seit einigen Jahren mit
Protothekenmastitis belasteten Ställen des gleichen Betriebes vermutet. Auch in diesem
Betrieb wurden die als positiv identifizierten Tiere innerhalb des Stalles vom Rest der Herde
räumlich getrennt.

Im Betrieb Clagen zum Untersuchungszeitpunkt keine positive kulturelle Nachweise von
P. zopfii durch die Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen
(LUA) Dresden vor. Tier dieser Betriebe sollten als negativ Kontrollgruppen dienen.
In allen drei Betrieben erfolgt routinemäßig eine Untersuchung aller auftretenden Mastitiden
sowie sämtlicher frisch abgekalbter Tiere am 5. Tag post partum.

3.1.2 Klinische Untersuchung

Anhand der erhobenen klinischen Befunde und der Zeitdauer der beobachteten
Veränderungen wurden die untersuchten Milchkühe den folgenden klinischen Gruppen
zugeteilt (ROESLER et al. 2001; SEFFNER, 1994):

Akute Mastitis

Kühen mit einer ballonartig vergrößerten Euterode Euterviertel. Die Milchmenge
war in allen Fällen stark vermindert. Sekretveränderungen konnten in Form von
quarkähnlich-schleimigen Flocken vorliegen. Die ersten klinische Symptome einer
Mastitis waren nicht älter als zwei Wochen, und es lag bei diesen Tieren kein früherer
positiver kultureller oder serologischer Protothekenbefund vor.

Chronische Mastitis

Diese Milchkühe wiesen ein induriertes, verkleinertes Euterviertel auf, welches
palpatorisch meist knotige Veränderungen erkennen ließ. Sekretveränderungen konnten in
Form von quarkähnlich-schleimigen Flocken vorliegen. Tiere mit atretischen
Eutervierteln wurden inkludiert, wenn ein Sekret ermelkbar war. Die ersten klinischen
Mastitisymptome waren bei diesen Kühen älter als zwei Wochen, und es lag bei diesen
Tieren bereits ein amtlicher positiver kultureller Protothekenbefund durch die
Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen (LUA) Dresden
vor.

Klinischgesund

Kühe ohne die oben aufgeführten klinischen Symptome sowie ohne andere Veränderungen, welche als klinische Zeichen einer Mastitis gewertet werden müssen, wie Ödematisierung, Rötung, erhöhte Schmerzhaftigkeit, Sekretveränderungen jeglicher Art oder ein positiver Befund beim Zitzenrollgriff. Bei diesen Milchkühen lag kein früherer positiver kultureller oder serologischer Prototothekenbefund vor.

3.1.3 Probenentnahme und -bearbeitung

Im Bestand A wurden im Herbst 1998 bei allen Tieren eine Blutentnahme durch Punktion der *Vena jugularis* durchgeführt. Drei Tage später folgte im Rahmen der amtlichen Milchkontrolle die Gewinnung von jeweils 2 Milchproben und 1 Serumprobe pro Tier. In Bestand C wurden ebenfalls Blut (*Venacoccygeamedia*) und korrespondierende Milchproben gewonnen. Dabei wurden die Tiere aus einer randomisierten Gruppe zufällig ausgewählt. Alle lactierenden Kühe des Bestandes B wurden im September 1999 nach Entnahme von jeweils einer Milchprobe untersucht. Eine Wiederholung dieser Untersuchung erfolgte im März sowie im September 2000.

Als Probengefäße dienten für die Milchprobenentnahme Glasröhrchen und für die Blutprobenentnahme Serum-Monovetten[®] (Fa. Sarstedt, Nümbrecht). Die erste Milchprobe der Tiere des Bestandes A wurde zum Landeskontrollverband Sachsen-V. nach Chemnitz gesandt und dort mittels eines automatisierten Zellsystems (Typ, Fossomatic 15600 Cell Counter[®], Fa. A.S.N Foss Elektrik, Hillerod, Dänemark) auf die Anzahl somatischer Zellen hin untersucht. Die anderen Proben wurden zur weiteren Untersuchung gekühlt ins Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig transportiert.

Hier erfolgte die Serumgewinnung durch Zentrifugation der geronnenen Blutproben für 10 Minuten bei 2500xg. Im Anschluß daran wurde das Blutserum als Überstand abpipettiert. Zur Gewinnung des Milchserums wurde ein Aliquot von 1 ml der Milchprobe mit 0,1 µU Labenzym (Rennin[®], Fa. Fluka, Seelze) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2500xg wurde die Probe zum Entrahmen über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und das Milchserum anschließend abpipettiert.

Die Aufbewahrung sämtlicher diagnostischer Seren erfolgte in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf Köln) bei 21°C.

3.1.4 Verwendete Stämme der Gattung *Prototheca*

Zur Charakterisierung eventueller Unterschiede innerhalb der Spezies *P. zopfii* sowie zur Ermittlung des für den ELISA geeigneten Protothekenstammes und der geeigneten Antigenpräparation wurden fünfzehn Feldisolatesowie Stammhaltungs- und Referenzstämme untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5 Übersicht der für die Untersuchungen verwendeten Protothekenstämme.

Bezeichnung	Herkunft	Spezies/Charakteristika
SAG263-4	Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen -Isolata aus einer humanen Enteropathie	<i>Pzopfii</i>
SAG263-8	Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen -Isolata aus dem Harzfluß eines Baumes	<i>Pzopfii</i>
SAG2021 (LZ-5)	Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig -Isolata aus dem Bestand A	<i>Pzopfii</i> Dieser Stamm wurde unter der Bezeichnung SAG 2021 in der Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen hinterlegt.
LIP	Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig -Isolata aus dem Bestand B	<i>Pzopfii</i>
RZI-1	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 28e) -Rinderstall	<i>Pzopfii</i> Variantel
RZI-2	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 30a) -Rinderstall	<i>Pzopfii</i> Variantel
RZI-3	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 33a) -Rinderstall	<i>Pzopfii</i> Variantel

Tabelle 5 Fortsetzung auf Seite 25

Tabell 6 Fortsetzung von Seite 24

Bezeichnung	Herkunft	Spezies/Charakteristika
RZII-1	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 10) -Rindermastitis	<i>Pzopfii</i> Variantell
RZII-2	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 113) -Rindermastitis	<i>Pzopfii</i> Variantell
RZII-3	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 114) -Rindermastitis	<i>Pzopfii</i> Variantell
RZIII-1	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer 11) -Schweinefaeces	<i>Pzopfii</i> Variantelll
RZIII-2	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 106) -humanes Isolat, Onychomykose	<i>Pzopfii</i> Variantelll
RZIII-3	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 154) -Schweine Stallinnenbereich	<i>Pzopfii</i> Variantelll
SAG263-11	Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen	<i>Pwickerhamii</i>
RW-1	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 1) -humanes Isolat, Dermatomykose	<i>Pwickerhamii</i>

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der im Verlauf einer natürlichen Infektion mit *P.zopfii* induzierten lokalen und systemischen Immunantwort bei der Protothekenmastitis des Rindes. Ergänzend hierzu wurden biochemische, serologische und genetische Variationen von *P.zopfii* untersucht. Da etwaige taxonomische Unterschiede bereits in der Vergangenheit vermutet worden waren, war deren Charakterisierung für die Wahl eines geeigneten diagnostischen Antigens in Grundvoraussetzung.

Zu Beginn der vorliegenden Studie wurde mittels biochemischer, serologischer und molekulargenetischer Verfahren eine Differenzierung innerhalb der Spezies *P. zopfii* vorgenommen. Damit wurde dann die Auswahl eines geeigneten Beschichtungsantigens für die Entwicklung der ELISA-Systeme möglich. Durch Immunoblot-Analyse erfolgte die Prüfung auf eine geeignete Präparationsweise für dieses Antigen. Auf dieser Basis wurden unspezifische und spezifische ELISAs entwickelt, welche anschließend auf ihre Eignung als Herdendiagnostikum hin überprüft wurden.

Infizierte Tiere des Bestandes A sowie nicht infizierte Tiere des protothekenfreien Bestandes C wurden in die Entwicklung von verschiedenen ELISA-Systemen für den Nachweis lokaler und systemischer Antikörper einbezogen. Anhand der Daten von 99 klinisch und kulturell den verschiedenen Infektionsstadien der Protothekeninfektion zugeordneten Kühen des Bestandes A erfolgten mittels der entwickelten ELISA-Systeme und durch Ermittlung der Zahl somatischer Zellen in der Milch die Charakterisierung der systemischen humoralen sowie der lokalen humoralen und zellulären Immunantwort.

Nachdem die drei verschiedenen ELISAs statistisch ausgewertet worden waren, erfolgte die Überprüfung der Praxistauglichkeit durch Untersuchung sämtlicher Kühe des Milchviehbestandes B. Hierzu wurde dreimal im Abstand von jeweils sechs Monaten jeweils eine Milchprobe pro Tier entnommen und anschließend kulturell und mittels der ELISA zum Nachweis von IgA und IgG im Milchserum untersucht. Ergänzend wurde im Anschluss an die erste Bestandsuntersuchung von je 25 infizierten und nicht infizierten Tieren des Bestandes B eine Kotprobe entnommen und kulturell auf Prototheken untersucht. Die Daten der über diesen Untersuchungszeitraum im Bestand B verbleibenden infizierten Tiere wurden mit dem Ziel der Charakterisierung des im Verlauf einer Infektion auftretender Erreger-Ausscheidung erfaßt und statistisch ausgewertet.

3.2.2 Anzucht und Isolierung des Erregers

Zur kulturellen Untersuchung der Milchproben wurden 50 µl-Aliquots im Doppelansatz auf Sabouraud-Glukose-Agar-Medium-Platten (Fa. Beckton-Dickinson, Sparks, USA) ausplattiert und bei 37 °C aerob inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte nach 48 und 72 Stunden. Makroskopisch verdächtige Kolonien wurden auf einem Objektträger ausgestrichen, mit Lactophenolblau (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt und mikroskopisch begutachtet. Beim Auftreten typischer Merkmale der Protothekenmorphologie, wie Sporangiosporen im Sporangium, erfolgte eine Protothekenzahlbestimmung durch Anlegen einer dekadischen logarithmischen Verdünnungsreihe mit anschließender Kultivierung im Doppelansatz. Bei sämtlichen Protothekenisolaten wurde anschließend eine Speziesbestimmung über die Bestimmung des C-Quellen-Assimilationsverhaltens durchgeführt. Dazu wurde OF-Medium (Fa. Beckton-Dickinson, Sparks, USA) mit Glukose, Galaktose, Trehalose oder Glycerol versetzt und 7 Tage bei 37 °C aerob inkubiert. Bei positiver Glukose- und Glycerolverwertung und gleichzeitig negativer Trehalose-Assimilation erfolgte eine taxonomische Zuordnung zu *P. zopfii*, bei positiver Trehalose-Assimilation zu *P. wickerhamii*.

3.2.3 Biochemische Differenzierung von Prototheken

Für die Wahl eines geeigneten ELISA-Coating-Antigens und zur Untersuchung des Vorkommens verschiedener Varianten von *P. zopfii* erfolgte die biochemische Differenzierung der in Tabelle 5 aufgeführten Stämme. Über auxanographische Untersuchungen des Assimilationsverhaltens mit zusätzlicher mikroskopischer Beurteilung der Zellmorphologie sowie durch Prüfung des Assimilationsverhaltens mittels des kommerziell erhältlichen Test-Kits BBL Crystal[®] (Fa. Beckton-Dickinson, Sparks, USA) wurden die Isolate charakterisiert:

Zuerst wurde ein Milliliter einer auf die Keimzahl von 1×10^6 /ml eingestellten Suspension der betreffenden Stämme auf PIM-Agar-Platten (ohne weitere Kohlenstoff-Quelle) ausgespatelt. Dann wurden zur auxanographischen Untersuchung in jede Platte vier Vertiefungen gestanzt und in je einer Vertiefung jeweils 10 µl einer 5%igen (w/vol) Glycerol-, Glukose- und

Galaktose-Lösung pipettiert. Als Kontrolle dienten in der vierten Vertiefung 10 µl Ringer-Lösung. Die Platten wurden im Inkubator für 72 h bei 37 °C inkubiert und nach 24, 48 und 72 h auf Wachstumszone hin untersucht (BLASCHKE-HELLMESSEN et al. 1985a).

Als zweite Methode wurde die Verwertung von 50 verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen mittels des kommerziell erhältlichen Mikroorganismen-Identifikationssystems BBL-Crystal™ (Fa. Beckton-Dickinson, Sparks, USA) überprüft. Je Stamm wurde jeweils ein Testkit BBL-Crystal™ E/NF und ein Testkit BBL-Crystal™ GP beimpft. Diese Testsysteme wurden zum einen für die Identifikation von Enterobacteriaceen und nicht fermentierenden gram-negativen Bakterien (BBL-Crystal™ E/NF) und zum anderen zur phänotypischen Zuordnung gram-positiver Bakterien (BBL-Crystal™ GP) entwickelt. Die Inkubation der Proben erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C. Die Beurteilung der Reaktionen erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden.

3.2.4 Speziesidentifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.4.1 Präparation von genomischer DNA

Die fraglichen Algenstämme wurden auf Sabouraud-Glukose-Agar-Platten für 48 h bei 37 °C aerob inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Glasstab abgehebert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels Mörser und Pistil zu Pulver zerrieben. 30 mg des entstandenen Pulvers wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl vorgewärmtem (65 °C) CTAB-Puffer (2% CTAB [w/vol]; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl; 1% PVF [w/vol]; 100 mM Tris pH 8.0) versetzt. Diese Mischung wurde dann 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe eines gleich großen Volumens eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1, vol/vol) und gründlichem Mischen wurde der Ansatz zentrifugiert (5000 × g, 5 min, 4 °C) und der Überstand anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde 1/5 Volumen einer 5% iger CTAB-Lösung (5% CTAB, 0.7 M NaCl) zugegeben und nach gründlichem Mischen ebenfalls zentrifugiert. Durch Zugabe von 2 Volumen eisgekühltem Ethanol (96 % ig) zum Überstand, erfolgte die Präzipitation der darin enthaltenen genomischen DNA. Diese wurden durch Zentrifugation (15.000 × g, 30 min, 4 °C) pelletiert. Die Pellets wurden im Vakuum getrocknet (Typ

„Univapo 100H“, Fa. UniEquip, Martinsried) und für den weiteren
pyrogenfreien H_2O resuspendiert.

n Gebrauch in 20 μ l

3.2.4. Genetischer Vergleich mittels 18S rDNA-Analyse

Die *P. zopfii*-Stämme SAG263-4 und SAG2021 wurden durch Sequenzanalyse der 18S rDNA miteinander verglichen. Dieser Test sollte gleichzeitig der eindeutigen Spezieszuordnung beider Stämme dienen, da dies bisher weder für den Stamm SAG263-4 mittels genetischer Analyse durchgeführt worden war. Darüber hinaus wurde auch die 18S rDNA der Isolate RZI-3, RZI II-3, SAG263-8 und LIP durch partielle Sequenzanalyse untereinander verglichen, um etwaige genetische Unterschiede zwischen den einzelnen Varietäten erfassen zu können.

Die genomische Gesamt-DNA der Stämme wurde wie unter Punkt 3.2.4.1 beschrieben präpariert. Für die Amplifikation der 18S rDNA wurde anhand der bekannten Sequenz der 18S rDNA von *P. wickerhamii* (GenBank, Acc. Nr. X56099) das Primer-Paar „wicker-18f“ (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') und „wicker-18r“ (5'-TAGTCCTTCTGCAGGTTACC-3') hergestellt (Fa. VBC-Genomics, Wien, Österreich). Die PCR-Amplifikation wurde mit 1U *Taq*-DNA-Polymerase, 1µg genomischer DNA, 1µmol jedes Primers und 200µM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat in einem „Geneamp-2400“[®] Thermocycler (Fa. Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA) durchgeführt. Die Zyklus-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 80s Denaturierung bei 94°C, 90s Extension bei 72°C. Die Annealing-Bedingungen für die Amplifikation wurden entsprechend des Guanin/Cytosin-Gehaltes der eingesetzten Oligonukleotide gewählt und lagen bei 54°C und 50 Sekunden. Der Nachweis des Amplifikates erfolgte durch Elektrophorese in einem 1%igen (w/vol) Agarose-Gel und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid. Die Reinigung des PCR-Produktes erfolgte mittels des PCR-Purification-Kits[™] (Fa. Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). Es folgte die Sequenzierung des PCR-Fragmentes unter Verwendung des internen Primers wicker-18S-fseq1 (5'-TGCCAGTAGTCATATGCTTGT-3'). Die Ermittlung der Nukleotid-Sequenz erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von (ANGERetal. (1977) und wurde mit einem LI-COR DNA-Sequenzierer, Model 4000[®] im Auftrag durchgeführt (Fa. VBC-Genomics, Wien, Österreich). Die Sequenz wurde schließlich mit Hilfe der Computersoftware Wisconsin (Version 8.1 UNIX[®]) bestimmt.

3.2.5 Bestimmung von Wachstumskurven

Als weiteres Kriterium für die Entscheidung über den als An- tigen zu verwendenden Protothekenstamm wurde die Vermehrungsaktivität der zu verglei- ichenden Algenstämme herangezogen. Hierzu wurden von den Stämmen SAG 202 und SAG 263-4 Vorkulturen in Sabouraud-Glukose-Bouillon beimpft und 24 h bei 37°C aerob als Standkultur inkubiert. Je im dieser Vorkultur wurde dann in 100 ml vorinkubier- te Sabouraud-Glukose-Bouillon verimpft. Die Bebrütung erfolgt ebenfalls bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Abstand von 3 h wurde über 3 h hinweg im 100 ml Kulturentnom- men und der Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm mit einem Spektrum-Photom- eter (Typ, Lambda Bio [®], Fa. Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA) gemessen. Die ermittelten Extinktionen wurden mit der

3.2.6 Herstellung der Hyperimmunseren

Dinnerhalb der Spezies *P. zopfii* äußere morphologischen und biochemischen Unterschieden auch serologische Unterschiede vermutet werden können (BL ASCHKE-HELLMESSE Net al., 1987), solltendiese bei der Wahl des für eine Spezies -spezifischen ELISA nutzbaren Antigens auf ihre Spezifität und Kreuzreaktionen hin unters- ucht werden. Dazu wurden pro Isolat jeweils zwei Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ (LM 2,5 kg) mit den folgenden Protothekenstämmen immunisiert: SAG 2021, SAG 263-2, SAG 263-4, SAG 263-11, RZI-3 und RZIII-3. Diese Stämme wurden hier- für in Sabouraud-Glukose-Bouillon für 72 h bei 37°C aerob kultiviert, nach Ze- ntrifugation (2500 xg) 3 mal mit Ringer-Lösung gewaschen und anschließend nach Zählung in einer Zellzählkammer nach Thoma auf die nach dem Immunisierungsschema erforderliche Gesamtke- imzahl eingestellt. Die erste Immunisierung der Kaninchen erfolgte durch intrade- rmale Injektion von jeweils 1×10^7 Algenzellen. Hierzu wurde mittels inkomplettem Freund'sche- n Adjuvans (Fa. Sigma, Deisenhofen) eine Wasser-in-Öl-Emulsion (500 µl Algensuspe- nsion/500 µl Freund'sches Adjuvans) hergestellt. Zum Boost wurde unter Verzicht auf F- Freund'sches Adjuvans die gleiche Antigenmenge als Suspension in Ringer-Lösung im Abs- tand von je 2 Wochen weitere 3 mal intravenös appliziert. Mit dem Pr- iming beginnend, erfolgte im 1. und 2. und 3. Wochenabstand bei jedem Tier eine Blutprobenentnahme aus der Ohr- randvene mit

anschließender Präparation des Blutserums. Die Gewinnung der
eine Woche nach der letzten Applikation unter Allgemeinan-
50 mg/kg Ketamin i.m. durch Ausbluten der Tiere mittels

rHyperimmunerenerfolgte
ästhesie (1 mg/kg Xylazin mit
rakardialen Blutentzug.

3.2.7 Gel-Elektrophorese

Zur Abklärung spezies- und stammspezifischer Unterschiede im
und zur Ermittlung einer geeigneten Antigenpräparation für den
wurden Präparationen der verschiedenen Protothekenisolate
aufgetrennt und anschließend in Immuno-Blot untersucht:

Protein- und Antigenmuster
entwickelnden ELISA
(Tab. 5) elektrophoretisch

Für die Gel-Elektrophorese wurde die Mini-Protean II
Kombination mit dem Netzgerät Powerpack 200

®-Elektrophoreseapparatur in
(Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

verwendet. Zunächst wurden Trenngel und Sammelgel hergestellt
gefüllte Elektrophorese-Kammer eingebaut. Die chemische Z
verwendeter Gels sowie der anderen in unseren Untersuchun-

und in dem Laufpuffer
zusammensetzung der
genverwendeten Komponenten,
iert aufgelistet.

Zur Antigenpräparation wurden je 50 mg der Kulturen nach 48 h

ober Inkubation bei 37

°C auf Sabouraud-Glukose-Agar-Platten mittels eines Glasst
anschließend in 500 µl doppelt deionisiertem Wasser (ddH

abes abgehebert und
resuspendiert. Es folgte ein

fünfmaliger Wechsel von Einfrieren und Auftauen in flüssige
Zentrifugation bei 15000 xg für 5 min, folgte es gekühlt für 30 mi

in Stickstoff. Nach
neine Behandlung im

Ultraschallbad (Typ, Sonorex RK 103 H, Fa. Bendelin, Ber

lin) bei einer Leistung von 320

Wundeiner Frequenz von 35 KHz. Anschließend wurden die Antigen suspens

ionen über

Nacht in Dialyseschlauch (ZelluTrans[®], Molekulare Ausschlussgrenze 8.000-10.000 Dalton,
Fa. Roth, Karlsruhe) in ddH₂O dialysiert.

Zur Ermittlung einer geeigneten Antigenpräparation wurde zusätz
Zentrifugation bei 5000 xg der Überstand abgenommen und ein
verbliebenen Algenpellets mit Proteinase K (Aktivität >40 mAnson U/mg, 1 mg prog

zlich nach erneuter
zymatischer Verdau des

Algenfeuchtmasse) bei 37 °C für 1 h Stunde durchgeführt. Der vo

rher abgenommene

Überstand wurde im Vakuumverdampfer (Typ, Univap 100 H, Fa. Un

iEquip, Martinsried)

zu Pulver getrocknet. Auf einen Proteinase K-Verdau wurde be

iden Untersuchungen zur

Bestimmung von Unterschieden im Protein- und Antigenmuster

verzichtet. Sowohl der

getrocknete Überstand wie auch das verbliebene Pellet wurden anschließend in 100 µl des glycerolhaltigen Probenpuffers resuspendiert und 5 min in kochenden Wasserbad erhitzt. Ein Molekulargewichtsstandard (Fa. Biozym, Oldendorf) wurde jeweils gemeinsam mit den Proben erhitzt. Nachdem Kochen folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000 xg. Vom Überstand wurden nun mit einer Pipette vorsichtig 15 µl je Probe in die Taschen des Sammelgels überführt (LAEMMLI, 1970).

Nach dem Anlegen einer konstanten Spannung von 180 V betrug die Laufzeit der Elektrophorese ungefähr 1 h. Anschließend erfolgten der Ausbau des Gels aus der Elektrophorese-Apparatur und die Überführung in die Protein-Färbelösung.

3.2.8 Färbung der Polyacrylamid-Gele

Zur Darstellung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde eine Protein-Färbung mit Coomassie[®]-Brillantblau (Fa. Serva, Heidelberg) vorgenommen. Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese in eine Schale mit Färbelösung überführt und hierfür für 30 min bei Zimmertemperatur gefärbt. Anschließend wurde das Gel in vier Arbeitsschritten für jeweils 15 min in jeweils frischer Entfärbelösung inkubiert, um ungebundene Farbpigmente zu entfernen. Die Proteinbestandteile der aufgetragenen Proben waren nun als blaue Banden zu erkennen, und somit in visueller und software-gestützter Dokumentation und Auswertung zugänglich.

3.2.9 Immuno-Blot

Nach Auftrennung der Antigenpräparationen der verschiedenen Proteototheken-Isolate in der SDS-Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose- (ECL-Hybond[®], Fa. Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) oder PVDF-Membran (Westran[®], Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) mit einer Porengröße von 0,45 µm. Dies geschah bei 10 Volt über 30 min in einer Blottingapparatur (Typ., TransBlot-Semidry[®], Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) unter Anwendung des halb-trockenen Verfahrens bei welchem die Filterpapiermembranen mit Transferpuffer getränkt werden.

Die Blockierung der unspezifischen und der noch freien Antikörper-Bindungsstellen der Membran erfolgte mit einem synthetischen Blocking-Puffer (RotiBlock[®], Fa. Carl Roth, Karlsruhe). Die Membran wurde nachfolgend für 2 h bei 37 °C in einem Hybridisierungssofen (Fa. Amersham Pharmacia) inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 30 min in PBS-T gewaschen, wobei der Puffer viermal gewechselt wurde. Es folgte die Inkubation der Membran für 1 h mit dem jeweiligen Kaninchen-Hyperimmunserum oder mit Rinder-Konvaleszentenseren, in der für den jeweiligen Algenstamm eigens ermittelten Verdünnung von 1:500 bis 1:2000 (SAMBROCK et al., 2000). Nach erneuter Waschung erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C mit dem jeweiligen, Meerrettich-peroxidase-konjugierten, affinitätschromatographisch gereinigten, sekundären Antikörper: Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, Ziege-Anti-Rind-IgA oder Ziege-Anti-Rind-IgG (Fa. Bethy Laboratories Inc., Montgomery, USA). Die Detektion der Antigen/Antikörper-(Ag/Ak)-Komplexe erfolgte nach erneuter viermaligem Waschen unter Verwendung zweier unterschiedlicher Methoden. Die Bestimmung der für den ELISA geeigneten Antigenpräparation erfolgte kolorimetrisch mittels des auf dem Chromogen Aminoethylkarbazol basierenden VIP[®]-Kits (Fa. Vektor Laboratories Inc., Burlingame, USA) und die vergleichende serologische Untersuchung der Varianten von *P. zopfii* wurde über ein Chemilumineszenzverfahren unter Verwendung des ECL[®]-Detektionskits (Fa. Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) durchgeführt. Die Detektion mittels des VIP-Kitserfolgte indem die Membran zuerst in 20 ml ddH₂O überführt wurde. Im Anschluß wurden 5 Tropfen der gebrauchsfertigen Chromogenlösung zugegeben. Durch die anschließende Zugabe von 3 Tropfen 5% iger H₂O₂-Lösung wurde die Farbreaktion initialisiert. Unter visueller Kontrolle erfolgte und die Entwicklung des Immunoblots bis deutliche spezifische Bandersichtbar waren. Zum Beenden der Reaktion wurde die Membran in 100 ml frisches ddH₂O überführt und geschwenkt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Die Detektion der Ag-Ak-Komplexe mittels des ECL[®]-Detektionskits erfolgte in der Dunkelkammer. Hierzu wurden je 3 ml der Substrat-Lösung und der Verstärker-Lösung vermischt. Im Anschluß wurde die Membran mit diesem Gemisch überschichtet. Nach 1 min wurde die Detektionslösung zügig entfernt, und die Membran wurde unverzüglich in ein mit einem speziellen Film (Hyperfilm-ECL[®], Fa. Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) versehene Fotokassette überführt. Die Belichtungszeit wurde je nach durchgeführtem Immunoblot zwischen 10 sec und 5 min variiert. Abschließend erfolgte die Entwicklung des Filmes in vollautomatischer Filmentwickler (Typ, Curix[®], Fa. AGFA Leverkusen).

3.2.1 Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Als serologisches Testsystem wurde ein indirekter ELISA, modifiziert nach HENSEL et al. (1994) entwickelt. Dazu wurden 24h-Kulturen von *S. abortus*-Glukose-Agar-Platten, die bei 37°C inkubiert worden waren, mit 4ml Beschichtungspuffer von der Platte abgeschwemmt und die Suspension nach Bestimmung der Gesamtkeimzahl auf 1×10^7 Protothekenzellen/ml eingestellt. Davon wurden je 100µl pro Well in 96-Well-Mikrotiterplatten (Maxisorp[®], Fa. Nun Ltd., Roskilde, Dänemark) einpipettiert, und die mit Folie versiegelten Platten wurden anschließend auf dem Horizontal-Schüttler (Typ RCT[®], Fa. Ika, Stauffen) mit 300 U/min für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät (Typ „Ultrawash II“[®], Fa. Dynatech Medical Products Ltd., Guernsey, UK) viermal mit je 300µl Waschpuffer gewaschen, dann kräftig auf Zellstoff ausgeklopft und bei Raumluft getrocknet. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurde in jedes Well 100µl Blockierungspuffer einpipettiert und die Platten an der Rüttler inkubiert. Im Anschluß wurden die Platten abermals viermal gewaschen, ausgeklopft und getrocknet. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Platten dann bei -21°C aufbewahrt.

Die Durchführung des ELISA erfolgte entsprechend der Positiv-Referenz-Standardmethode nach BUTLER et al. (1978). Als positives Referenzserum dient ein Serum-Pool von 15 Tieren mit chronischer Protothekenmastitis aus dem Bestand A, die durch kulturellen Erregernachweis identifiziert werden konnten. Als Negativkontrollen dient der Serum-Pool der klinisch und kulturell negativen Tiere des Bestandes D. Die Ausgangsverdünnungen der jeweiligen Seren und Konjugate sind in Tabelle 9 aufgelistet.

In Reihe A der Mikrotiterplatte wurden alle Reagenzien mit Ausnahme der Kontroll- und Probeseren einpipettiert. Sie dienten dem Leertest für die Messungen. In Reihe B wurde in Spalte 1 das positive Kontrollserum, in Spalte 2 das negative Kontrollserum und in die Spalten 3 bis 12 die zu testenden Seren mit der Menge von 100µl gegeben. Alle Seren wurden vor ihrem Einsatz auf die in Tabelle 9 aufgelistete Verdünnungsstufe eingestellt. Anschließend wurde mit einer 12-Kanalpipette eine geometrische Verdünnungsreihe bis zur Reihe H pipettiert, so dass in dieser eine Verdünnung von $1:6800$ vorlag. Darauf folgende Inkubation erfolgte auf dem Rüttler bei 37°C für 30 min. Es folgte ein viermaliger Waschschrift mit PBS. Im Anschluß wurden folgende, affinitätsgereinigte, polyvalente, monospezifische, peroxidasekonjugierte Hyperimmunseren als sekundäre Antikörper

eingesetzt: Ziege-Anti-Rind IgG (h-l), Ziege-Anti-Rind IgG₁, Ziege-Anti-Rind IgA und Ziege-anti-Rind IgM (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). Die für die jeweilige Probenart und die entsprechenden Konjugate beste Gebrauchskonzentration wurde übereinstimmend in einer „Checkerboard“-Konjugatauswertung (engl. Checkerboard = Schachbrett) ermittelt und in PBS-Tween20[®] 0,05% ig (vol/vol) verdünnt zu je 100 µl in jedes Wellenplatte. Es folgte die 30-minütige Inkubation bei 37°C auf dem Rüttler sowie ein Waschschriff mit PBS-Tween20[®]. Zum Entwickeln der Platten wurde in jedes Wellenplatte peroxidhaltige Substratlösung pipettiert und die Reaktion nach 5 min Inkubation in ELISA-Reader automatisch abgelesen. Die Messung erfolgte durch ein computergesteuertes Photometer (Typ „Multiscan MCC-340“[®], Fa. FlowLab Inc., McLean, USA) bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 410 nm.

Die erhobenen Daten wurden mit einem eigens zur ELISA-Auswertung entwickelten Computer-Programm (PAAR et al., 1989) berechnet und die Antikörperaktivitäten in ELISA-Units (EU) angegeben. Zur Bestimmung einer Kalibriergeraden wurde eine lineare Regressionsanalyse der „geblankten“ (gegen den Leerwert korrigiert) und „log-log“-transformierten OD-Werte des positiven Kontrollserums berechnet. Dem positiven Serum wurde eine Antikörperaktivität von 100 EU zugeordnet. Im Vergleich hierzu wurden die Aktivitäten aller diagnostischen Seren nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität}_{\text{Probe}} = \frac{\text{Aktivität}_{\text{Standard}} \cdot \text{Verdünnung}_{\text{Probe}}}{10^{\left(\frac{\log(\text{OD}_{\text{Probe}}) - \text{Achsenabschnitt}_{\text{Standard}}}{\text{Steigung}_{\text{Standard}}} \right)}}$$

Sofern sie in den linearen Bereich der Titrationskurve des positiven Standards lagen, wurden die ELISA-Aktivitäten des diagnostischen Serums getrennt für jede einzelne Serumverdünnung berechnet. Das arithmetische Mittel dieser Werte ergab dann die Aktivität des Testserums in EU.

3.2.1 Statistische Auswertung

Anhand sämtlicher serologischer Untersuchungsergebnisse der ELISAs erfolgte die Berechnung der Schwellenwerte (Cutoff-Wert) für ein positives Testergebnis zur Diagnostik der Infektion mit *P.zopfii*. Hierfür wurde aus den ELISA-Aktivitäten aller kulturell negativ getesteten Tiere aus den Beständen A und C der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Der Cutoff-Wert für ein positives Ergebnis errechnet sich aus der Summe des arithmetischen Mittels und der dreifachen Standardabweichung dieser kulturell negativen Tiere.

Um eine Aussage über die diagnostische Eignung der einzelnen ELISAs treffen zu können, wurden die einzelnen isotypspezifischen Tests mittels der Vierfeldertafel (Tabelle 6) charakterisiert. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Sensitivität $[a/(a+c)]$, Spezifität $[d/(b+d)]$, des positiven $[a/(a+b)]$ und negativen $[d/(c+d)]$ prädiktiven Wertes sowie der Prävalenz $[(a+c)/N]$, scheinbaren Prävalenz $[(a+b)/N]$ und Inzidenz $[(a+c)/N]$ pro Zeiteinheit [TYLER und CULLOR, 1989].

Tabelle 6 Prinzip der Vierfeldertafel zur Evaluierung von Testsystemen am Beispiel des Prototheken-ELISA.

		<u>Referenztest (hier Kultureller Befund)</u>		Summe
		Positiv	Negativ	
<u>Testergebnis des ELISA</u>	Positiv	a	b	a+b
	Negativ	c	d	c+d
Summe		a+c	b+d	N=a+b+c+d

Die Aktivität der isotypspezifischen Antikörper wurde in Abhängigkeit vom jeweiligen Infektionsstatus der Tiere durch sogenannte „Notch-Boxen“ (engl. notch=Keil), einer graphischen Darstellungsform aus der deskriptiven Datenanalyse visualisiert. Hierbei erfolgt die Abbildung des Median, des unteren und oberen Quartils (schraffierte Begrenzung der Figur), der 95% Konfidenzgrenze (horizontale Begrenzung des Keils) sowie der Extremwerte (MCGILL, 1978).

Die Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Antikörperaktivitäten von nicht infizierten Kühen und von Kühen mit unterschiedlichen klinischen Stadien der Protothekeninfektion erfolgte mittels des Student's *t*-Tests und des Tests nach Welch. Hierbei wurde eine Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ festgelegt.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der lokalen und systemischen Antikörperantwort von der Anzahl der mit der Milch ausgeschiedenen Erreger sowie von der Zahl der in der Milch vorhandenen somatischen Zellen, erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen diesen Größen unter Anwendung der Spearman-Korrelation mit einseitiger Signifikanzgrenze mittels des Statistik-Programms SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA).

4 ERGEBNISSE

4.1 Vergleich verschiedener Isolate von *P.zopfii*

4.1.1 Auxanographischer Vergleich der C-Quellen-Assimilation

Dabei bereits von BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) und BAUMANN & MÜLLER (1997) verschiedene Varianten bei *P.zopfii* postuliert worden sind, mußte bei der Auswahl des für die Diagnostik geeigneten ELISA-Antigens eine mögliche phänotypische Vielfalt berücksichtigt werden. Hierzu wurde als erster ein Vergleich des Assimilationsmusters der verschiedenen Algenisolate (Tabelle 5) vorgenommen. Dieser folgte durch Auxanographie und mittels des kommerziellen Identifikationssystems BBL-Crystal™. Zusätzlich zu den in Tabelle 5 aufgelisteten Stämmen wurden auch noch 8 Feldisolate aus klinischen Rindermastitiden aus den Landesuntersuchungsämtern Leipzig (LA 1 bis 3), Dresden (DA 1 bis 3) und Chemnitz (CA 1 und CB 1) in diese Untersuchungen einbezogen. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, weisen alle getesteten Stämme eine starke Glukose-Assimilation auf. Auffällig ist, dass alle der Variante III zugeschriebenen Isolate (RZIII-1 bis 3) nicht in der Lage waren, Glycerol zu assimilieren. Diese Kohlenstoff-Quelle konnte von allen anderen Stämmen sehr gut verwertet werden. Die Beurteilung der Galaktoseverwertung nach 24, 48 und 72 Stunden zeigt ein wenig einheitliches Bild. Die Stämme der Varianten I (RZI-1 bis 3) und II sowie der Referenzstamm SAG 263-8 wiesen schon nach 24 h ein deutliches Wachstum auf, während bei den Referenzstämmen SAG 263-4 und SAG 2021 sowie bei allen Mastitisisolaten erst nach 72 Stunden ein geringes Kulturwachstum zu beobachten war. Der von BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) beschriebene Wachstumszonenring bei Variante II (RZII-1 bis 3) ist bei dem Stamm RZII-2 sowie bei SAG 263-4 und bei den 8 getesteten Mastitisisolaten zu beobachten. Vergleich mit den Stämmen der Varianten I und II wird damit ein insgesamt schlechteres Galaktoseverwertungsverhalten der Mastitisisolate deutlich. Die von BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) beobachteten auxanographischen Unterschiede zwischen Isolaten aus Schweinehaltungen, aus Rinderhaltungen und solchen aus Rindermastitiden können somit auch für die in dieser Studie untersuchten Stämme bestätigt werden. Dabei verhalten sich die Referenzstämme SAG 263-4 und SAG 2021 bis auf die unterschiedliche Ausbildung des inneren Wachstumszonenrings bei der Galaktoseassimilation gleich.

Tabelle 7. Vergleich der C-Quellen-Assimilation verschiedener Stämme von *P.zopfii* mittels Auxanographie.

Stamm	Herkunft	Glukose nach 72h	Glycerol nach 72h	Galaktose nach			Wachstumszone bei Galaktose in Ringform
				24h	48h	72h	
SAG263-4	Mensch	+++	+++	-	(+)	+	+
SAG263-8	Umwelt	+++	-	+	++	++	-
SAG2021	Mastitis	+++	+++	-	-	+	-
RZI-1	Rinderstall	+++	+++	(+)	++	+++	-
RZI-2	Rinderstall	+++	+++	+	++	+++	-
RZI-3	Rinderstall	+++	+++	+	++	+++	-
RZII-1	Rindermastitis	+++	+++	-	-	(+)	-
RZII-2	Rindermastitis	+++	+++	-	(+)	+	+
RZII-3	Rindermastitis	+++	+++	-	(+)	(+)	-
RZIII-1	Schweinestall	+++	-	(+)	+	++	-
RZIII-2	Schweinestall	+++	-	(+)	++	++	-
RZIII-3	Mensch	+++	-	(+)	++	+++	-
LIP	Rindermastitis	+++	+++	-	-	(+)	-
LA1	Rindermastitis	+++	+++	-	(+)	+	+
LA2	Rindermastitis	+++	+++	-	(+)	+	+
LA3	Rindermastitis	+++	+++	-	-	+	+
DA1	Rindermastitis	+++	+++	-	-	+	-
DA2	Rindermastitis	+++	+++	-	-	+	+
DA3	Rindermastitis	+++	+++	-	(+)	(+)	+
CA1	Rindermastitis	+++	+++	-	-	(+)	+
CB1	Rindermastitis	+++	+++	-	(+)	(+)	-

Wachstumsintensitäten = kein Wachstum (-) = zweifelhaft, = schwach, + = mäßig, ++ = stark

4.1.2 Vergleich der Isolate mittels des Identifikationssystems mBBL-Crystal™

Die Überprüfung des Assimilationsverhaltens der verschiedenen Stämme auf der Basis von 50 unterschiedlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen hatte zum Ziel, mögliche Varianten (Biotypen) von *P.zopfii* zu finden.

Tabelle 8. Assimilationsverhalten unterschiedlicher C- und N-Quellen bei verschiedenenVariantenvon *Pzopfii* sowiebei *Pwickerhamii* .

Stamm	Spezies/Variante	PRO	TRE	GLR	GAL	FGS	INO	TTC	FTR	FVA	ARG	LYS
RZI-1	Variante I	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.
RZI-2	Variante I	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.
RZI-3	Variante I	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.
RZII-1	Variante II	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
RZII-2	Variante II	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
RZII-3	Variante II	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.
RZIII-1	Variante III	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
RZIII-2	Variante III	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
RZIII-3	Variante III	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.						
SAG263-4	Variante III	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.
SAG263-8	Variante III	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.
SAG2021	Variante III	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
LIP	Variante III	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
CA1	Variante III	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.
DA1	Variante III	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
LA1	Variante III	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
SAG263-11	<i>P.wickerhamii</i>	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
RW-1	<i>P.wickerhamii</i>	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.

pos.=Verwertung;neg.=keineVerwertung

PRO=Propanol, TRE=Trehalose, GLR=Glycerol, GAL= Galaktose, FTR=Tryptophan, FGS = Glukosid, FAR = Arginin, FVA = Valin, INO = Ino sitol, TTC = Tetrazolium, ARG=Arginin,LYS=Lysin

Aus **Tabelle 8** wird ersichtlich, dass sich die Isolate der Variante III sehr deutlich von den Referenzstämmen, von den Stämmen aus Rinderhaltungen sowie von den Rindermastitisisolaten unterscheiden (sämtliche Reaktionen im Detail siehe Anhang, **Tabelle 32 und 33**). Neben der fehlenden Glycerolverwertung fehlt ihnen auch die Fähigkeit, die Aminosäuren Arginin, Valin und Lysin für ihr Wachstum zu nutzen. Bei den klinischen Mastitisisolaten sowie beim humanen Darmisolat SAG263-4 ist außerdem die verzögerte Assimilation von Galaktose vor allem die Assimilation von Lysin das Hauptunterscheidungsmerkmal gegenüber den Isolaten der Variante I, welche aus dem Stallbereich von Rinderhaltungen isoliert werden konnten. Dieses Ergebnis bestätigt das Vorkommen von tierart- und mastitisassoziierten Biotypen bei *P.zopfii*. Weiterhin gibt es auch innerhalb der Gruppe der Mastitisisolate einige Unterschiede hinsichtlich der enzymatischen Verwertung der C- und N-Quellen. So fällt insbesondere die Verwertung von Glukosid und Tetrazolium sehr heterogen aus. Der Referenzstamm SAG 2021 zeigt verglichen mit Referenzstamm SAG263-4 ebenfalls eine höhere Enzymaktivität, obwohl

beide in der Lage sind, Lysin zu nutzen und deshalb der Variante II zugeordnet werden. Referenzstamm SAG263-4 dagegen kann biochemisch eindeutig identifiziert werden.

nt II zugeordnet wurden. Variante II zugeordnet

4.1.3 Vergleich der Vermehrungsintensitäten

Die Vermehrungsintensität der Referenzstämme SAG263-4 und SAG2021 wurde nach dem Erstellen von Wachstumskurven miteinander verglichen. (Abbildung 1) ist ersichtlich, dass beide Referenzstämme in Sabouraud-Glukose-Bouillon bei 37°C praktisch gleiche Vermehrungsraten aufweisen. Dabei zeigt sich, dass die Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase), wahrscheinlich aufgrund des langsamen Freisetzens der Tochterzellen aus den Sporangiumzeitlich sehr langgezogen ist.

dSAG2021 wurde nach Aus diesen Wachstumskurven aud-Glukose-Bouillon bei eigtsich, dass die Phase des grunddes langsamen Freisetzens ogenist.

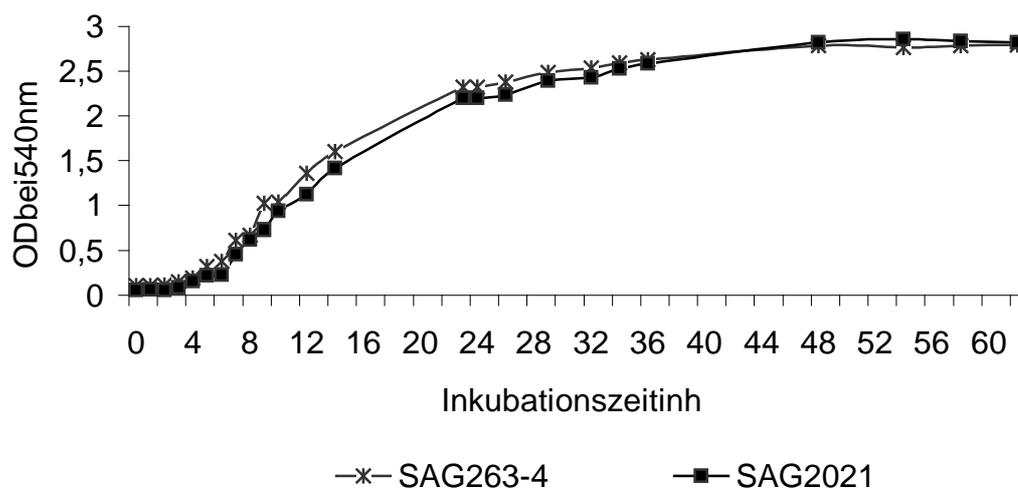


Abbildung 1 Wachstumskurve der beiden Referenzstämme SAG263-4 und SAG2021 von *P. zopfii*. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37°C in Sabouraud-Glukose-Bouillon.

4.1.4 Serologische Vergleichsmittel Immuno-Blot

Nachdem die biochemischen Untersuchungen weitere Anhaltspunkte für die Existenz verschiedener Varianten (Biotypen) von *P. zopfii* ergaben, wurde untersucht, ob auch eine serologische Differenzierung (Serotypen) innerhalb der Spezies *P. zopfii* möglich ist. Zu diesem Zweck wurde eine Immuno-Blot-Analyse mit je zwei Stämmen aus verschiedenen

Varianten sowie mit den Referenzstämmen SAG 263-4 und SAG 2021 als Antigen angefertigt. Als primäre Antikörper dient die für die variantenspezifischen Isolate RZI-3, RZII-3 und SAG 2021 hergestellten Hyperimmunseren von Kaninchen. Die Präparation der Algenzellen für den Immunoblot wurde erstmals bei der Gattung *Prototheca* durchgeführt. Die Untersuchungen erwiesen sich aufgrund der pflanzlichen Zellwandstruktur (hohe Gehalte an Zellulose und Proteoglycanen) und den hohen Zellkonzentrationen an Speicherstoffen (insbesondere von Lipiden) als sehr schwierig. So konnte bei der SDS-Gelelektrophorese der Zellwandpräparationen oftmals nur eine undeutliche Auftrennung zwischen den einzelnen Proteinen erreicht werden.

Wie aus **Abbildung 2** und **Abbildung 3** hervorgeht, unterscheiden sich die drei auxanographisch und biochemisch determinierten Varianten von *P. zopfii* auch in ihrem Antigenmuster. Diese Unterschiede lassen sich mit allen drei eingesetzten variantenspezifischen Kaninchen-Hyperimmunseren bestätigen. Gemeinsam sind die Varianten I, II und III in einem Molekulargewicht von etwa 33 und 105 Kilodalton (kDa) zu finden. Bei 1 kDa hingegen weisen die Stämme der Variante II (RZII-1, RZII-3) ein zusätzliches spezifisches Antigen auf. Der Stamm RZII-1 zeichnet sich außerdem noch durch ein weiteres spezifisches Protein bei 48 kDa aus. Bei den Stämmen der Variante III hingegen ist eine deutliche spezifische Komponente bei 37 kDa zu finden. Die Stämme der Variante I weisen außerdem genau die gemeinsamen Antigen-spezifischen Antigene auf. Aus der Immuno-Blot-Analyse geht weiterhin hervor, dass die Referenzstämme SAG 263-4 und SAG 2021 nicht nur auxanographisch und biochemisch, sondern auch serologisch der Variante I zuzuordnen sind. In **Abbildung 2** wird sichtbar, dass aber zwischen SAG 263-4 und SAG 2021 im Bereich von etwa 33 kDa geringfügige antigenetische Unterschiede bestehen. Die in **Abbildung 3** getesteten Mastitis isolate aus verschiedenen Regionen Sachsens zeigen ebenfalls alle der Variante I (SAG 2021) entsprechendes Antigenmuster. Es sind jedoch auch isolatspezifische Unterschiede zwischen diesen Mastitisfeldstämmen feststellbar. Insbesondere die Isolate DA1 und LA zeigen im Bereich von 5 sowie 6 kDa zusätzlich immunogenen Komponenten.

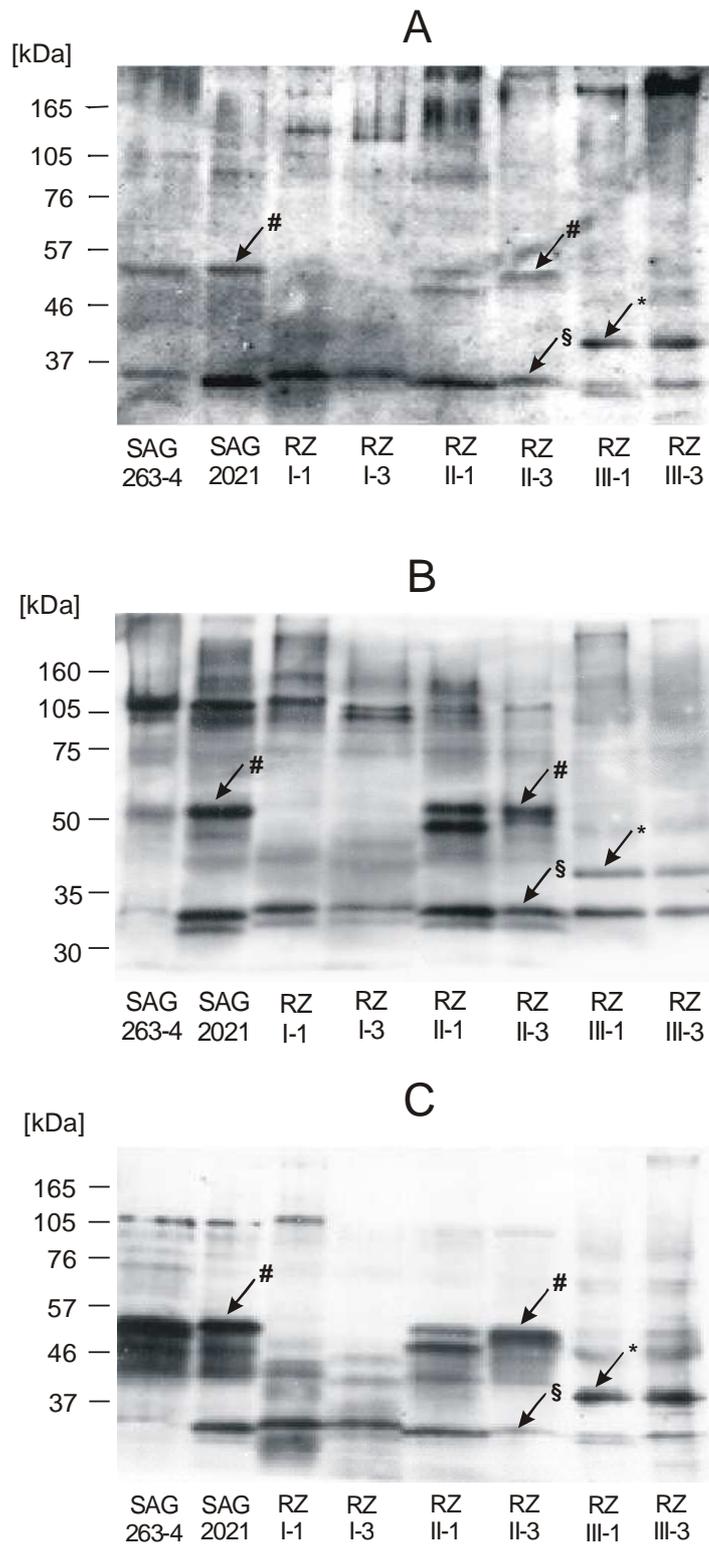


Abbildung 2. Immuno-Blots verschiedener Varianten von *P. zopfi* nach unter denaturierenden Bedingungen durchgeführten SDS-PAGE. Als primäre Antikörper dienten (A) die Kaninchen-Hyperimmunseren gegen RZI-3 (Variante I), (B) gegen SAG263-4 (Variante II) und (C) gegen RZIII-3 (Variante III). Die Pfeile kennzeichnen die spezifischen Antigene von Variante II bei 51 kDa (#), von Variante III bei 37 kDa (*) sowie das variantenübergreifende Antigen bei 30 kDa (§).

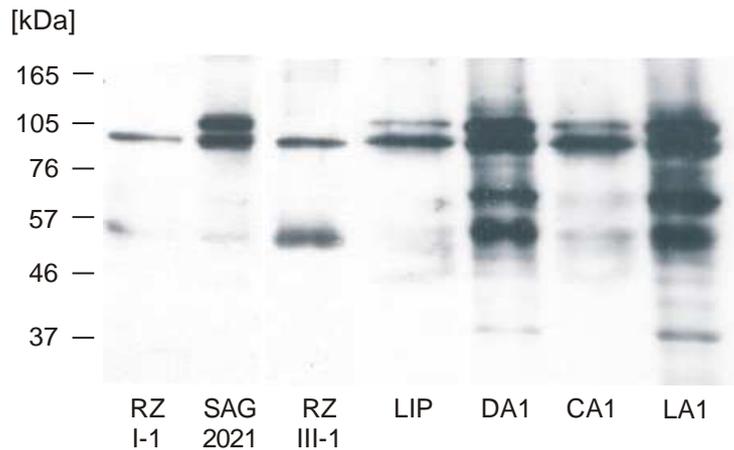


Abbildung 3. Immuno-Blot verschiedener Mastitisisolate und von Stämmen der Variante von *P.zopfii*. Die Mastitisisolate LIP, DA1, CA1 und LA1 wurden mit je einem Vertreter der Variante I (RZI-1), der Variante II (SAG 2021) und der Variante III (RZIII-1) verglichen. Als Antikörper diente ein Kaninchen-Hyperimmuns serum gegen SAG 263-4 (Variante II).

4.1.5 Genetischer Vergleich durch PCR-Sequenzanalyse

Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde der 8S stark konservierte, 1800 Basenpaare große Bereich im Genom amplifiziert und anschließend teilweise sequenziert. Diese Sequenzen wurden zum genetischen Vergleich der Stämme miteinander, anderer Speziesidentifikation für die verschiedenen Isolate.

Aus **Abbildung 4** ist ersichtlich, dass die gewählte Primerkombination bei allen untersuchten Isolaten spezifisch den Genomabschnitt der 8S rDNA binden konnte. Somit lag nach der PCR ein spezifisches Amplifikationsprodukt vor, welches dann anschließend zur Sequenzanalyse eingesetzt werden konnte.

Der Vergleich mit der bereits publizierten Gensequenz von X63519 zeigt eine Homologie von fast 100 Prozent zu den Stämmen SAG 263-8, LIP, RZI-3 und RZIII-3. Dieses ist demnach eindeutig *P.zopfii* identifiziert. Der Vergleich der partiellen Sequenzen (c rDNA dieser Stämme untereinander ist im Anhangin **Abbildung 14** dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die Stämme der Variante II (SAG 263-4, SAG 2021 und LIP) auch genetisch gegenüber den anderen Varianten abgrenzen lassen. Mit diesen weisen sie eine Sequenzhomologie von 99,4% auf. Insbesondere im Bereich des Nukleotid 630 ist eine komplexe Störung der Sequenzhomologie zu finden. Innerhalb der drei Stämme der

8S rDNA eine phylogenetisch sehr weit entfernte Verwandtschaft zu den eukaryotischen Organismen. Die Sequenzanalyse dient einerseits zur Speziesidentifikation, andererseits aber auch der eindeutigen

P.zopfii (GenBank Acc.Nr.: X63519) rSAG 263-4, SAG 2021, LIP, RZI-3, RZIII-3 als die gleiche Spezies identifiziert. (ca. 1000 Nukleotide) der 8S

Abbildung 14 dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die Stämme der Variante II (SAG 263-4, SAG 2021 und LIP) auch genetisch gegenüber den anderen Varianten abgrenzen lassen. Mit diesen weisen sie eine Sequenzhomologie von 99,4% auf. Insbesondere im Bereich des Nukleotid 630 ist eine komplexe Störung der Sequenzhomologie zu finden. Innerhalb der drei Stämme der

Variante II bestehen keine genetischen Unterschiede. Der Vertreter der Variante I (RZI-3) weist im Vergleich zu den Stämmen der Variante III (SAG 263-8 und RZ III-3) Unterschiede bei zwei Nukleotiden auf und zeigt damit eine Sequenzhomologie von 99,8% zu Variante II. Die beiden Vertreter der Variante II wiesen untereinander keine genetischen Unterschiede auf.

Durch diese Sequenzanalyse konnten offensichtliche biochemische und antigenetische Unterschiede zwischen den Varianten von *P. zopfii* nicht nur im Algen-Genom gefunden werden.

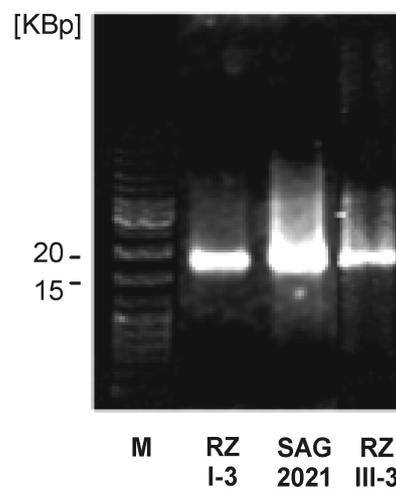


Abbildung 4. PCR-Produkte verschiedener Varianten bei *P. zopfii*. Die Amplifikation der 18S rDNA erfolgte bei allen Variantenstämmen unter Nutzung der Primer-Kombination „wicker-18S“. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend durch Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. M = Marker (100bp-Leiter Plus[®], Fa. Peqlab, Erlangen).

Ogleich zwischen den Referenzstämmen SAG 263-4 und SAG 2021 genetisch und kulturmorphologisch keinerlei Unterschiede zu erkennen waren, wurde letztendlich der Stamm SAG 2021 aufgrund seiner Herkunft aus einer Rindermastitis sowie aufgrund geringfügiger biochemischer und serologischer Unterschiede zu SAG 263-4 als Antigen für die entwickelten ELISA-Systeme ausgewählt. Ein weiteres Kriterium für diese Wahl war die antigenetische Übereinstimmung von SAG 2021 mit sämtlichen anderen untersuchten Mastitis isolaten.

4.2 Entwicklungstypspezifische ELISAs

4.2.1 Auswahl geeigneter Antigenpräparation

Die Prüfung der verschiedenen Antigenpräparationen (**Abbildung 5**) mittels Immuno-Blot macht deutlich, dass alle schon durch die Resuspension des Algenpellets in H_2O sowie durch die fünffache Gefrierbehandlung in flüssigem Stickstoff die immunogenen Hauptkomponenten mit einem Molekulargewicht von 33 kDa, 75 kDa und etwa 80 kDa freigesetzt werden. Diese sind dann im Überstand der Präparation nachweisbar. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei diesen Komponenten um oberflächengebundene lösliche Proteine handelt. Der Proteinase K-Verdau zeigt außerdem, dass keinerlei zusätzliche, elektrophoretisch auftrennbare Zellbestandteile, wie Lipopolysaccharide oder Proteoglycane durch das spezifische Hyperimmunserum erkannt werden. Diese schwache Bande bei 32 kDa entspricht der zugesetzten Proteinase K und ist auch in Gelen aus der Polyacrylamidgel-Elektrophorese sichtbar.

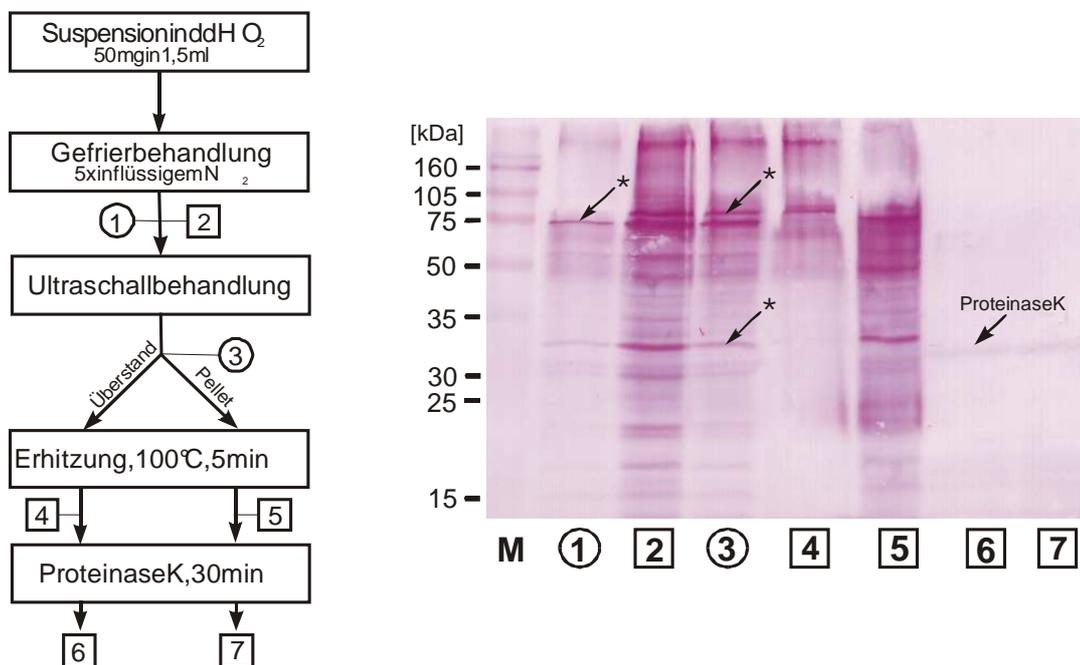


Abbildung 5. Ablaufschema für die Aufarbeitung und korrespondierender Immuno-Blot der verschiedenen Antigenpräparationen für *P. zopfii*. Quadrate = Proben wurden erhitzt, Kreise = keine Erhitzung der Proben. Die mit * gekennzeichneten Pfeile markieren die immunogenen Hauptkomponenten.

Aufgrund der Befunde im Immuno-Blot, welche zeigen, dass es sich bei den löslichen, schon bei der Gefrierbehandlung freigesetzten Proteinen um Oberflächenstrukturen handelt, wurde nachfolgend in allen ELISA-Systemen als Coatingantigen eine Suspension aus nativen Algenzellen verwendet. Dieses Vollzellantigen gewährleistet die Präsentation des gesamten Spektrums antigener Oberflächenstrukturen dieser Krankheitserregers in den von uns getesteten serologischen Nachweissystemen.

4.2.2 Auswahl geeigneter Mikrotiterplatten für die ELISA-Systeme

Die adsorbierenden Polystyrol-Oberflächen von Mikrotiterplatten verschiedener Hersteller können in Bezug auf die Antigen-Bindungsfähigkeit erheblich voneinander differieren. Dabei unterscheidet man Kunststoffoberflächen mit hydrophoben Bindungsstellen von solchen mit vorwiegend hydrophiler Affinität. In die Untersuchung wurden nacheinander Vorauswahl die beiden Mikrotiterplatten-Typen Maxisorp[®] und Polysorp[®] (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) einbezogen.

Die Maxisorp[®]-Platte zeichnet sich durch ihre Hydrophilität aus und besitzt hohe Affinitäten gegenüber Proteinen, Glycoproteinen und Polyglycanen. Mit diesen Eigenschaften erwies sie sich als für die Entwicklung verschiedener Routine-ELISAs geeignet (siehe auch HENSEL et al., 1994; JARK, 1996). Die Polysorp[®]-Platte hingegen besitzt eine Polystyrol-Oberfläche mit hoher Bindungskapazität für vorwiegend hydrophobe und lipophile Gruppen.

Beide Platten-Typen wurden unter Einsatz des positiven Kontrollserums auf ihre Antigen-Affinität und auf unspezifische Bindungen des Serumshin untersucht. Zur Darstellung der unspezifischen Reaktionen wurde die Reihe H nicht mit dem Antigen beschichtet. Die Serien wurden von der Reihe B bis zu Reihe I in Verhältnis 2 logarithmisch ausverdünnt.

Der Vergleich beider Plattentypen in **Tabelle 24** zeigt, dass bei annähernd gleichen Extinktionen in Reihe A, den sogenannten Blankwerten, die Messdaten der ausschließlich mit dem 1 zu 12800 verdünnten positiven Kontrollserum beschichteten Reihe H bei der Maxisorp[®]-Platte um 60% höher liegen als beim Plattentyp Polysorp[®]. Zudem waren die Extinktionswerte in den mit Antigen und Serum beschichteten Reihen beider Maxisorp[®]-Platte etwa doppelt so hoch wie bei der Polysorp[®]-Platte. Die Anzahl der unspezifischen Bindungen ist demnach auf der hydrophilen Oberfläche der Maxisorp[®]-Platten wesentlich größer als auf der hydrophoben Polysorp[®]-Oberfläche. Das Antigen wies insgesamt eine wesentlich größere Affinität zu Oberflächen der Maxisorp[®]-Platte auf.

Um dies noch einmal nachzuprüfen, wurden beide Plattentypen nach dem obigen Schema gecoatet, anschließend jedoch für 1 h mit 5% iger Gelatine (w/vol) in PBS überschichtet (Tabelle 25). Durch diesen zusätzlichen Schritt wurden noch freie Bindungsstellen auf der Polystyroloberfläche sowie unspezifische Bindungsstellen des Antigens blockiert. Durch das Blockieren sank die Extinktionswerte beider Plattentypen in Reihe auf Werte unter dem Niveau der Blankreihe A. Somit konnte auf eine nachhaltige Minderung unspezifischer Bindung geschlossen werden. Auch in diesem Versuchsansatz lag die Extinktionswerte der Maxisorp[®]-Platten um etwa 15% höher als die der Polysorp[®]-Platten. Aufgrund ihrer höheren Antigen-Bindungs Kapazität erwies sich deshalb die hydrophile Maxisorp[®]-Platte für alle *P. zopfii*-ELISA-Systeme als besser geeignet und wurde dann folgerichtig für die nächsten Entwicklungsschritte eingesetzt.

4.2.3 Antigen-Konjugat und Serumauswertung

Mittels einer Antigenauswertung wurde die für eine effektive Coat der Mikrotiter-Platten zur Absättigung der Plattenoberfläche notwendige Vollzellantigenmenge ermittelt. Die von den Sabouraud-Glukose-Agarmedium-Platten abgeschwemmten Algenzellen wurden in Carbonatpuffer (pH 9,6) suspendiert und die Zellzahl dieser Suspension wurde mit 1×10^4 Zellen/ml beginnend in einer dekadischen aufsteigenden Verdünnungssreihe eingestellt. In jeder Welle der Mikrotiterplatten wurden je 100 μ l der jeweiligen Antigenverdünnung inpipettiert. Die Platten wurden dann eine Stunde bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert und anschließend gewaschen. Mit Spalte 1 beginnend wurde in Reihe von Spalte zu Spalte abwechselnd das positive und negative Kontrollserum gegeben und abermals bei 37°C aerob für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Der eigentliche ELISA wurde dann wie im Abschnitt 3.2.10 beschrieben durchgeführt.

Es zeigte sich, dass es ab einer Antigenmenge von 1×10^6 Zellen/ml zu einem weiteren Anstieg der Extinktionswerte des positiven Serums kam. Daran konnte der Schluß gezogen werden, dass bei dieser Antigenmenge alle Bindungsstellen der Mikrotiterplatte abgesättigt sind. Noch höhere Antigenkonzentrationen wurden für ein zuverlässiges Ergebnis nicht benötigt. Um optimale Ergebnisse bei der Coat der Mikrotiterplatten zu gewährleisten, wurde deshalb eine Antigenverdünnung von 1×10^7 Algenzellen/ml als sichere Gebrauchsverdünnung für die zu entwickelnden Festsysteme festgelegt.

Nach Ermittlung der geeigneten Antigenverdünnung wurden nun ansc hließend durch eine Serum- und Konjugatauswertung die optimalen Verdünnungsstufen der verwendeten Blut- und Milchseren sowie der verwendeten Konjugate der verschiedenen Immunglobulin-Isotypen bestimmt. Die Auswertung erfolgte analog der Antigenauswertung, indem verschiedene Verdünnungsstufen der Seren, Milchseren und der Konjugate mittels Kreuztitration im ELISA getestet wurden. Um eine möglichst stzuverlässige Berechnung der ELISA-Aktivitäten über die angewandte Positiv-Referenzstandardmethode zu gewährleisten, wurden als optimale Verdünnungsstufen der Seren und Konjugate diejenige ausgewählt, die einen annähernd linearen Abfall der Extinktionswerte mit einem Faktor von ca. 0,6 aufwies. Gleichzeitig sollte die Extinktion des Negativserums und der Kontrollreihe A möglichst niedrig gehalten werden. Anhand der Auswertungen für die einzelnen Antikörperisotypen (siehe Anhang, **Tabelle 26 bis 28**) ergibt sich für den Einsatz der Konjugate die folgenden in **Tabelle 9** aufgeführten Gebrauchsverdünnungen.

Tabelle 9 Gebrauchsverdünnungen der Blutserum- und der Milchserum-Proben sowie der eingesetzten sekundären Antikörper für die verschiedenen *P. zopfii* - ELISA-Testsysteme.

Probe	Proben-Verdünnung	Konjugat ^a	Konjugat-Verdünnung
Blutserum	1:100	α IgG (H+L-Kette)	1:6000
	nichtauswertbar	α IgA	nichtauswertbar
	nichtauswertbar	α IgM	nichtauswertbar
Milchserum	1:50	α IgA	1:5000
	1:50	α IgG ₁	1:2500

^a alle sekundären Antikörper wurden in Ziegen entwickelt und waren mit Meerrettichperoxidase konjugiert

Als nichtauswertbar wurde aus praktischen Gründen solche Serumverdünnung angesehen, die aufgrund ihrer niedrigen Verdünnungsstufe zu einem sehr hohen Verbrauch von positivem und negativem Kontrollserum führten. Kaum messbare Extinktionen lassen aber auch auf sehr niedrige Gehalte an spezifischem IgA und IgM im Serum schließen. Somit hat ein auf diesen Isotypen beruhender Test wahrscheinlich nicht die Aussagekraft und Präzision, wie es

prinzipiell die Detektion von IgG im Serum und IgA und IgG₁ im Milchserum erwarten lassen. Darüber hinaus würde der sehr hohe Verbrauch an S-Einsatz des Tests in der Herdendiagnostik unmöglich machen.

im Milchserum erwarten
tandardserum in späteren

4.2.4 Intra-Assay-Variationen

Um Aussagen über die Reproduzierbarkeit der unterschiedlichen Testverfahren treffen zu können, müssen bei der Validierung von ELISA die Variationen der Extinktionen innerhalb einer Mikrotiterplatte sowie die Variationen der Testergebnisse zwischen voneinander unabhängigen Testsern ermittelt werden. Zur Bestimmung der jeweiligen Intra-Assay-Variation wurden pro Antikörper-Isotyp zwei mit dem Antigen beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Mit Ausnahme von Reihe A, welche als Blankwert diente, wurden in jedes Well der Platten 100 µl des 1:800 mit PBS verdünnten positiven Referenzserums pipettiert. Die Durchführung des ELISA erfolgt wie unter 3.2.10 beschrieben.

Testverfahren treffen zu
nender Extinktionen innerhalb
gebnisse zwischen voneinander
eiligen Intra-Assay-Variation
ete Mikrotiterplatten
ertdiente, wurden in jedes Well
enzserum pipettiert. Die
Aus den im Anhang in den

Tabelle 29 bis 31 dargestellten Ergebnisse ergaben sich für die einzelnen ELISA die folgenden in **Tabelle 10** aufgeführten Variationskoeffizienten.

Tabelle 10. Intra-Assay-Variationskoeffizienten sowie Mittelwerte und Standardabweichungen bei ELISA-Systemen zur serologischen Diagnostik vorbovinen *Pzopfi*-Mastitiden

	Serum-IgG- ELISA	Milchserum-IgA- ELISA	Milchserum-IgG ₁ - ELISA
Mittelwert	0,800	1,012	1,216
Standardabweichung	0,068	0,060	0,088
Variationskoeffizient	8,49%	6,08%	7,20%

Damit weist der ELISA zum Nachweis von spezifischen IgA-Antikörpern im Milchserum innerhalb des Tests die geringste Schwankungsbreite auf.

pernim Milchserum

4.2.5 Inter-Assay-Variationen

Zur Ermittlung der "Test-zu-Test"-Variationen (engl.=Inter-Assay-Variation) wurden die Blut- und Milchseren von 20 Tieren an fünf verschiedenen antigenen ELISA-Systemen untersucht. Bei den Tieren handelt es sich um drei akute Mastitiserkrankte Kühe, 7 chronisch erkrankte sowie 7 nicht infizierte Tiere aus dem negativen Kontrollbestand.

Tabelle 11 Inter-Assay-Variation des *P.zopfii*-ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG im Blutserum laktierender Kühe

Tier-Nr.	Kulturbefund	Untersuchung					Mittelwert	Std.	√[%]
		1.	2.	5.	4.	5.			
1	positiv	104	107	99	82	106	99,6	9,22	9,26
2	positiv	92	104	90	93	78	91,4	8,28	9,06
3	positiv	237	251	260	295	281	264,8	20,79	7,85
4	positiv	90	86	73	77	92	83,6	7,39	8,84
5	positiv	68	74	51	50	54	59,4	9,75	16,41
6	positiv	108	106	95	81	69	91,8	14,91	16,24
7	positiv	135	131	118	119	97	120	13,27	11,06
8	positiv	78	65	65	73	67	69,6	5,12	7,36
9	positiv	74	57	78	65	75	69,8	7,73	11,08
10	positiv	63	59	66	68	66	64,4	3,14	4,87
11	negativ	5	3	2	5	8	4,6	2,06	44,76
12	negativ	8	5	5	7	9	6,8	1,60	23,53
13	negativ	4	4	2	5	5	4	1,10	27,39
14	negativ	7	4	4	8	8	6,2	1,83	29,57
15	negativ	5	2	1	5	5	3,6	1,74	48,43
16	negativ	5	3	2	3	4	3,4	1,02	29,99
17	negativ	6	3	3	5	7	4,8	1,60	33,33
18	negativ	9	6	5	10	10	8	2,10	26,22
19	negativ	3	2	2	6	6	3,8	1,83	48,24
20	negativ	3	2	2	5	4	3,2	1,17	36,44
							Variationskoeffizient	22,50%	

√=Variationskoeffizient, Std.=Standardabweichung

Anhand der Daten in den **Tabelle 11, 12 und 13** ist zu erkennen, dass auch bei der Intra-Assay-Variation der ELISA zum Nachweis von *P.zopfii*-spezifischem IgA im Milchserum mit einem Variationskoeffizienten von **16,32%** die geringste Schwankung aufweist.

Tabelle 12 Inter-Assay-Variation des *Pzopfii* -ELISA zum Nachweis von spezifischem IgA in Milchserum laktierender Kühe

Tier-Nr.	Kulturbefund	Untersuchung					Mittelwert	Std	V[%]
		1.	2.	5.	4.	5.			
1	positiv	68	76	76	78	84	76,4	5,12	6,70
2	positiv	61	69	78	65	56	65,8	7,47	11,35
3	positiv	195	203	232	182	164	195,2	22,64	11,60
4	positiv	86	100	123	71	78	93	20,36	21,89
5	positiv	153	151	198	138	119	151,8	26,09	17,19
6	positiv	24	33	27	28	26	27,6	3,01	10,89
7	positiv	115	137	141	146	113	130,4	13,71	10,51
8	positiv	102	99	126	97	98	104,4	10,93	10,47
9	positiv	94	96	106	88	94	95,6	5,85	6,12
10	positiv	4	4	5	3	3	3,8	0,75	19,69
11	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
12	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
13	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
14	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
15	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
16	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
17	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
18	negativ	1	1	1	1	1	1	0,00	0,00
19	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
20	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
Variationskoeffizient 6,32%									

Tabelle 13 Inter-Assay-Variation des *Pzopfii* -ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG in Milchserum laktierender Kühe

Tier-Nr.	Kulturbefund	Untersuchung					Mittelwert	Std	V[%]
		1.	2.	5.	4.	5.			
1	positiv	26	22	26	29	24	25,4	2,33	9,18
2	positiv	14	12	15	26	21	17,6	5,16	29,33
3	positiv	45	41	33	49	36	40,8	5,81	14,24
4	positiv	56	55	56	59	41	53,4	6,34	11,88
5	positiv	28	24	21	20	12	21	5,29	25,20
6	positiv	12	9	17	21	15	14,8	4,12	27,83
7	positiv	17	15	12	28	25	19,4	6,09	31,37
8	positiv	12	12	12	18	10	12,8	2,71	21,19
9	positiv	44	45	38	37	30	38,8	5,42	13,97
10	positiv	4	5	4	5	5	4,6	0,49	10,65
11	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
12	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
13	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
14	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
15	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
16	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
17	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
18	negativ	1	1	1	1	1	1	0,00	0,00
19	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
20	negativ	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
Variationskoeffizient 9,74%									

Der ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG im Milchserum weist mit 9,74% eine etwas höhere Inter-Assay-Variation auf, obgleich auch mit diesem Variationskoeffizienten reproduzierbare Werte sichergestellt werden können. Mit 2,5% Inter-Assay-Variation weist der ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG im Blutserum hingegen eine beträchtliche Schwankung innerhalb des Testauf.

4.2.6 Kreuzreaktivität der ELISA-Testsysteme mit anderen Mastitisserregern

Da Spezies aus der Gattung *Prototheca* als Pflanzen phylogenetisch sehr weit entfernt von allen anderen Mastitisserregern einzuordnen sind, wurde aufgrund von Ähnlichkeiten im Zellwandaufbau, in der Kulturmorphologie und in der Klinik ein Vertreter der Sproßpilze (Hefen) für diese Untersuchung ausgewählt. Die durch *Cryptococcus neoformans* verursachte Mastitis des Rindes zeigt pathogenetisch, pathohistologisch und klinisch die größte Ähnlichkeit zu Protothekenmastitis.

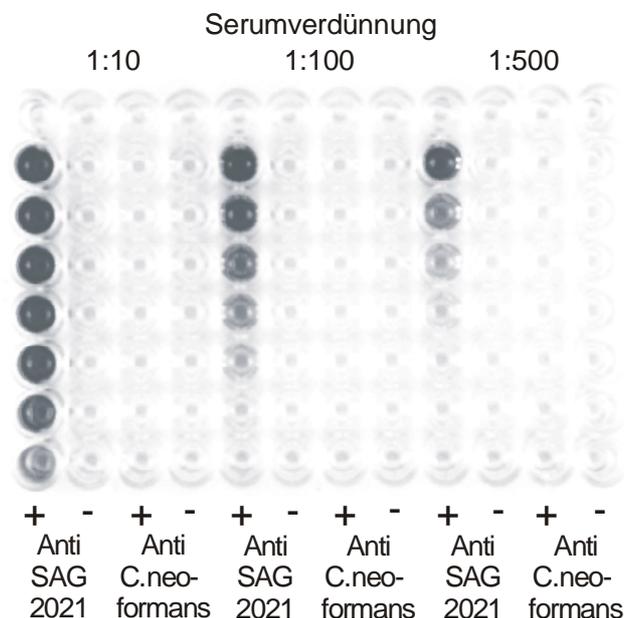


Abbildung 6. Kreuzreaktivität von *P. zopffii*, Stamm SAG 2021 mit *Cryptococcus neoformans*, Stamm 1841. Die Mikrotiterplatte ist mit Vollzellantigen des *P. zopffii*-Stammes SAG 2021 beschichtet. Aufgetragen wurden die Präimmunsere (-) und die Hyperimmunsere (+) zweier Kaninchen, die mit *P. zopffii*, Stamm SAG 2021 oder *Cryptococcus neoformans*, Stamm 1841 immunisiert worden waren.

Daher wurde mittels in Kaninchen hergestellten Hyperimm unseren gegen *Cryptococcus neoformans* (Stamm 1841, klinisches Isolat) die Kreuzreaktivität des ELISA mit anderen Mastitiserregern untersucht. Dieses Hyperimmunserum wurde uns in dankenswerter Weise vom Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig zu Verfügung gestellt.

Die Kaninchen-Hyperimmunseren wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf einer mit den ELISA-Antigen gecoateten Mikrotiterplatte getestet. Als Positivkontroll dient das Kaninchen-Hyperimmunserum gegen SAG 2021 und als Negativkontroll e das Präimmunserum des mit *Cneoformans* immunisierter Kaninchens.

Aus **Abbildung 6** geht hervor, dass das für die *Pzopfi*-ELISA-System verwendete Antigen in ELISA keine Kreuzreaktion mit Anti-*Cryptococcus neoformans*-Antikörper zeigt.

4.3 Lokale und systemische Immunantwort

4.3.1 Immunogenität des ELISA-Antigen bei Kaninchen

Um die lokale und systemische Antikörperantwort bei der Priming und Boosting des Mastitis des Rindes untersuchen zu können, wurde zunächst abgeklärt, inwiefern das eingesetzte Coating-Antigen in der Lage ist, eine Antikörperantwort zu induzieren, und in welchem Maße ein Anstieg von spezifischen Antikörperkonzentrationen erfolgen könnte. Hierzu wurden die Hyperimmunseren eines mit SAG 2021 immunisierten Kaninchens zu verschiedenen Zeitpunkten nach der ersten Immunisierung sowie nach den Boosts mittels des ELISAs untersucht. Das Priming wie auch der zweimalige Boost erfolgten mit jeweils 1×10^7 Algenzellen, wobei das Priming intradermal und die Boosts intravenös vorgenommen wurden. Der erste Boost erfolgte am 14. Tag und der zweite Boost am 28. Tag nach dem Priming. Am 38. Immunisierungstag erfolgte die Gewinnung des Endserums durch intrakardialer Blutentzug unter Allgemeinanästhesie.

Wie aus **Abbildung 7** hervorgeht, kam es nach dem erstmaligen Antigenkontakt (Priming) nur zu einem geringen Anstieg der Antikörperaktivität (etwa 18,0 % der gesamten Antikörperaktivität des Endserums), wohingegen es nach der ersten Wiederholung der Antigengabe zu einem stärkeren Anstieg (um 25,8 %) und nach dem zweiten Boost zu einem sehr starken Anstieg (um 56,2 %) der Antikörperaktivität im Serum des immunisierten Kaninchens kam.

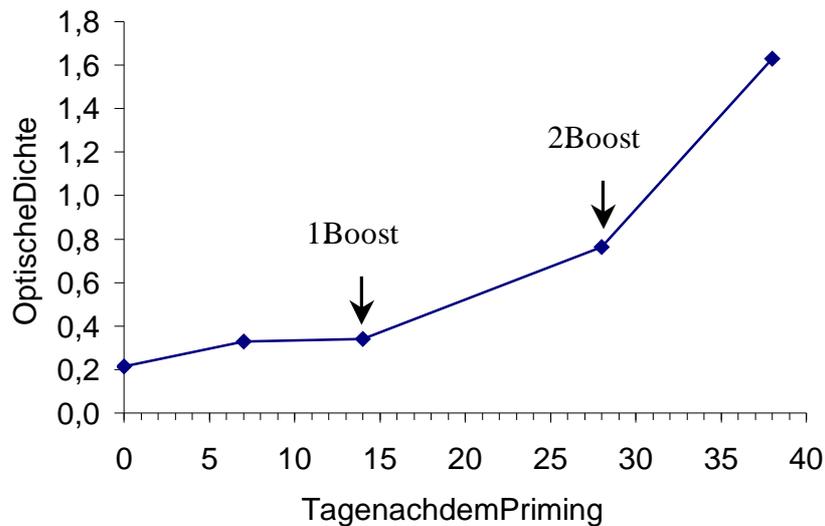


Abbildung 7. Systemische Immunantwort eines mit dem Coating-Antigen *P. zopfii*, Stamm SAG2021 immunisierten Kaninchens. Dargestellt sind die im ELISA ermittelten Extinktionswerte zu einzelnen Zeitpunkten der Immunisierung.

4.3.2 Lokale und systemische Antikörperantwort bei der Protothekenmastitis des Rindes

Um eine Aussage über die Induktion der lokalen und systemischen Antikörperantwort bei der Protothekenmastitis des Rindes treffen zu können, wurde das Blut- und das Milchserum von 85 Tieren des Bestandes und von 4 Tieren des negativen Kontrollbestandes mittels der verschiedenen entwickelten ELISA-Systeme untersucht. Da während der ersten orientierenden serologischen Untersuchungen zur Ermittlung der geeigneten Probenverdünnung generell nur äußerst geringe oder gar keine spezifischen Antikörperkonzentrationen im IgA- und IgM-Serum nachweisbar waren, wurde in der Folge auf die weitere Überprüfung dieser Isotypen verzichtet. Schwerpunkt war darum die Analyse des spezifischen Antikörper-Isotypen IgG im Blutserum sowie IgA und IgG im Milchserum.

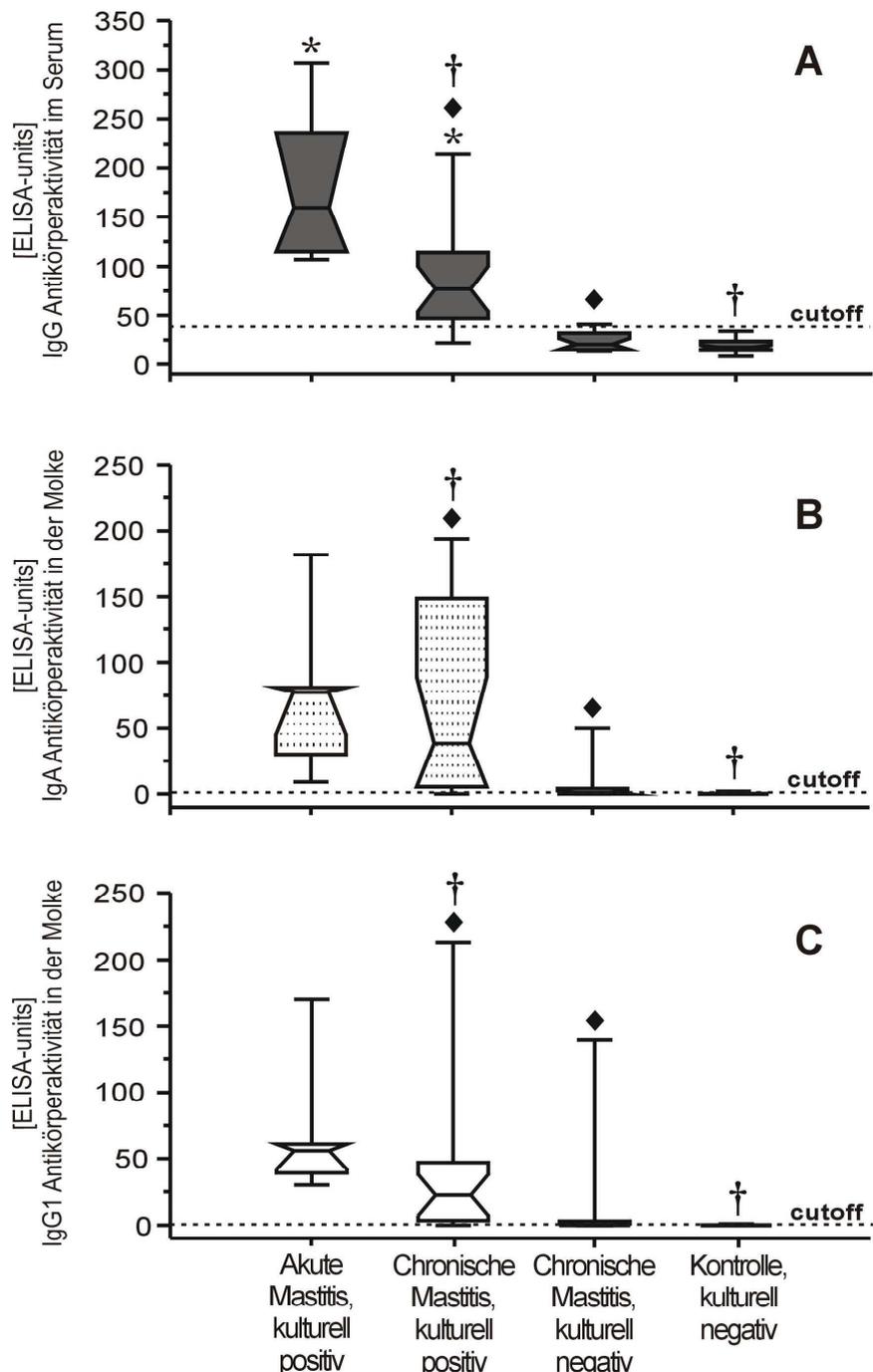


Abbildung 8. *P. zopffii* -spezifische Antikörper-Aktivitäten von IgG im Serum (A, dunkelgrau), IgA im Milchserum (B, schraffiert) und von IgG₁ im Milchserum (C, ungefüllt) bei lactierenden Kühen mit unterschiedlichen klinischen Stadien der Protothekenmastitis in EU. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen akut infizierten und von chronisch infizierten, kulturell positiven Tieren ist durch einen Stern (*) gekennzeichnet. ♦, kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen chronisch infizierten, kulturell positiven Tieren sowie Tieren mit einer chronischen Mastitis, einem früheren positiven Protothekenbefund und einem negativen kulturellen Testergebnis zum Zeitpunkt der Untersuchung. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen chronisch infizierten, kulturell positiven Tieren und nicht infizierten, klinisch gesunden Kühen sind durch † gekennzeichnet. Die gepunkteten Linien kennzeichnen den Grenzwert für ein positives Testergebnis (Cutoff-Wert) der drei ELISA-Systeme.

Die untersuchten Tiere der Bestände A und C liess sich aufgrund der klinischen und kulturellen Untersuchungen den folgenden Infektionsstadien zuordnen: Gruppe A; 6 akut infizierte Kühe mit positivem kulturellem Befund und einer Inkubationsdauer von weniger als 2 Wochen (AM, K+); Gruppe B; 2 Tiere mit akuten klinischen Zeichen einer Mastitis (CM, K+); Gruppe C; 19 Kühe mit den chronischen Zeichen einer Mastitis und einem früheren positiven Prototheken-Befund, die bei der vorliegenden Untersuchung jedoch kulturell negativ getestet wurden (CM, K-); und Gruppe D; 39 Tiere des Bestandes A und 14 Tiere aus Bestand C, die bei keiner klinischen Untersuchung kulturell positiv getestet worden sind (M-K-).

Die Untersuchung dieser Tiergruppe mittels des Einzelner ELISA-Testsystems brachte die in **Abbildung 8** dargestellten sowie in **Tabelle 34** aufgelisteten Ergebnisse. Die Antikörperaktivität ist dabei als ELISA-Einheiten (EU) angegeben, die durch Vergleich mit dem positiven Standard-Serum (10 EU) ermittelt werden konnten. Der Vergleich zwischen akut und chronisch infizierten Tieren zeigt, dass sowohl systemisch beim IgG wie auch lokal beim IgG die spezifische Antikörperaktivität akut infizierter Tiere (AM, K+) mit 59,5 EU (IgG) und 56 EU (IgG₁) im Mittel doppelt so hoch war, wie die bei chronisch infizierten Rindern (CM, K+) mit 81 EU (IgG) und 27 EU (IgG₁). Dieser Unterschied war bei einer Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ signifikant. Die lokale IgA-Antwort akut infizierter Tiere zeigt mit 78 EU eine ebenfalls fast doppelt so hohe Aktivität (34 EU). Die Antikörperaktivitäten dieser Milchkuhe unterschieden sich wiederum signifikant ($p < 0,05$) von den Tieren mit älteren positiven Protothekenbefunden, die zum Untersuchungszeitpunkt kulturell negativ waren (CM, K-). Diese ehemals kulturell positiven Tiere wiesen im Mittel beim IgG (21 EU) im Serum sowie beim IgA (2 EU) und IgG₁ (0,5 EU) im Milchserum ELISA-Aktivitäten auf, die nur leicht über denen der klinisch und kulturell unauffälligen Tiere des Protothekenbestandes sowie der Milchrinder des protothekenfreien Kontrollbestandes (M-, K-) lagen. Die spezifische Antikörperaktivität dieser nicht infizierten Tiere lag im Milchserum für die Antikörperisotypen IgA und IgG₁ bei 0 EU, während sie systemisch im Blutserum eine mittlere Antikörperaktivität von 1 EU zeigt.

Anhand der im Serum und Milchserum enthaltenen spezifischen Antikörper gegen *P. zopfii* ist es somit möglich, *P. zopfii*-ausscheidende Kühe von nicht ausscheidenden Tieren zu unterscheiden. Über die Bestimmung von *P. zopfii*-spezifischem IgG im Serum ist darüber

hinaus die Unterscheidung akut infizierter Rinder von chronisch infizierten Milchkühen möglich.

Mittels Immuno-Blot-Analyse wurde die Spezifität der humoralen Immunantwort, die sich im Laufe einer Infektion mit *P. zopfi* beim Rind entwickelt, charakterisiert (Abbildung 9). Es zeigte sich, dass sowohl im Blutserum wie auch im Milchserum nicht infizierter Rinder *P. zopfi*-spezifische Antikörper nicht nachweisbar waren. Demgegenüber erkannten spezifische Antikörper im Blutserum und im Milchserum einer infizierten Kuh jeweils zwei Antigene mit einem Molekulargewicht von 30 und 32 kDa. Die unspezifischen Hintergrundsignale waren beim Einsatz von Blutserum nur gering und beim Einsatz von Milchserum fast nicht sichtbar. Somit konnte das Ergebnis der ELISAs, dass nicht infizierte Tiere praktisch keine spezifischen Antikörper gegen *P. zopfi* in der Milch aufweisen, während im Blutserum eine Hintergrundaktivität (1 TEU) vorhanden ist, bestätigt werden.

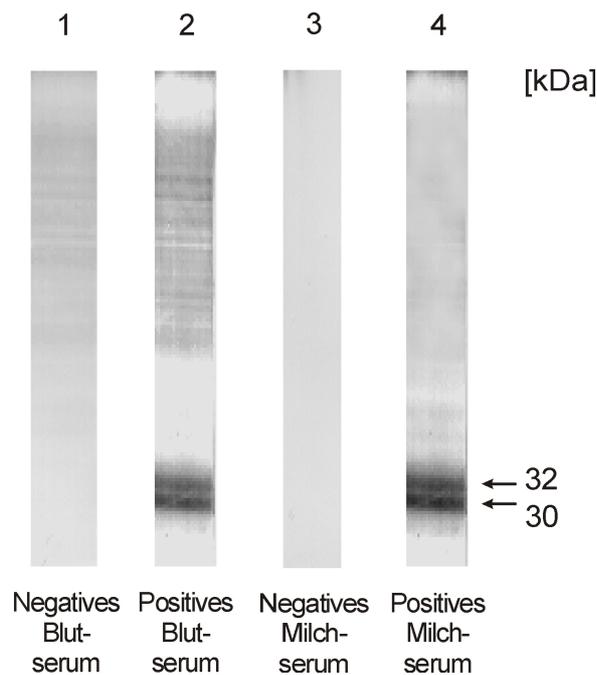


Abbildung 9. Immuno-Blot einer präparativen SDS-PAGE zum Nachweis spezifischer Antikörper des Immunglobulin-Isotyps IgG im Serum und im Milchserum von *P. zopfi* infizierten Rindern. Als Antigen diente das Vollzell-Antigen des Referenzstammes S AG2021 von *P. zopfi*. Blut- und Milchserum stammten von einer kulturell positiven, typischerweise chronisch an Mastitis erkrankten Kuh (+) und von einer kulturell negativen, klinisch gesunden Kuh (-). Die Pfeile kennzeichnen die immunogenen Proteine.

4.3.3 Lokalzellulärimmunantwort bei Protothekenmastitis des Rindes

Das bei allen Mastitiden zur Immigration von Entzündungszellen in das Milchdrüsensekret kommt, wurde die Anzahl dieser Zellen, der sogenannten somatischen Zellen, entsprechend des klinischen Status und im Vergleich zu den kulturellen Untersuchungsergebnissen bestimmt.

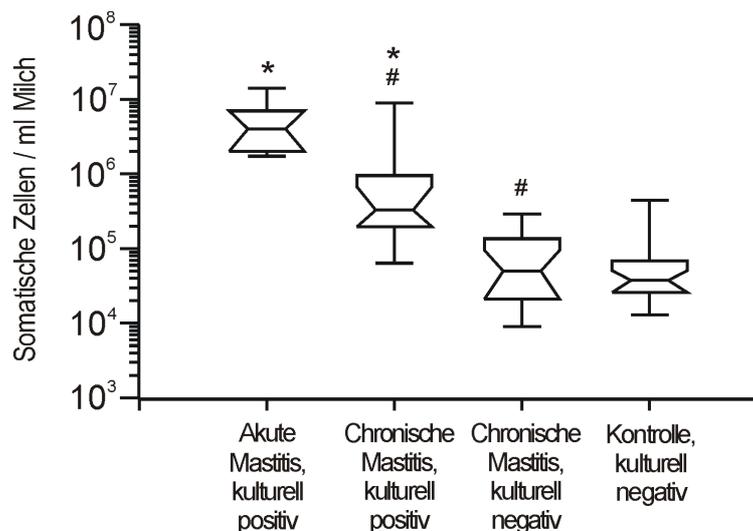


Abbildung 10. Gehalt der Milch an somatischen Zellen bei Kühen mit unterschiedlichen klinischen Stadien der Protothekemastitis. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen akut infizierten und von chronisch infizierten, kulturell positiven Tieren ist durch einen Stern (*) gekennzeichnet. #, kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen chronisch infizierten, kulturell positiven Tieren sowie Tieren mit einer chronischen Mastitis, einem früheren positiven Protothekenbefund und einem negativen kulturellen Testergebnis zum Zeitpunkt der Untersuchung.

Die in **Abbildung 10** dargestellten Ergebnisse belegen, dass der Gehalt an Milchzellen in Abhängigkeit vom jeweiligen Infektionsstadium beträchtlich variiert. So unterscheiden sich die Milchzellgehalte akut infizierter Kühe mit durchschnittlich $4,5 \times 10^6$ Zellen/ml signifikant ($p < 0,05$) von den Milchzellgehalten kulturell positiver Tiere mit Zeichen einer chronischen Mastitis, welche im Mittel $4,1 \times 10^5$ Zellen/ml aufwiesen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind ebenfalls zwischen den chronisch infizierten Kühen (CM, K+) und den Tieren mit einem älteren positiven Protothekenbefund und einer chronischen Mastitis (CM, K-) feststellbar. Diese Kühe wiesen im Mittel $5,1 \times 10^4$ Zellen/ml auf und unterschieden sich damit nicht signifikant von den kulturell negativen und klinisch gesunden Rindern ($3,2 \times 10^4$ Zellen/ml). Eine Unterscheidung der einzelnen Infektionsstadien bei Protothekemastitis des Rindes

anhand der Zellzahl der Milch ist somit möglich. Ehemal sinfizierte Tiere und damit auch eventuelle intermittierende Erregerausscheider können mittels dieser Methode jedoch nicht erkannt werden.

Die Überprüfung einer Abhängigkeit oder einer Korrelation zwischen der Anzahl somatischer Zellen und der Zahl der mit der Milch ausgeschiedenen Krankheitserreger zeigt mit einem Korrelations-Koeffizienten von 0,672 bei einer Signifikanzgrenze von 99,9 Prozent eine deutliche Abhängigkeit der Zellzahl der Milch von der Zahl der mit der Milch ausgeschiedenen Erreger (**Abbildung 11, Tabelle 14**). Erwartungsgemäß war die Anzahl der mit der Milch ausgeschiedenen Erreger bei akuten Krankheiten mit $4,6 \times 10^5$ CFU/ml höher als bei chronisch kranken Tieren, die im Mittel $1,1 \times 10^4$ CFU/ml Milch ausschieden. Bei diesen chronisch infizierten Kühen konnte jedoch eine starke Streuung der Werte im Bereich von $5,2 \times 10^1$ bis $3,2 \times 10^6$ CFU/ml Milch beobachtet werden, sodass die Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen nicht signifikant waren (**Abbildung 12**).

Tabelle 14. Korrelation der lokalen und der systemischen spezifischen Antikörperantwort gegen *P.zopfii* mit der Zahl der mit der Milch laktierenden Kühe ausgeschiedenen Prototheken (CFU) und der Zahl der somatischen Zellen in der Milch.

	Serum-IgG	Milchserum-IgA	Milchserum-IgG ₁	Somatische Zellen
CFU	0,423 <i>p</i> <0,05	0,470 <i>p</i> <0,01	0,408 <i>p</i> <0,05	0,672 <i>p</i> <0,001
Somatische Zellen	0,355 <i>p</i> <0,01	0,637 <i>p</i> <0,001	0,618 <i>p</i> <0,001	

Die Korrelation der lokalen und systemischen Antikörperantwort mit der Zahl der in der Milch enthaltenen somatischen Zellen sowie mit der Anzahl der mit der Milch ausgeschiedenen Erreger ist in **Tabelle 14** und **Abbildung 13** ersichtlich.

Hierbei zeigte sich, dass zwischen der lokalen wie auch der systemischen humoralen Immunantwort und der Zahl der mit der Milch ausgeschiedenen Erreger mit Korrelationskoeffizienten von 0,423 (Blutserum-IgG), 0,470 (Milchserum-IgA) und 0,408 (Milchserum IgG₁) nur geringe Korrelationen bestehen. Dem gegenüber ist mit einem Korrelations-Koeffizienten von 0,618 und 0,637 (*p* < 0,001) eine starke Abhängigkeit der lokalen IgG₁- und IgA-Antikörperantwort von der Zahl der in der Milch auftretenden

somatischen Zellensichtlich. Dies systemisch auftr etendenspezifischen Antikörper gegen *Pzopfi* vom Isotyp IgG korrelieren bei einem Korrelations-Koeffizienten von 0,355 dagegen wiederum gering mit der Zahl der somatischen Zellen in der Milch.

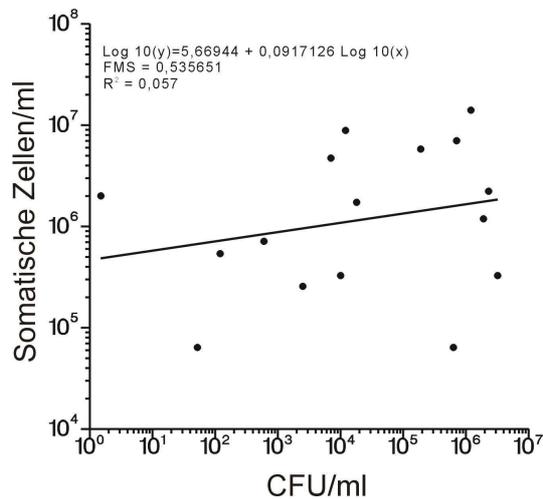


Abbildung 1 Korrelation der Zahl der somatischen Zellen in der Milch und der Anzahl der in der Milch ausgeschiedenen Prototheken (*Pzopfi*) bei der Protothekenmastitis des Rindes. Die Bestimmung der Erregerzahl (CFU) erfolgte durch Kultivierung der Milchproben auf Sabouraud-Glukose-Agar-Platten. Die Regressionsgerade ist als Linie dargestellt.

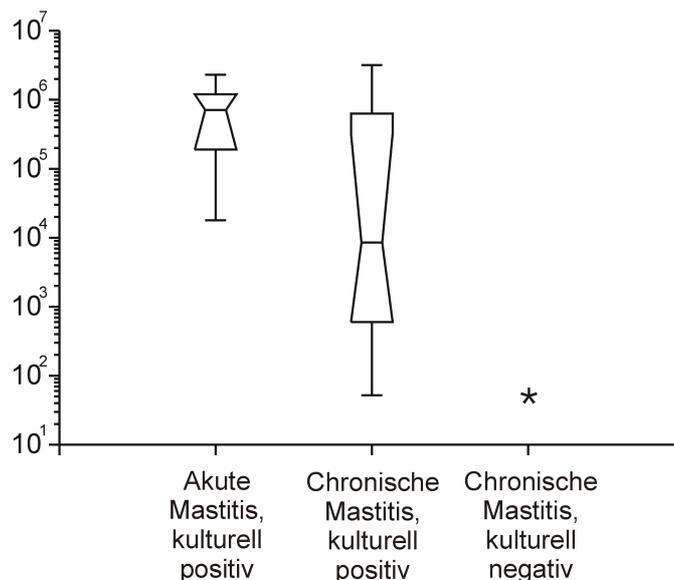


Abbildung 12. Anzahl (CFU) der mit der Milch ausgeschiedenen Prototheken bei unterschiedlichen klinischen Stadien der bovinen Protothekenmastitis (n=100). Die Untersuchung erfolgte durch Kultivierung der Milchproben auf Sabouraud-Glukose-Agar-Platten. *, kein positiver Protothekennachweis mittels Plattenkultur.

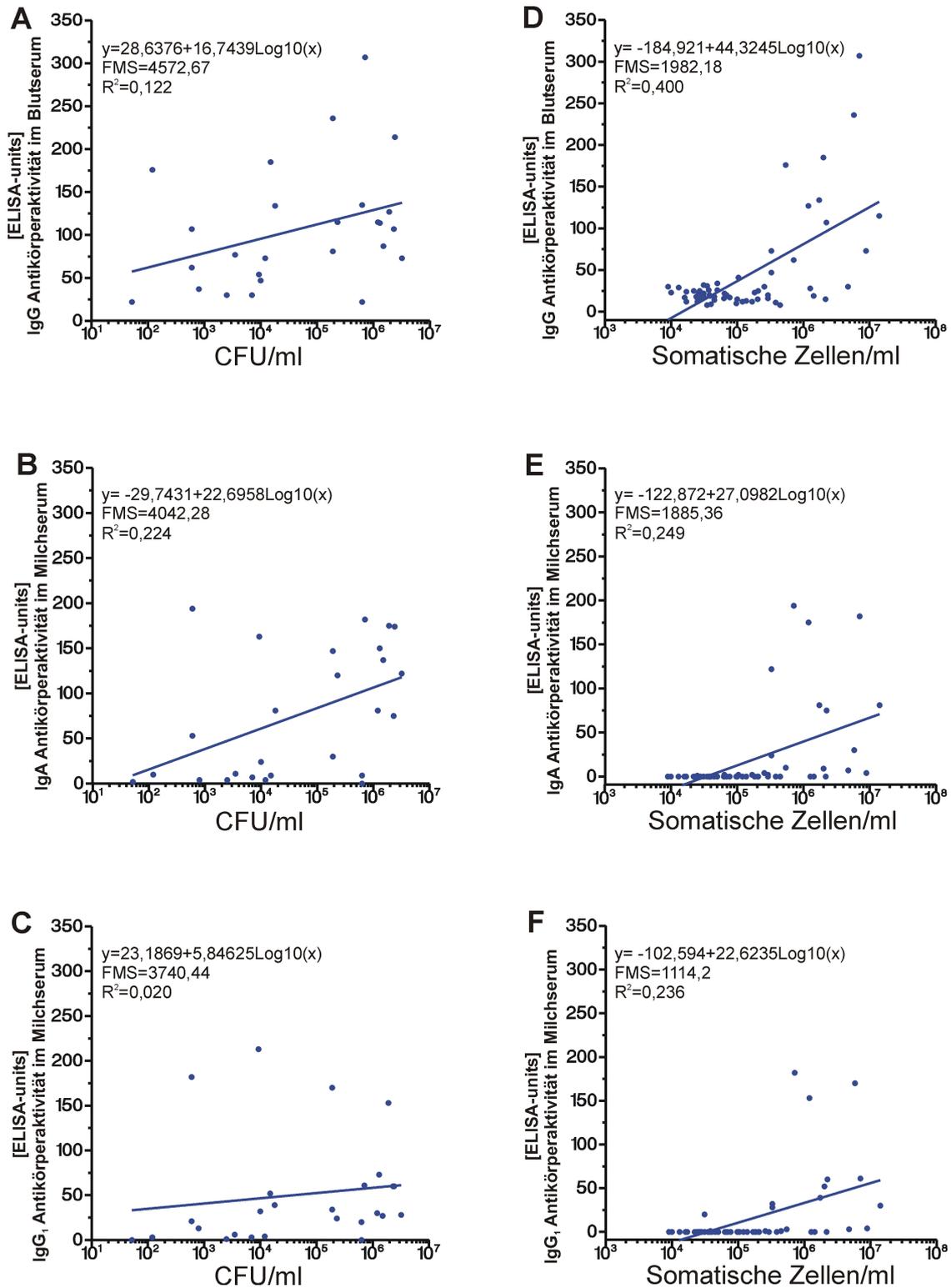


Abbildung 13. Korrelationen zwischen der lokalen und systemischen Antikörperantwort mit der Zahl der mit der Milch von laktierenden Kühen ausgeschiedenen Prototheken (linke Diagramme) sowie der Anzahl der somatischen Zellen in der Milch (rechte Diagramme) bei der Protothekenmastitis des Rindes. Die Antikörperantwort des Isotyps IgG im Blutserum werden in den Diagrammen A und D, IgA im Milchserum in B und E und IgG₁ im Milchserum in C und F dargestellt. Die Bestimmung der Algenzahl (CFU) erfolgte durch Kultivierung der Milchproben auf Sabouraud-Glukose-Agarmedium-Platten. Die Regressionen der Funktionen sind als Linien dargestellt.

4.4 Auswertung der ELISAs

Um den möglichen Nutzen der einzelnen entwickelten ELISA-Systeme für die Routine-Diagnostik der Protothekenmastitis einschätzen zu können, wurden mittels der in **Tabelle 34** aufgelisteten kulturellen Befunde und der spezifischen Antikörperaktivität die Sensitivität und Spezifität der entwickelten ELISA-Systeme ermittelt. Hierfür wurde der positive Cutoff-Wert (Schwellenwert) als jener Wert ab dem ein Tier als mittels dem Test positiv identifiziert gilt berechnet.

Zur Bestimmung dieses Schwellenwertes wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der ELISA-Aktivität der 54 euthergesunden und kulturell negativen Milchkuhder Bestände A und C ermittelt. Der Cutoff-Wert für ein positives Testergebnis berechnet sich aus dem arithmetischen Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung dieser Tiere. Hieraus ergab sich für die einzelnen Antikörper-Isotypen die in **Tabelle 15** aufgeführten Werte.

Tabelle 15. Mittelwerte und Standardabweichungen der Antikörperaktivitäten bei kulturell negativen Kühesowie die hieraus errechneten Cutoff-Werte für die einzelnen Isotyp-spezifischen ELISA-Systeme zur Diagnostik der Protothekenmastitis des Rindes. Der Cutoff-Wert für ein positives Testergebnis berechnet sich aus dem arithmetischen Mittelwert plus der dreifachen Standardabweichung dieser Tiere.

	Blutserum-IgG [in EU]	Milchserum-IgA [in EU]	Milchserum-IgG ₁ [in EU]
Mittelwert der ELISA-Aktivität der kulturell negativen Tiere	19,056	0,074	0,03
Standardabweichung	6,273	0,325	0,189
3-facher Wert der Standardabweichung	18,819	0,975	0,567
Cutoff-Wert	37,9	1,0	0,6

Für die drei neu entwickelten ELISA-Testsysteme zur Diagnostik der Protothekenmastitis des Rindes wurden daher die folgenden Cutoff-Werte, bei denen ein Probe als *Prototheca*-positiv getestet gilt festgelegt: 38 EU für den Nachweis von IgG im Blutserum, 1 EU für IgA im Milchserum und ebenfalls 1 EU für den Nachweis von IgG im Milchserum. Mittels dieser Cutoff-Werte erfolgte nun die Bewertung der einzelnen ELISAs. Hierfür wurden mittels der Vierfeldertafel (siehe **Tabelle 6**) die Ergebnisse der serologischen

Untersuchung mit denen der kulturellen Untersuchung verglichen. Da es sich bei der Untersuchung nicht um eine Bestandsuntersuchung handelte und die in die Untersuchung einbezogenen Tiere gezielt nach ihrem Infektionsstatus ausgewählt werden konnten, unterblieb die Berechnung eines positiven und eines negativen prädiktiven Wertes (d. h. eines Vorhersagewertes für ein positives und negatives Testergebnis in einem speziellen Test). Die Berechnung der scheinbaren Sensitivität und Spezifität, die für die Bewertung von Testsystemen maßgeblichen Parameter ist für die einzelnen getesteten Antikörper-Isotypen in **Tabelle 16** dargestellt. Hierbei wurden die chronisch infizierten Tiere, die zum Untersuchungszeitpunkt einen negativen kulturellen Befund aufwiesen (CM, K-) nicht berücksichtigt, da der tatsächliche Infektionsstatus dieser Kühe zum Untersuchungszeitpunkt nicht bekannt war. In einer weiteren Berechnung (**Tabelle 17**) wurden diese Kühe dann zum Vergleich mit einbezogen, da sich innerhalb dieser Tiergruppe auch persistent infizierte Milchrinder, welche Prototheken intermittierend ausscheiden befunden konnten.

Tabelle 16. Statistische Parameter der einzelnen ELISA-Systeme zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *P. zopfi* bei laktierenden Milchkühen ohne Berücksichtigung der chronisch infizierten und zum Untersuchungszeitpunkt kulturell negativen Tiere.

	Blutserum-IgG	Milchserum-IgA	Milchserum-IgG ₁
Positive Identifikation (n)	22	26	25
Falsch-positive Identifikation (n)	0	3	2
Negative Identifikation (n)	54	51	52
Falsch-negative Identifikation (n)	5	1	2
Sensitivität [in %]	81,5	96,3	92,6
Spezifität [in %]	100,0	94,4	96,3

Aus diesen Berechnungen geht hervor, dass besonders mittels der beiden ELISAs zum Nachweis von spezifischen Milchserum-Antikörpern sowohl die kulturell positiven Tiere als auch die kulturell negativen Tiere zu einem hohen Prozentsatz korrekt identifiziert werden konnten. Die Sensitivitäten der beiden Milchserum-ELISAs lagen bei 96,3 % für den Nachweis von spezifischem IgA und bei 92,6 % für den Nachweis von spezifischem IgG₁. Bei diesen beiden ELISAs konnten Spezifitäten von 94,4 % (IgA) und 96,3 % (IgG₁) errechnet werden. Demgegenüber erwies sich die Sensitivität des ELISAs zum Nachweis von spezifischem IgG im Blutserum mit 81,5 % als erheblich niedriger, wobei die Spezifität jedoch beim Maximalwert von 100 % lag.

Tabelle 17. Statistische Parameter der einzelnen ELISA-Systeme zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *P. zopfi* bei laktierenden Milchkühen unter Berücksichtigung der chronisch infizierten und zum Untersuchungszeitpunkt kulturell negativen Tiere.

	Blutserum-IgG	Milchserum-IgA	Milchserum-IgG ₁
Positividentifikation(n)	22	26	25
Falsch-positividentifikation(n)	1	12	9
Negatividentifikation(n)	71	60	63
Falsch-negatividentifikation(n)	5	1	2
Sensitivität[in%]	81,5	96,3	92,6
Spezifität[in%]	98,6	83,3	87,5

Anhand der Gruppe chronisch mit *P. zopfi* infizierter Kühe, welche einen früheren Protothekennachweis und ein gegenwärtig negatives Kulturbe- fund aufwiesen und welche die klinischen Zeichen einer chronischen Mastitis zeigten (CM, K-), wird deutlich, dass über den Nachweis von spezifischen Antikörpern im Milchserum ein großer Teil dieser Tiere korrekt identifiziert werden konnte. Dies gelang mit dem Nachweis von IgG im Serum praktisch nicht. Der Anteil identifizierter Kühe in dieser Gruppe lag bei 50% für den serologischen Nachweis von *P. zopfi*-spezifischem IgA im Milchserum und bei 39% für den Nachweis von spezifischem Milchserum-IgG (Anhang, **Tabelle 34**).

4.5 Validierung der Prototheken-ELISAs

Da die für die einzelnen ELISA-Systeme ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten die Verwendbarkeit dieser Tests für die Routine-Diagnostik der bovinen Protothekenmastitis erwarten ließen, sollte deren Praxistauglichkeit in einem weiteren, endemisch mit Protothekenmastitis behafteten Rinderbestand untersucht werden. Hierzu erfolgte dreimalige kulturelle und serologische Untersuchungen von Milchproben aller laktierenden Tiere des Bestandes im Abstand von jeweils sechs Monaten, wobei der ELISA zum Nachweis von spezifischem IgA im Milchserum zum Einsatz gelangte. Darüber hinaus wurden im Anschluß an die erste Bestandsuntersuchung sämtliche frisch abgekalbten Kühe am 5. Tag post partum kulturell und serologisch auf *P. zopfi* hin untersucht. Aus der Untersuchung dieser frisch laktierenden Tiere wurde ersichtlich, dass die infizierten Milchkühe dieser Gruppe über eine Untersuchung von spezifischem IgA im Milchserum nicht ausreichend gut identifiziert werden konnten (**Tabelle 20**). Bei diesen frisch laktierenden

Kühen wurden dreihochgradig *P.zopfi* ausscheidende Milchrinder mit dem Milchserum-IgA-ELISA nicht als infiziert erkannt. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes erfolgte in der zweiten und dritten Bestandsuntersuchung außer der Bestimmung von IgG zusätzlich auch der Nachweis von spezifischem IgG₁.

Die anhand der drei Bestandsuntersuchungen erhobenen Befunde sind in den **Tabellen 18, 19, 20, 21 und 22** dargestellt. In den **Tabellen 19 und 20** sind die ELISA-Aktivitäten der Kühe zum Zeitpunkt der Herdenuntersuchung exemplarisch aufgelistet.

Die Auswertung der ermittelten kulturellen und serologischen Befunde zeigt, dass die in der 1. Bestandsuntersuchung durchgeführte ELISA zum Nachweis von spezifischem IgA im Milchserum mit 98% eine sehr hohe Sensitivität aufwies. Die Spezifität des Testes lag mit 90,5% dagegen beträchtlich unter dem anlässlich der Entwicklung des ELISA ermittelten Wert (**Tabelle 22**). Dies kann auf die hohe Anzahl kulturell negativer, aber serologisch eindeutig positiver Tiere (n = 25) zurückgeführt werden. Dabei überschreitet ein beträchtlicher Teil dieser Kühe (n = 11) den Grenzwert für einen positiven Befund um mehr als das Dreifache (**Tabellen 18 und 19**). Der negative prädiktive Wert von 99,6% belegt hingegen die hohe Zuverlässigkeit dieses Testes für den Fall eines negativen Befundes.

Die Untersuchung demnach dem Abkalberneue in die Herde gekommenen Kühe zeigte, dass alle serologisch als negativ identifizierten, aber kulturell positiven Tiere den Erreger massiv mit der Milchausscheidung (**Tabelle 20**). Aufgrund dieser Befunde erfolgte in den folgenden Untersuchungen der Herde zusätzlich der Nachweis spezifischer Antikörper vom Isotyp IgG₁ in der Milch mit einer Prävalenz von 31,9% war der Anteil infizierter Tiere bei dieser frisch abgekalbten Tiererin insgesamt sehr hoch.

Tabelle 18 Diagnostisches Bild einer Hochgradigmilchinfektion

die Zahl der positiven serologischen ^a und kulturellen ^b Befunde anlässlich der 1. (n=313), 2. (n=298) und 3. (n=274) Herdenuntersuchung im Bestand B.

Kultureller (KU) und serologischer ^c Befund	KU+, ^e IgA+	KU+, IgA-	KU+, IgG ₁ +	KU+, IgG ₁ -	KU+, IgA+ und IgG ₁ +	KU+, IgA- und IgG ₁ -	KU+, IgA+ oder IgG ₁ +	KU-, IgA+ und IgG ₁ +	KU-, IgA+ und IgG ₁ -	KU-, IgA+ und IgG ₁ +	KU-, IgA+ und IgG ₁ -	Anzahl der Befunde bei der 1. Herdenuntersuchung	Anzahl der Befunde bei der 2. Herdenuntersuchung	Anzahl der Befunde bei der 3. Herdenuntersuchung
	47	<u>1</u> ^f	n.u. ^d	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	25	n.u.	n.u.	n.u.	25	13	17
	50	11	51	9	47	<u>7</u>	54	13	17	9	22	54	13	17
	44	7	48	3	42	<u>3</u>	48	13	13	10	22	48	13	13

^a Dieserologische Untersuchung erfolgt mittels zweifacher ELISA zur Detektion von spezifischem IgA und IgG₁ gegen *Pzopfii* im Milchserum.
^b Die kulturelle Untersuchung erfolgt durch Plattenkultur auf Sabouraud-Glukose-Agarmedium und anschließende Lichtmikroskopie.
^c Der Cutoff-Wert für beide ELISA lag bei 1 EU.
^d n.u. = nicht untersucht.
^e KU = Kultureller Befund, IgA = Nachweis von IgA im Milchserum, IgG₁ = Milchserum IgG₁; + = positiver Befund, - = negativer Befund.
^f Darstellungsweise: Fett, unterstrichen = serologisch falsch-negativ getestet; Fett = serologisch falsch-positiv getestet.

Tabelle 19 Exemplarische Darstellung der Anzahl der serologischen und kulturellen Befunde bei der Herdenuntersuchung (n=313) des Hochgradignit Pzopfi infizierter Milchviehbestandes B. Bei positivem serologischen Befund erfolgte die Angabe beder Tierzahlengruppiert nach der Höhe der Antikörperaktivität. Bei kulturell positiven und serologisch negativen Befunden erfolgte die Angabe beder Tierzahlengruppiert nach der Höhe der Erregerzahl (semiquantitativ) in der Milch.

Kulturell und serologisch positiv (n=47)		Positive Befund ^h (n=73)		Verdächtige Befund ^h (n=6)	
		Kulturell negativ, serologisch positiv (n=25)	Kulturell positivserologisch negativ (n=1)	Zweifelhafter kultureller Befund ^f (n=5)	verdächtiger serologischer Befund ^g (n=1)
1-3 EU ^d (n=13)	1-3 EU (n=14)	>3 EU (n=11)	+ ^e (n=0) ++ (n=0) +++ (n=1)	---	---

^a Dies serologische Untersuchung erfolgt mittels eines ELISA zur Detektion von IgA im Milchserum.

^b Die kulturelle Untersuchung erfolgt durch Plattenkultur auf Sabouraud-Glukose-Agar und anschließende Mikroskopie.

^c 234 Tiere wiesen kulturell und serologisch eine negative Testergebnisauf.

^d Antikörperaktivitäten, deren positive Cutoff-Werte für den verwendeten ELISA lag bei 1 EU.

^e Semiquantitative Keimzahlbestimmung; + = 3-20 KBE/50 µl Milch, ++ = 20-50 KBE/50 µl Milch, +++ > 50 KBE/50 µl Milch.

^f Als verdächtiger kultureller Befund galten < 3 KBE/50 µl Milch.

^g Als verdächtiger serologischer Befund galten eindeutig nachweisbare Extinktionserhöhungen, die mittels der verwendeten Referenzstandardmethode rechnerisch jedoch nicht als Antikörperaktivitäten in Form von ELISA-Einheiten erfaßt werden konnten.

^h Positiver Befund = serologisch und/oder kulturell eindeutig positiv getestet; Verdächtiger Befund = Vorliegen eines verdächtigen serologischen ^g oder eines zweifelhaften kulturellen ^f Befundes.

Tabelle 20. Exemplarische Darstellung der Anzahl der serologischen^a und kulturellen^b Befunde der im Anschluß an die 1. Herdenuntersuchung frisch abgekalbten Kühe (n=94) des Hochgradig mit *Pzopfi* infizierten Milchviehbestandes B. Bei serologisch negativen aber kulturell positiven Befunden erfolgte die Angabe der Tierzahlen gruppiert nach der Höhe der Erregerzahl (semiquantitativ) in der Milch.

Serologisch und kulturell positiv (n=23)	Positive Befund ^h (n=30) ^c		Verdächtige Befund ^h (n=2)	
	Serologisch positiv ^d , kulturell negativ (n=4)	Serologisch negativ, kulturell positiv ^e n=3 + ^e ₁ (n=0) ++, (n=0) +++ ₁ (n=3)	Kulturell zweifelhaft ^f (n=0)	Serologisch verdächtig ^g (n=2)

^a Dies serologische Untersuchung erfolgt mittels des ELISA zur Detektion von spezifischem IgA im Milchserum.

^b Die kulturelle Untersuchung erfolgt durch Plattenkultur auf Sabouraud-Glukose-Agar-Medium und anschließende Mikroskopie.

^c 62 Tiere wiesen kulturell und serologisch eine negative Testergebnisauf.

^d Der positive Cut-off-Wert für den ELISA liegt bei 1 EU.

^e Semi quantitative Keimzahlbestimmung; + = 3-20 KBE/50 µl Milch, ++ = 20-50 KBE/50 µl Milch, +++ > 50 KBE/50 µl Milch.

^f Als verdächtig serologischer Befund galten < 3 KBE/50 µl Milch.

^g Als verdächtig serologischer Befund galten eindeutig nachweisbare Extinktionserhöhung, die mittels der verwendeten Referenzstandardmethode rechnerisch jedoch nicht als Antikörperaktivität in Form von ELISA-Einheiten erfaßt werden konnte.

^h Positiver Befund = serologisch und/oder kulturell eindeutig positiv getestet; Verdächtig Befund = Vorliegen eines verdächtigen serologischen Befundes zweifelhaften kulturellen Befundes.

Tabelle 21. Epidemiologische Kenndaten^a (Prävalenzen und Inzidenzen) der bovinen *P. zopffii* -Mastitis im endemisch infizierten Milchviehbestand zum Zeitpunkt der Bestandsuntersuchungen^b.

	Prävalenz (KU) in %	Prävalenz (IgA) in %	Prävalenz ^c (IgG ₁) in %	Prävalenz ^c (Ser) ^e in %	Inzidenz (KU) in %	Inzidenz ^d (IgA) in %	Inzidenz ^d (IgG ₁) in %	Inzidenz ^d (Ser) ^e in %
1. Bestandsuntersuchung ^b (n=313)	15,6	23,3	n.u. ⁹	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
2. Bestandsuntersuchung, nach 6 Monaten (n=298)	20,5	21,1	22,8	25,5	9,7	8,7	11,4	12,8
3. Bestandsuntersuchung, nach 12 Monaten (n=274)	18,6	20,8	22,3	25,6	4,4	6,2	5,1	8,0

^a Die Berechnung der Prävalenzen und Inzidenzen erfolgt unter Einbeziehung der bereits in vorherigen Untersuchungen als positiv identifizierten Tiere, die bei den folgenden Bestandsuntersuchungen aber noch im Bestand verblieben waren.

^b Die einzelnen Bestandsuntersuchungen erfolgten im Abstand von jeweils 6 Monaten.

^c Scheinbare Prävalenz (siehe Tabelle 6, Formel: [a+b]/N) unter Verwendung der positiven serologischen Befunde.

^d Scheinbare Inzidenz (siehe Tabelle 6, Formel: [a+b]/N pro Zeitraum) unter Verwendung der positiven serologischen Befunde.

^e Ser = insgesamt positiver serologischer Befund, b = Inzidenz der Mastitis im Milchserum gelang.

^f KU = positiv verkultureller Befund bei der Untersuchung mittels Plattenkultur auf Sabouraud-Glukose-Agar-Medium und anschließender Mikroskopie.

⁹ n.u. = nicht untersucht.

Tabelle 22. Statistische Charakteristika der einzelnen ELISA zum Nachweis der bovinen Protothekenmastitis zum Zeitpunkt der drei Herdenuntersuchungen im Gemischtmilchviehbestand B.

Im ELISA getesteter Immunglobulin-Isotyp	Sensitivität ^{a,b} [in %]	Spezifität ^c [in %]	Voraussagewert der positiven Diagnose ^d [in %]	Voraussagewert der negativen Diagnose ^e [in %]
1. Untersuchung IgA	98,0	90,5	65,8	99,6
2. Untersuchung (nach 6 Monaten) IgA	81,9	94,5	79,4	95,3
IgG ₁	85,0	92,9	75,0	96,1
IgA+IgG ₁ ^f	88,5	90,7	71,0	96,8
3. Untersuchung (nach 12 Monaten) IgA	86,3	94,2	77,2	96,8
IgG ₁	94,1	94,2	78,7	98,6
IgA+IgG ₁ ^f	94,1	90,1	68,6	98,6

^a Der Cutoff-Wert lag für beide Antikörper-Isotypen bei jeweils 1 EU.

^b Sensitivität (siehe Tabelle 6, Formel: $a/(a+c)$)

^c Spezifität (siehe Tabelle 6, Formel: $d/(b+d)$)

^d Voraussagewert der positiven Diagnose (siehe Tabelle 6, Formel: $a/(a+b)$)

^e Voraussagewert der negativen Diagnose (siehe Tabelle 6, Formel: $d/(c+d)$)

^f Für diese Berechnung wurden die Tierermittlungen der Befunde des ELISA zum Nachweis von IgA und/oder von IgG₁ herangezogen.

Anlässlich der 2. und 3. Bestandsuntersuchung wurden für den IgA-ELISA in Milchserum mit 81,9% und 86,3% Sensitivitätswerte ermittelt, welche deutlich unter der Sensitivität dieses Tests in der ersten Bestandsuntersuchung lagen (98,0%). Hingegen konnten bei diesen beiden Bestandsuntersuchungen mit 94,5% und 94,2% Spezifitätswerten rechnet werden, welche deutlich über die in der ersten Herdenuntersuchung ermitteltelten Spezifität vor 90,5% lagen (Tabelle 22). Wie in der ersten Bestandsuntersuchung so zeigte sich auch bei diesen beiden Herdenuntersuchungen, dass ein großer Teil der serologisch falsch-positiven Tiere sowohl eine IgA- als auch eine IgG1-Aktivität im Milchserum aufwies, welche teilweise 30% über den Grenzwert von jeweils EUag.

Über den serologischen Nachweis von IgG1 im Milchserum gelang es, wesentlich mehr kulturell positive Kühe zu identifizieren. Dadurch konnte die Sensitivität auf bis zu 94,1% gesteigert werden. Die Kombination des serologischen Befunde, welche bei der Detektion von IgA und/oder beim Nachweis von IgG in Milchserum positiv waren, weist mit 88,5% bzw. 94,1% die höchste Sensitivität auf. Erwähnenswert ist außerdem, dass die negativ-prädiktive Wert bei allen Untersuchungen des Bestandes reinen Bereich vor 96,1 bis 99,0% lag und somit die Zuverlässigkeit eines negativ-serologischen Befundes als sehr hoch eingeschätzt werden konnte.

Die auf der Basis unserer drei Bestandsuntersuchungen ermittelten epidemiologischen Parameter des Bestandes für den Untersuchungszeitraum von 12 Monaten sind in der Tabelle 21 zu entnehmen. Zur Zeitpunkt der ersten Bestandsuntersuchung lag die Prävalenz für die Protothekenmastitis bei 15,6%. Unter Berücksichtigung der serologischen Befunde ergibt sich für den Zeitpunkt der ersten Herdenuntersuchung ein Wert von 23,3%. Die identifizierten Tiere unterschiedlich langsam aus den Beständen entfernt worden sind ab gleichzeitig eine Inzidenz von 9,7% (anhand der positiven kulturellen Befunde) bzw. 12,8% (bei Berücksichtigung der positiven serologischen Befunde) vorlag, stieg die Prävalenz der Erkrankung zum Zeitpunkt der zweiten Herdenuntersuchung auf 20,5% (kulturell positive Befunde) bzw. auf 25,5% (bei Berücksichtigung der positiven serologischen Befunde). Die dritte Bestandsuntersuchung zeigte dann mit 4,4% (kulturell positive Befunde) und 8,0% (serologisch positive Befunde) eine deutliche Senkung der Neuanfallrate auf, was letztlich auch zu einer geringfügigen Abnahme der Prävalenz auf 18,6% (bei Berücksichtigung der positiven kulturellen Befunde) der Protothekenmastitis in diesem Bestand führte.

4.6 Kulturell- und serologische Charakterisierung des Verlaufes Protothekenmastitis

feste Rindbovinen

Über die Erhebung kultureller und serologischer Befunde erfolgt die Langzeitbeobachtung derjenigen Tiere des Bestandes B, welche in der ersten der zweiten Bestandsuntersuchung auf *P. zopfii* einen positiven serologischen und/oder kulturellen Befund auf wiesen und die dann trotz der Sanierungsmaßnahmen mindestens bis zur folgenden Bestandsuntersuchung im Bestand verblieben sind. Insgesamt wurden 66 Tiere, darunter 7 trockenstehende Tiere, in diese 2-monatige Untersuchung einbezogen (siehe Anhang, **Tabelle 35**). Die in **Tabelle 23** zusammengefassten Ergebnisse zeigen vergleichend die unterschiedlichen mikrobiologischen und serologischen Verläufe der Infektion der bovinen Milchdrüse mit *P. zopfii*. Bei dieser in dieser Form erstmalig beim Rind durchgeführte kulturellen und serologischen Langzeituntersuchung zum Nachweis der *P. zopfii*-Infektion zeigte es sich, dass nur ein geringer Teil (18%) der kulturell positiv befundenen Kühe die Infektion zu überwinden. Diese Tiere wiesen nach 6 und 12 Monaten keinen positiven kulturellen Befund mehr auf. Bei 45,4% dieser Milchkühe waren allerdings noch spezifische Antikörper der Isotypen IgA und IgG gegen *P. zopfii* im Milchserum nachweisbar. Dem gegenüber wurde deutlich, dass der überwiegende Teil (70,5%) allein infiziert und persistent infiziert war. Zu den Zeitpunkten aller drei Bestandsuntersuchungen schiedensie die Algen teilweise hochgradig mit der Milch aus und sie wiesen dabei deutliche spezifische Antikörperkonzentrationen auf. Schließlich gab es eine zahlenmäßig kleine Gruppe von 3 Tieren (4,9%), die nach einem positiven Kulturbefund in der 1. Bestandsuntersuchung bei der 2. Bestandsuntersuchung keinen positiven kulturellen Befund mehr aufwiesen. Zum Zeitpunkt der 3. Bestandsuntersuchung schiedendiese Kühe jedoch wieder viele Algen mit der Milch aus. Diese Probanden konnten auch serologisch stark positiv getestet werden. Vorausgesetzt es erfolgte keine Reinfektion, so handelte es sich bei diesen Kühen demnach um intermittierende Erreger-Ausscheider. Bei denjenigen Tieren, welchesich zum Zeitpunkt der 2. Bestandsuntersuchung in der Trockenstehperiode befanden, deutendie Befunde der folgenden Bestandsuntersuchungen ebenfalls auf ein mögliches Persistierender Infektion hin. Dreivon vier Rindern, welche vor der Trockenstehperiode kulturell positiv getestet werden konnten, wiesenauch in der erneuten Laktation wieder kulturell positiv und spezifische Antikörper in der Milch auf. Dabei wardie absolute und relative Erregerzahl in der Milch gegenüber der ersten Untersuchung deutlich erhöht.

**Tabelle 23. Epidemiologische Kategorisierung des Verlaufes der Erregerausscheidung bei infizierten Milchviehbeständen (Bestand B).
 der Protothekenmastitides Rindes in einem Hochgrad mit *Pzopfii* infizierter Milchviehbestand (Bestand B).
 Kühe mit Antikörpersekretion in der Milch bei**

	Kühe mit Erregereliminierung [%]	Kühe mit persistierender Erregerausscheidung [%]	Kühe mit intermittierender Erregerausscheidung [%]	Kühe mit negativem kulturellem Erregernachweis, aber stets positivem ELISA-Befund [%]
Gesamtanteil am Infektionsgeschehen	18	70,5	4,9	6,6
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
Vollständig infizierte Kühen (100%) waren nachweisbar	8,2	65,5	4,9	6,6
gelangter serologischer Nachweis von <i>Pzopfii</i> 6 Monate vor dem kulturellen Erregernachweis	0	14,8	0	0

^a Die Untersuchung erfolgte bei 59 infizierten Milchkühen (=100%) dreimal über einen Zeitraum von 12 Monaten (6-Monats-Intervalle)

^b Die kulturelle Untersuchung geschah mittels Plattenkultur auf Sabouraud-Glukose-Agar-Medium

^c Dieser serologische Untersuchungserfolgter mittels der ELISA zum Nachweis *Pzopfii*-spezifischer Antikörper der Immunglobulin-Isotypen IgA und IgG im Milchserum

Beim vierten Tier waren nach dem Abkalben zwar keine Antikörper der Immunglobulin-Isotypen IgA und IgG in der Milch nachweisbar.

Bei einem weiteren Milchrind, welches anlässlich der ersten Untersuchung keine Erreger in der Milch aber einen verdächtigen milchserologischen Befund aufwies, zeigte sich, dass nach dem Abkalben eine massive Infektion mit sehr hohen Erregerszahlen und einer hohen Antikörperantwort vorlag.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Langzeituntersuchung konnte auch nachgewiesen werden, dass 9 Tiere, welche zum Untersuchungszeitpunkt hochgradig antigenüber die Milch ausschieden, zu diesem Zeitpunkt keine spezifischen Antikörper der Immunglobulin-Isotypen IgA und IgG im Milchserum aufwiesen. In der Folge waren bei diesen Kühen aber stets spezifische Antikörper nachweisbar. Dem gegenüber war bei 10 Kühen bereits einige Monate vor dem kulturellen Nachweis von *P. zopfii* in der Milch eine erhöhte Antikörperaktivität gegen *P. zopfii* feststellbar. Schließlich wiesen 6 Milchkühe bei mehreren Untersuchungen zum Teil sehr hohe Antikörperaktivitäten von bis zu 40 EU im Milchserum auf, während hingegen die kulturelle Erregernachweise in diesen Tieren zu keinem Zeitpunkt gelang.

Um Vergleiche zwischen der Darmbesiedlung mit *P. zopfii* zwischen infizierten und nicht infizierten Milchrindern ziehen zu können wurde darüber hinaus im Anschluß an die erste Bestandsuntersuchung der Kot von je 25 in der Milchkulturell positiven und negativen Kühen mittels Plattenkultur auf Prototheken-Isolations-Medium nach PORE auf das Vorhandensein von *P. zopfii* hin untersucht. Bei dieser Untersuchung waren hinsichtlich der Darmbesiedlung mit *P. zopfii* keinerlei Unterschiede zwischen nicht infizierten und infizierten Individuen feststellbar. Unabhängig vom Infektionsstatus konnte bei allen getesteten Kühen (100% in beider Gruppen) *P. zopfii* im Kot nachgewiesen werden.

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass für die Prototheken mastitis des Rindes eine spezielle, biochemisch, serologisch und genetisch abgrenzbare Variante der Algenart *P. zopfii* verantwortlich zusehnt. Die Einordnung dieser Variante als Subspezies von *P. zopfii* erscheint derzeit aufgrund gefundener beträchtlicher Unterschiede bereits angebracht, sie muß aber anhand einer größeren Anzahl von Isolate verifiziert werden.

Die Infektion mit diesem Erreger führt zu einer spezifischen systemischen und lokalen humoralen und zellulären Immunantwort, über deren Bestimmung sich die verschiedenen Infektionsstadien gegeneinander abgrenzen lassen und über die eine Identifikation von infizierten Tieren möglich ist. Zwei auf den Ganzzell-Antigen der Variante II von *P. zopfii* basierend indirekte ELISA-Systeme zum Nachweis spezifischer Antikörper der Isotypen IgA und IgG im Milchserum wiesen für eine Routine diagnostik ausreichende Sensitivitäten und Spezifitäten auf. Der Einsatz dieser beiden ELISAs im Rahmen eines Sanierungsversuches in einer hochgradig mit *P. zopfii* infizierten Milchviehherde zeigte, dass beide serologischen Testsysteme für die Herdendiagnostik der Protothekenmastitis des Rindes geeignet sind. Die besten Ergebnisse sind durch eine Kombination beider serologischer Testsysteme zu erzielen.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte serologische Testsysteme stellen die derzeitige einzige Möglichkeit dar, intermittierende Erregerausscheide r über eine einmalige Bestandsuntersuchung zu identifizieren. Darüber hinaus ist mittels dieser Diagnostika erstmals auch die Diskriminierung der verschiedenen klinischen Stadien möglich. Schließlich ist auch die beträchtliche Ersparnis an zeitlichem, finanziellem und personellem Aufwand hervorzuheben. Eine Verkürzung der Diagnostik von mindestens 48 h auf 6 h ist als ein Hauptvorteil der Serodiagnostik gegenüber dem bisher allgemein gebräuchlicher kulturellen Nachweis anzusehen.

Die kulturelle und serologische Untersuchung von 66 infizierten Tieren über einen Zeitraum von 12 Monaten hinweg belegte die Vermutung zudem, dass es sich bei der Protothekenmastitis des Rindes um eine in ihrem Langzeitverlauf nach chronisch-persistierende Infektion der Milchdrüse handelt. Die meisten infizierten Kühe zeigten weder eine *restitutio ad integrum* noch eine Beendigung der Infektion und damit der Erregerausscheidung.

Zusammenfassend muß die persistierende Infektion mit fortschreitender Atresie des betroffenen Eutergewebes und permanenter (oder in vielen Fällen auch intermittierender) Fällenauch intermittierender) Protothekenmastitis des Rindes angesehen

werden. Vor diesem Hintergrund und aufgrund des Fehlens einer effizienten Therapieerweist sich die frühzeitige und sichere Identifikation infizierter Tiere als Grundvoraussetzung für die Sanierung von endemisch mit *P. zopfii* infizierten Milchviehbeständen. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten ELISA-Testsysteme erwiesensich als eine sichere, zeit- und kostensparende Alternative zu bisher gebräuchlichen kulturellen Erregernachweisen. Neuestens ist dabei die Möglichkeit zur Identifikation von intermittierenden Erregerausscheidern.

5.1 Vergleich verschiedener Isolate von *Pzopfii*

Mittels biochemischer, serologischer und genetischer Methoden wurden 18 Isolate von *Pzopfii* aus verschiedenen Habitaten vergleichend untersucht. Das Ziel war das Vorkommen von Bio-, Sero- und Genotypen bei *Pzopfii* zu untersuchen und ein als Coating-Antigen für diagnostische Zwecke geeignetes Isolat zu ermitteln.

5.1.1 Auxanographischer Vergleich

Unsere auxanographischen Untersuchungen konnten die von BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) vorgenommene Zuordnung der vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden bezogenen Prototheken-Isolate zu drei Varianten von *P. zopfii* bestätigen. Besonders deutlich waren die Unterschiede der Glycerol-Assimilation von Variante II im Vergleich zu Variante I und II. Dabei war Variante II im Gegensatz zu den Varianten I und II nicht in der Lage, diese C-Quelle zu verwerten. Die stärkere und zeitlich eher einsetzende Verwertung von Galaktose durch Isolate der Variante I im Vergleich zu Variante II waren ebenfalls zu bestätigen. Dieses Assimilationsmerkmal sollte jedoch kritisch bewertet werden, da die Gefahr subjektiver Fehler bei der Einschätzung der von der Inkubationszeit abhängigen Wachstumsintensitäten wesentlich größer ist als die Beurteilung einer positiven oder negativen Assimilation nach einer vorher definierten Inkubationszeit. Die bei Variante II beschriebene ringförmige Wachstumszone um die Galaktose-Quelle herum konnte hingegen nur bei 57 % der Isolate der Variante II beobachtet werden. Diese Wachstumszone wird nur von denjenigen Stämmen gebildet, welche eine bestimmte Galaktose-Konzentration bevorzugen, während bei höheren und niedrigeren Konzentrationen dieses Zuckers keine Vermehrung mehr stattfindet (BLASCHKE-HELLMESSEN et al.,

1985a) Zusammen mit der zeitlich stark verzögerten Galaktoseverwertung deutet dies darauf hin, dass die Variante II von *P. zopfii* diesen Stoffwechselweg nur in Ausnahmesituationen wählt und die hierfür notwendige Enzymausstattung erst situationsgebunden exprimiert werden muß.

Über die auxanographischen Befunde konnten sämtliche, aus verschiedenen Rinderbeständen Sachsens stammenden Mastitisisolate der Variante II zugeordnet werden. Dies stützt die Vermutung, dass die Protothekenmastitis des Rindes durch die Variante II von *P. zopfii* verursacht wird. Da auch der aus einer humanen Enteropathie isolierte Referenzstamm SAG 263-4 das Assimilationsmuster von Variante II zeigt, kann vermutet werden, dass diese Variante auch für die seltenen humanmedizinischen Fälle einer *P. zopfii*-Infektion verantwortlich sein könnte.

Der Vergleich der Referenzstämme SAG 2021 und SAG 263-4 zeigt nur geringfügige Unterschiede im Assimilationsverhalten. Stamm SAG 263-4 wies bei der Assimilation von Galaktose einen Wachstumszonenring auf, welcher bei SAG 2021 nicht zu beobachten war. Beide Referenzstämme konnten auxanographisch jedoch eindeutig der Variante II zugeordnet werden. Referenzstamm SAG 263-8 zeigte hingegen eine C-Quellen-Verwertung vom Variante III-Typ. Der Isolationsort dieses Stammes konnte leider retrospektiv nicht in Erfahrung gebracht werden. In Tierhaltungen wurden diese Varietäten jedoch bisher meist aus Schweinehaltungen isoliert. Die augenfällige Unfähigkeit der Stämme RZIII-1, RZIII-2 und RZIII-3, Glycerol zu assimilieren sowie der enteropathogene assoziiertes Vorkommen können somit als deutliche Indizien für das Vorkommen einer klar von anderen isolaten abgrenzbaren Variante III der Spezies *P. zopfii* gewertet werden.

Eine Differenzierung zwischen Stämmen der Varianten I und II hingegen ist mittels der angewandten auxanographischen Methode wesentlich schwieriger. Die phänotypischen Kriterien, wie die Galaktoseassimilation sowie die Bildung einer ringförmigen Wachstumszone um die Galaktosequelle herum, sind als alleinige Differenzierungsmerkmale relativ unsicher. Die Untersuchung weiterer biochemischer Parameter, so die Verwertung zusätzlicher Kohlenstoff-, vor allem aber auch Stickstoff-Quellen, muß deshalb für die weitergehende Charakterisierung verschiedener Biotypen von *P. zopfii* gefordert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mittels der auxanographischer Untersuchungen des Assimilationsverhaltens der C-Quellen Glukose, Galaktose und Glycerol eine eindeutige Identifizierung von Isolaten der Variante III von *P. zopfii* möglich ist, während eine Unterscheidung zwischen Variante I und Variante II mit dieser Methode Unsicherheiten aufweist.

5.1.2 Biochemische Charakterisierung mittels des Identifikationssystems BBL-Crystal®

Nachdem bereits die Auxanographie starke Indizien für das Vorkommen von unterschiedlichen Biotypen bei *P. zopfii* lieferte, wurde diese Hypothese durch die Bestimmung des Assimilationsverhaltens von *P. zopfii* bei verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen untermauert.

Auch diese biochemische Untersuchung bestätigte die von BLASCHKE-HELLMESSEN und Mitarbeitern (1985a) vorgenommene Einteilung von *P. zopfii*. Die Variante III zeigte wiederum eindeutig von den anderen Isolaten unterscheidbares Assimilationsverhalten. Im Unterschied zur auxanographischen Untersuchung war über diesen sehr komplexen Test jedoch zusätzlich auch eine eindeutige Differenzierung zwischen Variante I und II möglich (Tabelle 6, Tabelle 32 und Tabelle 33).

Die Varianten I und II unterscheiden sich dabei hauptsächlich in ihrer Fähigkeit, verschiedene Aminosäuren zu verwerten. So zeigte Variante I generell eine bessere Nutzung von Valin, Arginin und Tryptophan, während diese Aminosäure nicht von allen Stämmen der Variante II (RZI-1, RZI-2 und RZI-3) assimiliert werden konnten. Auch bei der Verwertung von Glukosid zeigt die Stammreihe der Variante II inklusive aller getesteten Mastitisstämme eine wesentlich höhere Verwertungsrate. Als Hauptunterscheidungsmerkmal konnte aber die Nutzung der schwefelhaltigen Aminosäure Lysin festgestellt werden. Alle getesteten Mastitisstämme, die Variantenstämme RZII-1 bis 3 sowie der Referenzstamm SAG263-4 verwerteten Lysin, während die Variantenstämme RZI-1 bis 3 diese Aminosäure nicht nutzen konnten. In der besseren Aminosäureverwertung liegt eventuell ein Grund für die Pathogenität der Variante I. Mikroorganismen, welche die Fähigkeit besitzen, sich von einer Vielzahl organischer Stickstoffquellen, so auch von Aminosäuren zu ernähren, sind bessere Mikroorganismen ohne diese Fähigkeit. Dabei spielt die essentielle Aminosäure Lysin als einer der Grundbausteine von Strukturproteinen wie Kollagen und Fibrinogen eine bedeutende Rolle. Interessanterweise konnten die Algäe der Variante III keine Aminosäuren verwerten, wodurch sie sich zusätzlich zur obligat nicht vorhandenen Glycerol-Assimilation von der Stammreihe der Variante I und II unterscheiden ließen. Auch der Referenzstamm SAG263-8 zeigt ein

mit der Variante II identisches Assimilationsmuster. Somit waren innerhalb der Gruppe aller
 getesteter Stämme der Variante II biochemisch unterschiedlich feststellbar.
 Die den Varianten I und III zugeordneten Stämme zeigten ein einheitliches Bild innerhalb
 ihrer Variante. Innerhalb der Variante II waren jedoch keine Unterschiede feststellbar. So
 kann das Vorkommen von noch mindestens zwei Untergruppen vermutet werden, was sich
 besonders anhand der heterogenen Nutzungsmuster von Tryptophan und Glukosid belegen
 lässt. Die als Coatingantigen geprüften Referenzstämme SA G263-4 und SAG2021 zeigten
 ebenfalls Unterschiede in der Verwertung von Tryptophan und Valin. Der Mastitisstamm
 SAG2021 kann dies als C-Quelle nutzen, während das Darmisolat SAG263-4 dies nicht
 offenbarn kann. Somit fand sich ein biochemisches Kriterium, welches den Einsatz von
 SAG2021 als Coatingantigen für die ELISA nahelegt.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass sich anhand der Assimilation verschiedener
 Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen drei Varianten der Spezies *P. zopfii* biochemisch sicher
 identifizieren lassen. Variante III weist hier die deutlichsten Unterschiede zu den übrigen
 Vertretern der Spezies auf, während innerhalb der Variante II noch weitere
 Untergruppierungen vermutet werden können. Angesichts der deutlichen Unterschiede im
 Assimilationsverhalten sowie des tierart- bzw. krankheitsassoziierten Auftretens dieser
 Varianten erscheint es nunmehr auch auf der Basis unserer Untersuchung gerechtfertigt,
 künftig von verschiedenen Biotypen, den Biotypen 1, 2 und 3, oder von *P. zopfii* var. 1, 2
 oder 3 zu sprechen.

5.1.3 Serologischer Vergleich verschiedener *P. zopfii* -Isolate

Für die Entwicklung und Validierung serologischer Testsysteme für krankheitserregende
 Mikroorganismen ist die Kenntnis der Antigenstruktur sowie die Kenntnis der Immunantwort
 des infizierten Tieres auf den Erreger unverzichtbar. Dies gilt auch für den Versuch einer
 Immunprophylaxe. Diese Informationen lagen im Falle der Paratuberkulosemastitis des Rindes
 bisher noch nicht vor. Zur Schaffung einer Datenbasis wurde daher erstmalig die Antigenen
 Strukturen verschiedener Stämme von *P. zopfii* mittels einer Immuno-Blot-Analyse
 vergleichend untersucht. Hierbei erwiesen sich sowohl die Antigenaufarbeitung, die
 elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches als auch die anschließende Transfer der
 Algenproteine auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran als methodisch sehr aufwendig
 und unter präparativen Aspekten problematisch. Gründe hierfür sind wahrscheinlich die sehr

stabile zellulosehaltige Zellwände sowie das Vorkommen von anderen, die Elektrophorese behindernden Stoffen wie Proteoglycanen oder Lipoproteinen. Die Auswertung der einzelnen Immuno-Blots bestätigte die chromanhängende Auxanographie und mittels des kommerziell erhältlichen Identifikationssystems BBL-Crystal® vorgenommene Unterteilung von *P. zopfii* in verschiedene Untergruppen. Hierbei ließ sich sowohl die Stämme der auxanographisch ermittelten Varianten I und II als auch die der Variante III klar von den Stämmen der Variante IV abgrenzen. Neben unterschiedlichen variantenspezifischen Antigenen waren zusätzlich auch speziesspezifische Antigene feststellbar. Die Verwandtschaft der Varianten miteinander wird anhand der bei 33 kDa sichtbaren gemeinsamen Antigene deutlich (**Abbildung 2**). In **Abbildung 3** ist ein weiteres derartiges gemeinsames Antigen bei 100 kDa dargestellt. Als Erklärung für die Detektion gemeinsamer Antigene mit verschiedenen Molekulargewichten bei unterschiedlichen Experimenten kann der Transfer der Proteine aus dem Elektrophorese-Gel auf die Nitrozellulose- oder PVDF-Membran herangezogen werden. Große Proteine von 100 kDa benötigen hierfür wesentlich mehr Zeit als kleinere Proteine von 33 kDa. Der gleiche Proteingruppen ist daher schwierig, weil kleinere Proteine eine längere Transferdauer durch die Membran hindurchwandern und dann letztlich ebenfalls nicht mehr nachweisbar sind. Andererseits wird die Gesamtmenge an größeren Proteinmolekülen bei einer kürzeren Transferzeit nur teilweise auf die Membran transferiert. Aus diesen testimmanenten Übertragungsbedingungen könnten demnach die beobachteten Unterschiede in der Antigen-Detektion resultieren. Aus Gründen der Vergleichbarkeit erfolgt deshalb die Durchführung der in **Abbildung 2** dargestellten Immuno-Blots unter identischen Bedingungen, also parallel durchgeführte SDS-PAGEs sowie zeitgleich abgewickelter Blotting-Prozeduren. Unterschiedliche variantenspezifische Antigene waren in allen drei dargestellten Immuno-Blots der **Abbildung 2** nachweisbar. So zeigte Variante III mit den drei verwendeten Hyperimmunseren ein spezifisches Antigen bei 37 kDa. Variante II von *P. zopfii* dagegen wies ein derartiges Antigen bei 51 kDa auf, während bei Variante I außer den allen Varianten gemeinsamen antigenen Komponenten keine zusätzlich spezifischen Antigene zu finden waren. Die beiden Referenzstämme SAG 263-4 und SAG 2021 zeigten ein fast identisches Antigenmuster, wobei der Stamm SAG 263-4 jedoch bei 23 kDa einen Bandenfehler aufwies und die Signale von SAG 263-4 trotz gleicher Antigenmenge im Testgebnis schwächer erschienen als jene von SAG 2021.

Da die variantenspezifischen Antigene von allen drei eingesetzten Kaninchen-Hyperimmunseren (Anti-RZI-1, Anti-SAG 263-4 und Anti-RZIII-1) erkannt werden, handelt

es sich bei all diesen Komponenten um kreuzreagierende Immuno- und antigene Ursache hierfür könnten identische Epitope bei den verschiedenen variantenspezifischen Antigenen sein. Die biologische Funktion dieser Proteine kann dabei gleichwohl durchaus unterschiedlich sein.

Der Vergleich der Mastitisisolate mit Vertretern aller drei Varianten zeigte, dass sämtliche getesteten Mastitisstämme ein der Variante II entsprechendes Antigenmuster aufwiesen (**Abbildung 3**). Eine spezifische Bande der Variante II war in diesem Fall bei 105 kDa zu erkennen. Die Ursachen können, wie bereits erwähnt, unterschiedlichen Transferraten der Proteine zugeschrieben werden. Auffällig ist weiterhin, dass auch innerhalb der Variante II serologische Unterschiede auftraten (**Abbildung 2, Abbildung 3**). So wie zum Beispiel der Variantenstamm RZII-1 bei 48 kDa ein sehr deutliches Antigen auf. Unter den Mastitisstämmen zeigte die Stämme DA und LA bei 60 kDa ein zusätzliches spezifisches Antigen. Somit lassen sich die bereits anlässlich der biochemischen Untersuchung vermuteten Unterschiede innerhalb der Variante II von *P.zopfii* auch serologisch beweisen.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte eine weitergehende serologische Untersuchung der Varianten von *P.zopfii* sein. Hierbei sollten zahlenmäßig mehr Isolate aus Mastitiden, aus Tierhaltungen sowie aus der Umwelt untersucht werden. Um tiefer Einblicke in die Epidemiologie der Mastitis des Rindes zu erhalten, sollte dabei die Frage nach dem Vorkommen von Untergruppierungen innerhalb der Variante II sowie deren mastitisassoziiertes und geographisches Vorkommen im Mittelpunkt stehen.

Die vorliegende Arbeit untermauert somit das Vorkommen unterschiedlicher, serologisch voneinander klar abgrenzbarer Varianten von *P.zopfii*. Da dieses serologischen Varianten mit den biochemisch determinierten Varianten übereinstimmen, sollte in Zukunft nicht die Bezeichnung „Serotyp“ sondern „Vario“ für diese Untergruppen innerhalb der Spezies *P.zopfii* gewählt werden.

5.1.4 Genetischer Vergleich verschiedener Isolate von *P.zopfii*

Die endgültige Zuordnung der als Coating-Antigen für die ELISA-Testsysteme zur Auswahl stehenden Referenz-, Mastitis- und Variantenstämme erfolgte nach der genetischen Analyse dieser Isolate. Hierfür wurde die Sequenz der 18S rDNA ermittelt. Dieser Genomabschnitt kodiert für die Proteine der kleinen Untereinheit des Ribosoms. Sie hat bei allen eukaryotischen Organismen eine Länge von etwa 1800 Basenpaaren und ist sehr stark konserviert. Natürliche Mutationen dieses Genomabschnittes kommen daher nur äußerst selten vor. Durch Ermittlung dieser Gensequenzen ist daher ein Vergleich

verwandtschaftlicher Verhältnisse zwischen einzelnen Spezies oder Genotypen daher sehr gut möglich (DHOOCEtal. 1998, HEPPELLEtal. 1998).

Über die Sequenzanalyse konnte bewiesen werden, dass trotz erheblicher biochemischer Unterschiede, wie der fehlenden Glycerolassimilation von Variante III, alle untersuchten Stämme eindeutig der Spezies *P. zopfii* zugeordnet werden konnten. Eventuelle Varianten sind daher zwangsläufig immer innerhalb dieser Spezies anzusiedeln. Aus unseren Untersuchungen geht aber ebenso eindeutig hervor, dass sich insbesondere die Stämme der Variante II genetisch klar von den Varianten I und II abgrenzen lassen. Zwischen diesen beiden Varianten waren ebenfalls Unterschiede in der Nukleotidsequenz feststellbar, wenngleich diese auch wesentlich kleiner ausfielen. Mit einer Homologie von 99,4% zu den anderen beiden Varianten muss man Variante II als eigenständigen Genotyp von *P. zopfii* ansehen. Um diese Aussage auch für Variante I und II treffen zu können, wäre die Untersuchung einer noch größeren Anzahl von Isolaten notwendig. Sollten sich die geringfügigen genetischen Unterschiede jedoch auch für diese Stämme bestätigen, so wäre die Einstufung als eigenständige Genotypen auch bei diesen Varianten nötig. In jedem Fall sollte in Zukunft bei einer größeren Anzahl von Isolatendie Sequenzanalyse der gesamten 18S rDNA erfolgen, daher, falls vorhanden, gravierendere Unterschiede im zweiten Teilstück dieses Genomabschnittes gefunden werden könnten.

In weiterführenden Studien sollte zudem die Nutzung der Sequenzunterschiede für die Diagnostik und die Speziesidentifikation untersucht werden. Die Identifikation mittels Sequenzanalyse ist die sicherste, aber zur Zeit mit Abstand auch kostenintensivste Methode der genetischen Spezieszuordnung. Auf der Grundlage von bekannten Sequenzunterschieden könnte eine Zuordnung wesentlich einfacher, schneller und kostengünstiger erfolgen. Praktische Möglichkeiten hierfür wären zum einen die Entwicklung einer spezifischen diagnostischen PCR, mit Primerkombinationen, welche auf diesen Sequenzunterschieden beruhen. Eine erfolgreiche Amplifikation würde dann für das Vorliegen von *P. zopfii*, Variante II, in der Probe sprechen. Ein weiterer diagnostischer Einsatzmöglichkeit wäre die Spezies- oder Genotypenidentifikation mittels des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Hierbei werden die unspezifischen PCR-Produkte durch Restriktionsendonukleasen in unterschiedlich große Teilstücke zerlegt. Diese Teilstücke werden dann nach einer Elektrophorese sichtbar gemacht. Würde eine Restriktionsendonuklease ausgewählt, dass sie genau an einer für Variante II spezifischen Stelle des Genomes schneidet, so wird nur bei Isolaten der Variante II das entsprechende

DNA-Fragment sichtbar werden (DLAUCHY et al., 1999; MACHO und URT-DUBACH et al., 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen zusammenfassend den Schluss zu, dass drei tierartsspezifische Varianten (Biotypen) von *P. zopfii* existieren, welche biochemisch, serologisch und auch genetisch deutlich voneinander abgrenzbar sind. Aufgrund der ausgeprägten biochemischen, serologischen und eventuell auch genetischen Unterschiede sollte hier die Einordnung von Variante III als Subspezies von *P. zopfii* erfolgen. Die bereits früher anhand von phänotypischen Studien mittels Gegenstromelektrophorese (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1987), Auxanographie (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1985a) und der Fourier-Infrarot-Spektroskopie (SCHMALRECK et al., 1998) vorgenommene Einteilung in verschiedene Varianten konnte somit im wesentlichen bestätigt werden. Die Abgrenzung der Variante III gelang dabei bereits damals sehr gut. Eine Unterscheidung zwischen Variante I und II beruhte jedoch auf unsicheren Parametern und war somit nicht praktikabel. Eine klare Unterscheidung dieser beiden Varianten ist nunmehr mittels der in dieser Arbeit entwickelten Serodiagnostik, der neu eingeführten biochemischen Parametern und den ermittelten Unterschieden in der Gensequenz ebenfalls möglich. Die gefundenen Charakteristika der einzelnen Varianten belegen das Vorkommen mehrerer Subspezies innerhalb von *P. zopfii*, wobei sich Variante I und II besonders gut abgrenzen lassen.

Ein Hauptergebnis dieser Arbeit ist, dass in der Variante II von *P. zopfii* das ätiologische Agens für die Protothekenmastitis des Rindes gesehen werden kann. Für den Fall der Einordnung dieser Variante als Subspezies von *P. zopfii* wäre die Bezeichnung *Prototheca zopfii* subspecies *mastitogenes* daher ein geeigneter Nomenklaturvorschlag. Die Bedeutung dieser Variante für diesen seltenen humanmedizinischen Fall einer Protothekeninfektion kann nur vermutet werden, daher für eine größere Anzahl humanpathogener Isolate untersucht werden müsste. Im Interesse der Klärung der Ätiologie der Protothekenmastitis sowie des gesundheitlichen Verbraucherschutzes sollte der definitive Beweis für das Vorkommen der besagten Bio-, Sero- und Genotypen bzw. der Subspezies durch eine epidemiologische Untersuchung von Isolaten aus verschiedensten Habitaten und Ländern unterschiedlicher geographischer Lage erbracht werden. Schließlich sollte durch eine experimentelle Infektion von Rindern mit Vertretern der drei Varianten von *P. zopfii* die Bedeutung der Variante I bei der Protothekenmastitis des Rindes geklärt und die Erfüllung der Koch-Henleschen Postulate auch für diese Art speziesgeprüft werden.

5.2 Lokale und systemische Immunantwort bei Protothekenmastitis des Rindes

Die vorliegende Arbeit beschreibt die im Laufe einer na induzierte Immunantwort, wobei insbesondere die lokale und charakterisiert werden konnte.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass akut und chronisch infizierte Milchserum, wie auch im Blutserum eine signifikant höhere nicht infizierte Tiere. Eine klare Diskriminierung zwischen Milchkühen ist somit anhand der Antikörperantwort möglich.

Es zeigte sich, dass akut infizierte Milchkühe sowohl lokal und IgG₁) im Mittel signifikant höhere spezifische Antikörperaktivitäten aufwiesen als chronisch an Protothekenmastitis erkrankte Tiere. Gleichwohl wurde aber deutlich, dass auch einige der chronisch infizierten Kühe in sehr hohen die höchsten Werte (Extremwerte) für IgA ebenfalls in werden konnten. Solche Befunde decken sich mit den auch bei Infektionskrankheiten gefundenen Verhältnissen. Im Verlauf zumeist bereits kurz nach dem initialen Anstieg des Immunglobulin Anstieg von Immunglobulin G (und beim Rind auch von IgG₁ und IgA im Blut und an Drüsenepithelien wie dem des Euters steigt kann dann aber über längere Zeit auf hohem Niveau verbleiben. Diesem Grunde wären im akuten Stadium der Infektion mit Antikörpern in der Milch zu erwarten, während im Milch Antikörper vom Immunglobulinisotyp A dominieren sollten. Dies unsere Bestandsuntersuchungen in einem chronisch infizierten Bestand ein großer Teil dem mittels des IgA-ELISA nicht erkannt über den Nachweis von spezifischen IgG₁ in Milchserum identifiziert werden.

Über die Analyse der zeitabhängigen Induktion der drei unterschiedlichen Antikörpersorten war eine signifikante Diskriminierung zwischen nicht infizierten und chronisch infizierten Tieren möglich. Somit wird die Voraussetzung für die Nutzung dieser ELISA-Systeme in der Herdendiagnostik gegeben.

Die Untersuchung von IgG im Blutserum zeigte, dass auch nicht infizierte Tiere eine Antikörperaktivität von bis zu 38 EU aufweisen können. Dieser Befund (siehe auch

Abbildung 9, Spur 1 und 2) wird auch durch die in der Immunoblot-Analyse dargestellten

türlichen Protothekenmastitis systemische Antikörperantwort

ierte Milchkühe sowohl im Antikörperantwort aufwies als auch in infizierten und nicht infizierten

(IgG) wie auch systemisch (IgA) Aktivitäten aufwiesen als auch in chronisch infizierten Kühen in sehr hohen die höchsten Werte (Extremwerte) für IgA ebenfalls in diesem Infektionsstadium gemessen

vielen anderen chronischen einer Serokonversion kommt es zu einem nM-Spiegel zu einem

1). Der Antikörperspiegel von Tieren in der ersten Phase der Infektion, (PLAYFAIR, 1995). Aus

P. zopfii eher höhere IgG₁-Aktivitäten in der Milch von chronisch infizierten Tieren. Diese Annahmen werden durch den Befund bestätigt. Hier konnte

in akut infizierten Tieren und doch

unterschiedlichen Antikörpersorten war eine signifikante Diskriminierung zwischen nicht infizierten und chronisch infizierten Tieren möglich. Somit wird die Voraussetzung für die Nutzung dieser ELISA-Systeme in der

infizierte Tiere eine Antikörperaktivität von bis zu 38 EU aufweisen können. Dieser Befund (siehe auch

tellen

schwachen unspezifischen Signalen unterstrichen und lässt sich durch den häufigen generellen Erregerkontakt (im Bestand B bei 100% der untersuchten Kühe) erklären. Letztlich kann auch eine Kreuzantigenität mit Futterbestandteilen nicht ausgeschlossen werden. Gleichzeitig wurde aber deutlich, dass sich in Folge einer Infektion der bovinen Milchdrüse mit *P.zopfii* obligate spezifische lokale Antikörperantworten ausbilden. Dies wird durch die für beide Isotypen ermittelten niedrigeren Cutoff-Werte von jeweils 1 EU unterstrichen. Zudem ließ die Befunde der Immuno-Blot-Analyse im Milchserum einer kulturell und klinisch *Prototheca*-negativen Milchkuh keinerlei unspezifische Signale erkennen. Wie letztlich auch die Auswertung und Validierung der ELISA zeigte, ist somit insbesondere der Nachweis von IgA und IgG im Milchserum für die Identifikation von *P.zopfii*-infizierten Tieren geeignet. Nicht so eindeutige Verhältnisse liegen bei ehemals infizierten Milchkuhen mit klinischen Zeichen einer chronischen Mastitis, aber zum Untersuchungszeitpunkt negativen Kulturbefund vor. Während die systemische IgG-Antwort dieser Tiere der Antikörperantwort nicht infizierter Individuen entspricht, weisen 50% (IgA) und 39% (IgG) dieser chronisch infizierten, zum Untersuchungszeitpunkt aber kultur negativem Kühen eine meist signifikant über dem Grenzwert liegende Antikörperaktivität im Milchserum auf. Eine Interpretation dieser Befunde wäre derzeit spekulativ, da der tatsächliche Infektionsstatus dieser Tieren anhand von Langzeitstudien (intermittierendes Ausscheidertum) oder von *Post mortem*-Untersuchungen (kulturelle Untersuchung von Milchdrüsen- und Euterlymphknotengewebe sowie pathohistologischer Nachweis mittels PAS-Färbung) feststellbar wäre. Bei solchen Tieren könnte es sich um intermittierende Erregerausscheider handeln, welche - wie in Bestand B gezeigt und von (SCHICK und KUTZER, 1982) beschrieben bei der bovinen Protothekenmastitis in gehäuftem Anzahl vorkommen. Wie auch bei vielen anderen persistierenden, bakteriellen, viralen oder pilzbedingten Infektionen müsste insbesondere die spezifische IgA-Konzentration bei solchen Tieren über einen längeren Zeitraum auf erhöhtem Niveau verbleiben (GRONBERG et al., 1989; HEESEMAN und KARCH, 2001; LARSEN et al., 2001). Bei Tieren ohne erhöhte spezifische Antikörperaktivität könnte es sich in diesem Falle um Rekonvaleszenten handeln, welche immunologisch in der Lage waren, die Infektion zu beenden (PLAYFAIR, 1995). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass auch Kühe mit einer erhöhten Antikörperaktivität die Infektion zwar bereits überwunden haben, spezifische Antikörper jedoch noch nachweisbar sind.

Letzterer Befund ist insbesondere diagnostisch bei der Identifizierung von persistent infizierten, intermittierend die Erreger ausscheidenden Milchkühen interessant. Zur Klärung dieses Sachverhaltes müssten weiterführende Studien mit experimentell infizierten Tieren sowie Langzeitstudien in endemisch infizierten Milchviehbeständen durchgeführt werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auch auf den Infektionsstatus und die Antikörperantwort trockenstehender und frisch abgekalbter Kühe gelegt werden.

Anlässlich der Untersuchung der lokalen zellulären Immunantwort bei der Protothekenmastitis des Rindes fand sich eine signifikante Unterschied der lokalen zellulären Erregerabwehr zwischen den einzelnen Infektionsstadien. Gleichzeitig korrelierte auch die lokale zelluläre Immunantwort unterschiedlich stark mit der systemischen und lokalen Antikörperantwort.

Der Vergleich der Gesamtzahl der in der Milch enthaltenen somatischen Zellen von Milchkühen mit akutem und chronischem Infektionsstadium mit nicht infizierten Tieren machte deutlich, dass sowohl zwischen akut infizierten und chronisch infizierten Tieren wie auch zwischen infizierten und nicht infizierten Kühen erhebliche Unterschiede vorliegen. Anhand dieser Befunde war auch eine Unterscheidung zwischen infizierten Tieren und nicht infizierten Tieren möglich. Dies eröffnet in Zukunft die Möglichkeit, eine Zellzahlbestimmung der Milch von Problembeständen durchzuführen, um bereits vor einer serologischen oder mikrobiologischen Untersuchung Hinweise auf das Vorliegen einer Protothekeninfektion bei bestimmten Tieren zu erlangen.

Ehemals infizierte, zum Untersuchungszeitpunkt kulturell negative Kühe unterschieden sich hinsichtlich des Gehaltes an somatischen Zellen in der Milch von den eutergesunden, nicht infizierten Milchkühen. Eine Erklärung hierfür ist im Fehlen des erregerbedingten Immigrationsstimulus für das Einwandern der Entzündungszellen in die Milch zu suchen. Auch die Persistenz von Algenzellen in den Makrophagen mit der zeitgleich auftretenden Abkapselung der Algen im Eutergewebe führt dazu, dass insbesondere die zelluläre Infektionsabwehr bei der Eliminierung der Erreger wirkungslos bleibt. Dazudem durch die ausbleibende Lyse der Erreger im Phagozytosome wahrscheinlich keine oedemäre Immunantwort und eine schwache Antigenpräsentation an den Makrophagenoberfläche erfolgt, führt dies zum Ausbleiben einer effektiver humoralen und zellulärer Immunität (PLAYFAIR, 1995).

Die Auswertung der Untersuchung des Gehaltes der Milch an somatischen Zellen machte deutlich, dass zwischen der lokalen Antikörperantwort und dem Zellgehalt der Milch eine

starke Korrelation besteht, während dieser Zusammenhang beim Verhältnis des Zellgehaltes der Milch zu systemischen Antikörperantwort wesentlich schwächer ausgeprägt ist. Die Fraktion des somatischen Zellers in der Milch setzt sich neben abgestoßenen Epithelzellen des milchableitenden Gangsystems hauptsächlich aus Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zusammen (RIOLLET et al., 2000; SCHMALTZ et al., 1996). Bei einem großen Teil der Lymphozyten handelt es sich um Plasmazellen, welche aktiv spezifische Antikörper in die Milch abgeben (NICKERSON, 1985; SORDILLO et al., 1990; WATSON, 1987). Ein Anstieg der Zahl somatischer Zellen geht demnach direkt mit einem Anstieg der in der Milch enthaltenen Antikörper einher, wodurch die gute Korrelation dieser Parameter erklärbar wird. Dem gegenüber korreliert die systemische Antikörperantwort gegen die Aggenur gering mit der Zahl der Entzündungszellen in der Milch. Dieser Befund war zu erwarten, da die von den Plasmazellen in die Milch abgegebenen spezifischen Antikörper der Isotypen IgA und IgG in sehr geringen Mengen zu finden sind. Die absolute Zahl zirkulierender Entzündungszellen, wie Makrophagen und Lymphozyten, welche aus der Milch und dem Eutergewebe wieder in das Kreislaufsystem zurückwandern (das sogenannte „homing“), gering. Solche Zellen könnten dann allerdings durch Antigenpräsentation oder als B- und T-Gedächtniszelle eine systemische Antikörperantwort induzieren (PLAYFAIR, 1995). Die doch geringe Korrelation zwischen der Zahl der in der Milch enthaltenen Erreger und der lokalen und systemischen Antikörperantwort lässt sich damit erklären, dass die Zahl der in der Milch zu findenden Erreger aufgrund der Persistenz- und Abkapselungsvorgänge im Eutergewebe nicht die tatsächliche Erregerzahl im Euter repräsentiert.

5.3 Entwicklung und Validierung der ELISA-Systeme

5.3.1 Entwicklung von indirekten ELISA-Testsystemen

Für die Charakterisierung der induzierten lokalen und systemischen Antikörperantwort bei der Mastitis des Rindes konnte ein serologisches Herden- und Einzeltierdiagnostikum entwickelt werden.

Im Vorfeld war es natürlich unerlässlich, eine Entscheidung über den Typ des zu entwickelnden ELISA zu treffen. Die Wahl fiel hierbei auf ein indirektes ELISA-System. Dies basiert auf der Bindung der Aggenur an eine isolierte Oberfläche mit nachfolgender

Detektion über Probandenseren. Der Vorteil gegenüber dem Sandwich-ELISA liegt in der Einfachheit des Systems und im Verzicht auf die spezifischen „Fang“-Antikörper, welche in der Regel erst infolge eines Tierversuches gewonnen werden können. Durch Einsatz dieser „Fang“-Antikörper weisen Sandwich-ELISA gegenüber indirekten ELISA-Systemen jedoch eine höhere Spezifität auf (JOHNSTONE und THORPE, 1987; KEMENY, 1994). Die Validierung der entwickelten Diagnostiksysteme im chronisch infizierten Testbestand Bließ aber den Schluss zu, dass auch der indirekte ELISA zum Nachweis der Immunglobuline A und G in Milchserum mit Spezifitäten von rund 95 Prozent ausreicht. Die Verwendung verschiedener ELISA-Plattentypen, verschiedener Antigenpräparationen und unterschiedlicher Antigenkonzentrationen zeigte, dass der für den Untersuchungszweck am besten geeignete Test auf hydrophilen Mikrotiterplatten des Typs Maxisorp[®] (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) und einem Vollzellantigen von *P. zopfii* in der Antigenkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml basierender indirekter isotypspezifischer ELISA ist. Darüber hinaus erwies sich die Blockierung unspezifischer Bindungen mittels Gelatine als vorteilhaft. Die Einhaltung dieser testimmanenten Parameter erwies sich auch schon in anderen, auf einem indirekten ELISA basierenden serologischen Testsystemen als zielführend (JARK, 1996; RAZA, 1998). Bei Mikroorganismen, welche der Phagozytose entgegenstellen und die, wie *P. zopfii*, im Gewebe und darüber hinaus auch intrazellulär persistieren können, findet entweder in der überwiegenderen Präsentation der Antigene an der Erregeroberfläche statt, oder es handelt sich bei den Antigenen um Stoffwechselprodukte und sezernierte Toxine. Die Immuno-Blot-Analyse verschiedener Antigenpräparationen zeigte dann auch, dass alle wesentlichen immunogenen Komponenten bereits bei einer Suspendierung der Erreger in destilliertem Wasser oder nach Gefrierbehandlung freigesetzt werden. Dies läßt darauf schließen, dass es sich dabei zum großen Teil um lösliche, relativ lose an die Zelloberfläche gebundene Oberflächenantigene handelt. Übereventuell vorkommende sezernierte Toxine und Stoffwechselprodukte liegen im Falle von *P. zopfii* keinerlei Erkenntnisse vor. Vor diesem Hintergrund stellt die Verwendung des Vollzellantigenes von *P. zopfii* die Methode der Wahl zur Entwicklung eines sensitiven ELISA dar. Durch die bei indirekten ELISA-Systemen übliche Blockierung der unspezifischen Bindungen mit Gelatine gelang auch die Etablierung eines genügend spezifischen Diagnostikums. Die als optimal ermittelte Antigenkonzentration von 1×10^7 Algenzellen/ml ist als diejenige Konzentration anzusehen, bei der alle freien Bindungsstellen der Oberfläche der verwendeten Mikrotiterplatten abgesättigt sind und das Antigen im Überschuß vorliegt.

Wieder Vergleich der zwei *P. zopfii* -Referenzstämme SAG263-4 und SAG2021 in den ELISA-Systemen zeigte, ist das Mastitis isolat SAG2021 offenbar in der Lage, spezifische Antikörper voran Prototheken mastitis erkrankten Rindern mit höherer Affinität und Avidität zu binden, als dies bei dem humanen Isolat SAG263-4 der Fall ist. Die bereits bei der Speziesdifferenzierung aufgezeigten serologischen Unterschiede innerhalb der Variante II konnten somit auch im ELISA bestätigt werden. Aufgrund aller dieser Befunde wurde schließlich der Stamm SAG2021 als universelle ELISA-Antigen eingesetzt.

Die Untersuchung zu serologischen Kreuzreaktionen von *P. zopfii*, Variante II, und *Cryptococcus neoformans* mit spezifischen Kaninchen-Hyperimmunseren zeigte, dass zwischen dem Antigen von *P. zopfii* SAG2021 und dem Anti-*Cryptococcus neoformans* -Hyperimmunserum keinerlei Kreuzreaktivität besteht. Prinzipiell erwies sich die Auswahl des für diese Untersuchung heranzuziehenden Mastitis erregers als schwierig, da die Gattung *Prototheca* als Vertreter der Grünalgen phylogenetisch sehr weit entfernt von allen anderen Mastitis erregern gesiedelt ist und daher generell keine Kreuzreaktivität mit Futter- (Pflanzen)-Bestandteilen zu erwarten war. Aufgrund von Ähnlichkeiten im Zellwandaufbau, in der Klinik und der Pathogenese wurde daher letztendlich *C. neoformans* als Vertreter der Sproßpilze (Hefen) für diese Spezifitätsprüfung ausgewählt. Weitergehendes diesbezügliches Untersuchungen müssten anhand von spezifischen Hyperimmunseren gegen andere typische Mastitis erregere erfolgen, woraufhin Anbetracht der für notwendigen Tierversuche und dem geringen Erkenntnisfortschritt der dann zu generierenden Daten in der vorliegenden Arbeit jedoch verzichtet wurde. Gestärkt wurde diese Entscheidung durch die Befunde eines sehr niedrigen Schwellenwertes für ein positives Testergebnis sowie durch die sehr geringe Zahl falsch-positiver Reaktionen. Dies deutet darauf hin, dass generell auch mit anderen Mastitis erregern eine geringe oder gar keine Kreuzantigenität besteht.

5.3.2 Bewertung der entwickelten ELISA-Testsysteme

Für den Einsatz eines diagnostischen Testsystems ist es unerlässlich, zuerst die Reproduzierbarkeit und die Empfindlichkeit des Testes zu ermitteln und an den Schwellenwert festzulegen, zu können, ab dem ein Tier als positiv getestete gilt.

Die gute Reproduzierbarkeit unserer Testsysteme konnte durch die Ermittlung der Intra-Assay- und der Inter-Assay-Variationen für alle drei Antikörper-Iso- sotypen gezeigt werden. Beide Testsysteme, die der Bestimmung der lokalen Antikörper der Iso- typen IgA und IgG im Milchserum dienen, wiesendabei ein wesentliches niedrigeres Intra-Assay- und Inter-Assay-

Variation auf, als dies beim ELISA zur Bestimmung von spezifischen IgG im Serum der Fall war. Die Gründe hierfür sind außer in systematischen und individuellen Fehlerquellen auch in der Antikörperantwort selbst zu suchen. Wie aus **Abbildung 8** und **Abbildung 9** ersichtlich ist, sind auch in Blutserum nicht infizierte Rinder Antikörper, welche mit den Antigenen von *P. zopfii* reagieren können, vorhanden. In den Milchseren ist dies hingegen offensichtlich nicht der Fall. Die Frage, ob es sich bei diesen Befunden um durch den häufig auftretenden enteralen Erregerkontakt induzierte spezifische Antikörper handelt, oder aber um kreuzreagierende Antikörper, welche ursprünglich gegen andere Antigene (andere Krankheitserreger oder Futterbestandteile) gebildet worden sind, kann hier nicht abschließend beantwortet werden.

Zur Ermittlung der Schwellenwerte für ein positives Testergebnis wurde ein für die Evaluierung von ELISA-Systeme gebräuchliches Verfahren gewählt (JARK, 1996). Durch Addition des dreifachen Wertes der Standardabweichung der Antikörperaktivitäten aller kulturell und klinisch negativen Tiere mit dem Mittelwert dieses Parameters wird gewährleistet, dass auf diesem Schwellenwert basierende Testsysteme eine hohe Spezifität aufweisen. Die Auswertung der für die einzelnen Isotypen vorgelegten Ergebnisse erbrachte Cutoff-Werte von 38 EU für den ELISA zur Detektion von IgG in Blutserum sowie jeweils 1,0 EU für den Nachweis von IgA und IgG₁ im Milchserum. Hier wird nochmals deutlich, dass beim Nachweis von IgG im Serum von klinisch gesunden und kulturell negativen Tieren eine erhöhte unspezifische Antikörperaktivität zu verzeichnen ist, die sich dann in den hohen Cutoff-Wert von 38 EU manifestiert.

Mittels der berechneten Schwellenwerte konnten dann die Bestimmungen der Sensitivität und der Spezifität erfolgen. Hierbei zeigte es sich, dass der ELISA zum Nachweis von IgG im Blutserum aufgrund des hohen Cutoff-Wertes eine Spezifität von 100 Prozent aufweist, und dass dieser Test somit praktisch keine falsch-positiven Tiere identifiziert. Mit 94,4% und 96,3% wiesen jedoch auch die beiden auf Milchserumantikörpern basierenden ELISA-Systeme eine für Praxiszwecke ausreichend hohe Spezifität auf. Der offensichtliche Vorteil der letztgenannten Diagnostik besteht aber in den wesentlich höheren Sensitivitäten von 96,3% (IgA) und 92,0% (IgG₁) gegenüber 81,5% beim Nachweis von spezifischem IgG im Blutserum. Bei Bestandssanierungen von endemisch auftretenden, meist chronischen Infektionskrankheiten, wie der Protothekenmastitis, ist aber besonders eine hohe Sensitivität von Bedeutung. Mit 81,5% liegt die für den IgG-ELISA im Blutserum ermittelte Sensitivität im Bereich, wie sie auch BLASCHKE-HELLMESSEN (1987) bei der von ihr entwickelten

Gegenstromelektrophorese aufweisen konnte. Somit wies sich beide Testsysteme bei der Diagnostik spezifischer Anti- *Prototheca*-Antikörper im Blutserum als gleich sensitiv. Davon JENSEN et al. (1998) entwickelt. ELISA zur Diagnostik von spezifischen IgG im Blutserum ist dagegen nicht annähernd so sensitiv wie das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem. Mittels jenes Testes konnten die Autoren zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren keinen signifikanten Unterschied feststellen.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten ELISA-Systeme eine für Praxiszwecke ausreichend hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen. Hierbei wies sich die Nachweise von IgA und IgG im Milchserum als die Diagnostika mit der größten Sensitivität, und sie sollten deshalb bevorzugt für Bestandssanierungen eingesetzt werden.

5.3.3 Validierung der ELISA-Systeme

Diagnostische Testsysteme für den Einsatz in der Praxis müssen von ihrer flächendeckenden Einführung aus ausreichend validiert werden. Hierzu werden sie je nach Anwendungsbereich unter Feldbedingungen an Proben von natürlich infizierten oder erkrankten Personen oder Tieren durchgeführt und mit etablierten Testsystemen sowie den bei der Entwicklung des Testes ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten verglichen. Dafür die Diagnostik der *Prototheca* mastitis bisher lediglich der kulturelle Erregernachweis mittels Plattenkultur als anerkanntes Verfahren zur Verfügung stand, wurde diese Methode dann auch als Vergleichsstandard („Goldstandard“) für die Validierung gewählt. Die Untersuchungen erfolgten an Milchkuhen des hochgradig endemisch von *Prototheca* mastitis betroffenen Bestandes B. Hier sollte zudem versucht werden, durch eine Kombination von serologischer und kultureller Diagnostik eine Sanierung dieses hochgradig infizierten Milchviehbestandes einzuleiten. Darüber hinaus dient die Befunde aus der dreimaligen Untersuchung dieses Bestandes im Abstand von jeweils sechs Monaten der Gewinnung neuer Erkenntnisse zum Infektionsverhalten von *Prototheca*, insbesondere der Herden-Inzidenz und dem Ausscheidungsverhalten bei dieser Algeninfektion.

Aufgrund des Befundes, dass beide, zur Diagnostik spezifischer Antikörper im Milchserum entwickelten ELISAs annähernd gleiche Sensitivitäten und Spezifitäten aufwiesen, und dass darüber hinaus auch absolut größere Antikörpergehalte an IgA zu erwarten waren (Milchserumverdünnungen für den IgA-Nachweis 1:100, für IgG dagegen 1:50), sollte auch

Bei diesen Bestandsuntersuchungen ursprünzlich der Nachweis von Anti- *Prototheca*-IgA im Milchserum erprobt werden. Anlässlich der ersten Bestandsuntersuchung, besonders aber bei der Untersuchung demnach dem Abkalben frisch zur Herde hinzukommenden Tiere zeigte es sich jedoch, dass einige wenige Tiere die Erreger in großen Mengen mit der Milch ausschieden, gleichwohl aber über den Nachweis von spezifischem IgA nicht sicher identifiziert werden konnten. Die sichere Identifizierung gelang hingegen dann über den Nachweis von spezifischem IgG₁. Bei einem Großteil dieser Tiere dürfte es sich um frisch infizierte Kühe handeln oder aber um solche Milchkuhe, bei denen die Infektion mit der neuen Laktation wieder aufflammte. Da es, wie anlässlich der Untersuchung zur lokalen Antikörperantwort gezeigt bei solchen Tieren erst zu einem zeitlich verzögerten IgA-Anstieg kommt, ist der negative serologische Befund bei diesen Probanden erklärbar. Diese Tiere zeigen aber schon zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion eine erhöhte IgG₁-Aktivität, wodurch sie an mittels des IgG₁-ELISA meist identifizierbar sind. Um auch solche Kühe in der Bestandsuntersuchung serologisch sicher identifizieren zu können, wurden deshalb sämtliche Tiere des Bestandes während der zweiten und der dritten Bestandsuntersuchung auf spezifische IgA und IgG₁ hin untersucht.

Auf dieser Basis konnte festgestellt werden, dass der ELISA zum Nachweis von IgA im Milchserum bei der ersten Bestandsuntersuchung mit einer Sensitivität von 98% und einer Spezifität von 90,5% annähernd die Kenndaten aufwies, wie sie auch bei der Entwicklung des Tests im Bestand ermittelt werden konnten (Tabelle 22). In der zweiten Untersuchung wiesen jedoch sowohl der IgA-ELISA als auch der IgG₁-ELISA eine deutlich niedrigere Sensitivität auf. Bei der dritten Bestandsuntersuchung lagen die Kenndaten dann aber wieder deutlich höher. Die Ursachen hierfür sind wahrscheinlich multifaktoriell. Einerseits kann der sehr niedrige Cutoff-Wert von jeweils 1 EU bei Schwankungen der Versuchsbedingungen dazu führen, dass infizierte Tiere mit sehr niedriger Antikörperantwort mittels des Tests nicht erkannt werden. Ein weiterer möglicher Grund könnte sein, dass aufgrund der teilweise nur geringen Anteile an infizierten Tieren zum Zeitpunkt der zweiten Untersuchung der Anteil frisch infizierter Milchkuhe, bei denen insbesondere der Nachweis von IgA im Milchserum eine diagnostische Lücke aufweist, deutlich höher lag als in der ersten Bestandsuntersuchung. Dies ist bei der dritten Bestandsuntersuchung die Zahl der infizierten Tiere deutlich gesunken war (die Inzidenz erniedrigte sich um mehr als die Hälfte) wiesen beide ELISAs rechnerisch wieder eine Sensitivität und Spezifität auf, die auch berücksichtigt werden, dass bei denjenigen Tieren, die nur sehr wenige Erreger in der Milch aufwiesen, eventuelle kleine

Kontamination der Milchprobe mit Faeces vorliegen könnte, da alle Kotsämtliche getesteteter Kühe *Prototheca*-positiv war. Trifft diese Annahme zu, würden die einzelnen ELISAs tatsächlich eine höhere Sensitivität aufweisen, da ja für ihre Berechnung die kulturelle Untersuchung als Goldstandard verwendet worden ist. Bei zukünftigen Untersuchungen ist deshalb im Zweifelsfalle die wiederholte kulturelle Untersuchung einer zweiten, steril entnommenen Milchprobe ratsam.

Im Verlauf aller drei Untersuchungszyklen konnte festgestellt werden, dass die Zahl der Tiere, welche serologisch deutlich positiv getestet werden konnten, bei denen aber kulturell keine Erreger nachweisbar waren (falsch-positiv getestete) deutlich höher war als die Zahl der Tiere, die in einer kulturellen Erreger nachweis aufwiesen, die serologisch aber nicht identifiziert werden konnten (falsch-negativ getestet) (Tabelle 18). Anlässlich der zweiten und der dritten Untersuchung wiesendiesefalsch-positivenTieresogasi gnifikanterhöhteIgA-sowieIgG 1-Aktivitäten auf. Dabei der Langzeitbeobachtung von 66 infizierten Kühen der Anteile der intermittierenden und der persistierenden Erreger-Ausscheider bei etwa 75 % lag, muß vermutet werden, dass es sich bei einem großen Teil dieser falsch-positiven Milchkühe tatsächlich um korrekt identifizierte, intermittierende Erreger-Ausscheider handelt. Bei diesen Individuen erwiesen sich demnach die eingesetzten ELISA-Systeme dem kulturellen Erreger nachweis als überlegen. Da die Zahl falsch-positiver Kühe teilweise beträchtlich größer ist als die Zahl der falsch-negativen Tiere, liegt die Vermutung nahe, daß die tatsächliche Sensitivität der geprüften ELISA-Testsysteme über der des kulturellen Erreger nachweises liegt. Eine abschließende Antwort auf diese Frage wäre aber erst nach einer kontrollierten experimentellen Infektion von Milchkühen möglich. Ein zweiter Lösungsansatz wären Untersuchungen, bei denen sowohl die kulturelle Erregerisolierung wie auch der serologische Erreger nachweis aus der Milch mit einem anderen sicheren Goldstandard, wieder Kombination von Pathohistologie und kulturellem oder genetischem (PCR) Erreger nachweis aus den Eutergewebe verglichen werden müßte. Dessen ungeachtet läßt sich zusammenfassen, daß dies die beste Methode zur Identifikation von *Pzopfi*-infizierter Tiere in der Kombination von serologischer und kultureller Untersuchung besteht. Die serologische Untersuchung weist in der Frühphase der Infektion und die kulturelle Untersuchung bei intermittierenden Erreger-Ausscheidern diagnostische Unsicherheiten auf. Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß aber bereits die serologische Untersuchung für sich alleine genommen zu einer Sensitivitätssteigerung bei der Identifikation infizierter Tiere führt.

Die Nutzung eines gereinigten und/oder gentechnisch in einem anderen System (z.B. *Echerischia coli*) exprimierten Antigens als Coating-Antigen für die ELISA könnte in Zukunft zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung führen. Dann wäre insbesondere die frischen infizierten Tiere sicherer zu identifizieren. Im Gelände des, dann wäre der alleinige Einsatz einer Kombination aus serologischem Nachweis von spezifischem Anti-*Prototheca*-IgA und -IgG im Milchserum der sicherste Weg, eine *P.zopfii*-Infektion im Herdenmaßstab zu diagnostizieren.

In dieser Arbeit entwickelten ELISA-Systeme ermöglichen darüber hinaus eine deutliche Reduktion des zeitlichen und nach einer Automatisierung auch des personellen und finanziellen Aufwandes bei der Diagnostik der bovinen Protothekenmastitis. So ist es mittels der entwickelten ELISA möglich, Milchkühe innerhalb von etwa 6 h serologisch auf eine Infektion mit *P.zopfii* hinzu untersuchen, während über den kulturellen Nachweis mittels Plattenkultur eine Diagnose erst nach 48 bis 72 Stunden erst erkannt werden kann.

5.4 Zum Verlauf der Protothekenmastitis des Rindes im Bestand

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine serologische und kulturelle Langzeitbeobachtung der Protothekenmastitis des Rindes im Herdenmaßstab durchgeführt. Es gelang, das Erregerausscheidertum/-Trägertum als einen möglichen Verlauf der Protothekenmastitis zu charakterisieren.

Die prägnantesten Resultate dieser Untersuchung sind wohl in der unerwartet hohen Prävalenz und Inzidenz der Infektion in einem endemisch infizierten Bestand sowie im außerordentlich hohen Prozentsatz persistenter infizierter Tiere zu sehen.

Mit 20,5 % kulturell oder 25,5 % serologisch positiver Tiere in der zweiten Bestandsuntersuchung wies der untersuchte Milchviehbestand B die höchsten, je in der Literatur beschriebenen Prävalenzen auf (COSTA *et al.*, 1996; GORR, 1982; SCHUSTER und SCHUSTER, 1982). Eine Neuinfektionsrate mit einer Inzidenz von 9,7% (kulturell) oder 12,8% (für die serologische Untersuchung) über einen Zeitraum von sechs Monaten ist ebenfalls bemerkenswert hoch. Diese Befunde belegen somit die Schwere und das Ausmaß des vorliegenden endemischen Infektionsgeschehens. Sie weisen aber auch darauf hin, dass *P. zopfii* eine größere Kontagiosität und Pathogenität besitzt, als bisher allgemein angenommen. Trotz des gewissenhaften Einsatzes von iodhaltigen Zitzendippmitteln, der strengen Separation infizierter Individuen und sogar trotz des Einbaues eines modernen

Fischgräten-Melkstandes im Anschluß an die zweite Herdenuntersuchung, gelang es nicht, weitere Neuinfektionen von Milchkühen im Bestand zu verhindern. Die hohen Inzidenzraten von 9,7% (serologisch 2,8%) anlässlich der zweiten Herdenuntersuchung und von 4,4% (serologisch 8,0%) bei der dritten Herdenuntersuchung legen die Vermutung nahe, dass bisher noch nicht bekannte Einflussfaktoren außerhalb der eigentlichen allgemeinen Melkhygiene bei dieser Infektion eine Rolle spielen könnten. Tatsächlich könnte die Variante II von *P. zopfii* eine höhere Kontagiosität und Pathogenität aufweisen, als bisher angenommen. Die Mehrzahl der experimentellen Infektionsversuche, auf denen die allgemeine Vermutung einer sehr geringen Pathogenität beruht, erfolgte mit *P. zopfii*-Stämmen, welchen nicht aus Rindermastitiden isoliert worden waren (DECAMARGO et al., 1980; HORIUCHI et al., 1991; SCHIEFER und GEDEK, 1968; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977). Wurde hingegen Mastitis isolat eingesezt, war in der Regel auch mit relativ geringen Erregerzahlen eine klinische Mastitis induzierbar (BERGMANN, 1993b; JENSEN und AALBAEK, 1994; LERCHE, 1952; MCDONALD et al., 1984b). Die Variante II von *P. zopfii* weist gegenüber den Varianten I und III eine höhere Resistenz gegenüber Umweltfaktoren wie Austrocknung, pH-Wert und Salzgehalt auf (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1985a). Demzufolge ist die Tenazität dieser Variante erhöht. Da der Kot sämtlicher untersuchter Tiere kulturell *Prototheca*-positiv war, ist ein beträchtlicher Infektionsdruck in diesem Bestand wahrscheinlich. Dies könnte dann möglicherweise auch infolge anderer prädisponierender Faktoren zu einer Infektion führen. Zur Klärung der Frage nach Unterschieden hinsichtlich Kontagiosität und Pathogenität zwischen den verschiedenen Varianten müssten verschiedene Varianten von *P. zopfii* in einer vergleichenden experimentellen Infektionsstudie mit Milchrindern geprüft werden. Als weiterer, bisher weitestgehend unbeachteter Aspekt, kommt auch ein zusätzlicher, bisher unbekannter Infektionsweg als Ursache für das starke endemische Infektionsgeschehen in Frage. Zwar gilt die Infektion über den Strichkanal und durch Mikroläsionen der Zitzenhaut als Hauptinfektionsweg. Studien zur Abklärung eines hämatogenen oder lymphogenen Infektionsweges sowie die Prüfung vertikaler Übertragungswege über die Kolostralmilch oder über ein intrauterines Infektionserfolgter bisher nicht. Überfordert dieser offenen Fragen läßt sich zusammenfassend fordern, dass für eine erfolgsversprechende Bestandssanierung alle als positiv identifizierten Tiere strengstens separiert und möglichst schnell aus dem Bestand entfernt werden müssen. Desweiteren erscheinete eine Verkürzung der Untersuchungsintervalle auf 3 Monate sinnvoll, um sooner infizierte Tiere möglichst frühzeitig identifizieren zu können.

5.5 Zum Verlauf der Erregerausscheidung bei der Protothekenmastitis

Die dreimalige Untersuchung von 6 infizierten Kühen über einen Zeitraum von insgesamt 2 Monaten gab Aufschluß über den typischen natürlichen Verlauf der Protothekenmastitis in Verbindung mit dem Erregerträger und detailliert charakterisiert werden. Anhand unserer Studie wurde deutlich, dass die überwiegende Teile der Milchkuh über längere Zeiträume hinweg persistent infiziert sind und die Algen permanent über die Milchausscheidung zeigen sich außerdem, dass auch die intermittierende Erregerausscheidung bei persistent infizierten Kühen als typisch angesehen werden muß.

Der chronische Charakter der Protothekose ist ebenso bekannt wie die Tatsache, dass viele infizierte Tiere auch noch nach längerer Zeit die Erregerausscheidung und dass dies nicht nur kontinuierlich, sondern zum Teil auch auf intermittierende Art und Weise geschieht (SCHICK und KUTZER, 1982). Der Anteil dieser persistent infizierten Tiere an Gesamtgeschehen war allerdings bisher unbekannt.

In Lauf unserer Studie zeigt es sich, dass nur ein kleiner Teil (18%) der Milchkuh der Lage war, die Algeninfektion zu beenden. Der Anteil der tatsächlich rekonvaleszenten Individuen liegt wahrscheinlich abemoch deutlich niedriger, da 45,4% dieser Tiere bei der abschließenden Untersuchung noch spezifische Antikörper aufwiesen. Unter diesen Antikörperträgern waren wahrscheinlich auch noch persistent infizierte, die Erreger intermittierend ausscheidende Tiere. Mit 70,5% gehörte der weitaus größte Teil der infizierten Kühe zu der Gruppe der permanenten Erregerausscheider, also jenen Tieren, die nach dem ersten kulturellen Erregernachweis zu jedem Untersuchungszeitpunkt kultivierbare *P. zopfii* in der Milch aufwiesen. Interessanterweise wurde bei 21,0% dieser Tiere bereits sechs Monate vor dem ersten kulturellen Erregernachweis ein teilweise erheblicher Höhepunkt der Antikörperaktivität festgestellt. Es kann deshalb vermutet werden, dass es sich bei solchen Tieren ebenfall sind überwiegender Zahl der Fälle um intermittierende Erregerausscheider handelt. Dabei 4,9% der infizierten Milchrinder in intermittierendes Ausscheidertum direkt kulturell nachgewiesen werden konnte, sind somit mindestens 76% aller untersuchten Individuen als über einen Zeitraum von zwölf Monaten persistent infiziert anzusehen. Schließlich dürfte es sich auch bei jenen 6,6% an Milchrindern, welche bei negativem kulturellen Befund zu jedem Untersuchungszeitpunkt spezifische Antikörper in der Milch aufwiesen, größtenteils um persistent infizierte Kühe handeln. Diese Probanden könnten die Algen intermittierend ausscheiden, wobei der kulturelle Erregernachweis möglicherweise

aufgrund der großen Intervalle zwischen den einzelnen Untersuchungen immer negativ ausfiel. Auch eine mögliche Abkapselung der Erreger im Eutergewebe wäre in solchen Fällen bei negativen Kulturbefunden eines spezifischen Antikörperantwort nachweisbar wäre. Zusammenfassend dürfte der Anteil der intermittierenden Ausscheider am Gesamtgeschehen also insgesamt deutlich über jenem direkt kulturell festgestellten 4,9% liegen. Vor diesem Hintergrund werden die Vorteile und die Bedeutung des serologischen Erregernachweises für die Identifikation von infizierten Tieren nochmals in ihrer diagnostischen Potenz deutlich. Dass auch der Großteil der bereits vom Trockenstellen infizierten Kühe in ihrer nachfolgenden Laktation ebenfalls wieder Erreger über die Milch ausschied, ist ein weiterer Beleg für den typischen Verlauf der Protothekenmastitis als chronische, persistierende Infektion der Milchdrüse. Das Rind ist also offensichtlich nur in sehr begrenztem Maße in der Lage, eine Infektion mit *Pzopfi* wirkungsvoll zu widerstehen. Als Hauptgrund hierfür sind höchstwahrscheinlich die häufige Abkapselung der Erreger im Eutergewebe in Form von Mikroabszessen sowie die Persistenz der Erreger in Makrophagen zusehen (JENSEN et al., 1998; SCHÖNBORN und SEFFNER, 1977). Offenbar sind sowohl die induzierten spezifischen lokalen als auch die systemischen Antikörper nicht in der Lage, die Algenzellen abzutöten. Diesbezüglich sollten in Zukunft Erfolge der Immunisierungsversuche zur Induktion einer lokalen Immunität im Euter verlaufen bei anderen Mastitisserregern bisher zwar meist erfolglos (SMITH et al., 1999; TOMITA et al., 1998; WATSON, 1992), aber vor dem Hintergrund der starken Tendenz zur Ausbreitung im Bestandsowiederbisherigen Therapieresistenz der bovinen Protothekenmastitis erscheinen solche Studien sinnvoll. Ein metaphylaktischer Einsatz einer wirksamen Immunisierung im Rahmen einer Bestandssanierung könnte ergänzend zur Eliminierung der Keimträger ein hilfreiches Mittel zur Verhinderung der weiteren Ausbreitung innerhalb des Bestandes sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Immundiagnostische Charakterisierung der bovinen Protothekenmastitis

Uwe Rösler

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Juni 2001

133 Seiten, 35 Tabellen, 14 Abbildungen, 18 Literaturstellen

Die Protothekenmastitis des Rindes ist eine therapieresistente, weltweit vorkommende Infektionskrankheit. Das etiologische Agens, die farblose Alge *Prototheca* (*P. zopfii*), kommt ubiquitär in feuchten Habitaten vor und verursacht fakultativ akute bis chronische Entzündungen des Rindereuters. Es gibt Hinweise auf das Vorkommen eines speziellen, Mastitis-assoziierten Biotyps von *P. zopfii*, der sogenannten Variante II. Durch die oft zu beobachtende endemische Ausbreitung in Milchviehbeständen sowie durch die nachhaltige Therapieresistenz, welche oft zum wirtschaftlichen Totalverlust der betroffenen Milchkühe führt, stellen Protothekenmastitiden beim Rinde ein großes ökonomisches Problem für den betroffenen Betreiber dar.

Dabisher nur sehr beschränkte Erkenntnisse zur lokalen und systemischen Immunantwort sowie zur Erregerausscheidung im Verlauf der Protothekenmastitis des Rindes vorlagen, wurden die verschiedenen klinischen Stadien dieser Infektionserologisch, kulturell sowie durch Bestimmung der Zahl der somatischen Zellen in der Milch charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene ELISA-Systeme entwickelt, die anschließend auch auf ihren möglichen Einsatz bei der Diagnostik der Protothekenmastitis hin untersucht wurden. Dies geschah in einem hochgradig an Protothekenmastitis erkrankten Milchviehbestand. Darüber hinaus wurden verschiedene Isolate von *P. zopfii* auxanographisch, biochemisch, serologisch und genetisch untersucht, um eine Differenzierung innerhalb der Algenspezies *P. zopfii* vornehmen zu können.

Anhand der auxanographischen, biochemischen, serologischen und genetischen Untersuchungen war eine eindeutige Differenzierung von drei verschiedenen Bio-, Sero- und Genotypen innerhalb der Algenspezies *P. zopfii* möglich. Alle untersuchten Mastitisisolate konnten eindeutig der Variante II von *P. zopfii* zugeordnet werden, womit dieser Variante

eine besondere epidemiologische Bedeutung bei der Entstehung der Protothekenmastitis des Rindes zukommen scheint.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass akut infizierte Tiere sowohl die höchsten Antikörperaktivitäten an IgG im Blutserum sowie an IgA und IgG₁ im Milchserum als auch die höchsten Gehalte an somatischen Zellen in der Milch aufweisen. Chronisch infizierte Milchkühe weisen zum Teil sehr hohe Antikörperaktivitäten in der Milch auf und unterscheiden sich nicht signifikant von akut infizierten Tieren. Demgegenüber weisen diese chronisch infizierten Tiere signifikant höhere IgG-Aktivitäten im Blutserum sowie IgA- und IgG₁-Aktivitäten in der Milch auf als nicht infizierte Tiere. Somit ist eine eindeutige Differenzierung zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren möglich.

Die ELISA zum Nachweis von spezifischem IgA und IgG im Milchserum erwies sich als besonders geeignet, um infizierte Kühe zu identifizieren. Beides erologische Testsysteme wieser Sensitivitäten von 96,3% für IgA sowie 92,0% für IgG und Spezifitäten von 94,4% (IgA) und 96,3% (IgG₁) auf. Demgegenüber wies der ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG im Blutserum eine Spezifität von 100% nur eine Sensitivität von 81,5% auf. Diese gute Reproduzierbarkeit der Tests wurde durch intra-Assay-Variationen von 6,08% für den Nachweis von IgA im Milchserum und 7,20% für IgG₁ sowie durch die geringe inter-Assay-Variation von 6,32% (IgA) und 9,74% (IgG₁) belegt.

Der Einsatz dieser Testsysteme bei der Sanierung eines hochgradig mit *P.zopfii* infizierten Milchviehbestandes zeigte, dass die serologische Diagnostik dem bisher gebräuchlichen kulturellen Erregernachweis bei der Identifikation intermitterender Erregerausscheider überlegen ist. Es wurde deutlich, dass 70,5% der infizierten Tiere die Erreger über einen Zeitraum von 12 Monaten permanent ausschieden und mindestens weitere 4,9%, wahrscheinlich jedoch wesentlich mehr, dieser infizierten Tiere intermittierende Erregerausscheider waren. Somit scheint die serologische Erregernachweis für die Diagnostik der Protothekenmastitis des Rindes besser geeignet zu sein als die kulturelle Diagnostik.

Dabei wurde die höchste Sensitivität durch die Kombination des Nachweises von spezifischem IgA und IgG im Milchserum erzielt.

Schlüsselworte: Algen, Prototheca, Protothekenmastitis, Mastitis, Rind, Antikörperantwort, Immunität, Molkeantikörper, Milchserum, Ausscheidertum, intermittierende Erregerausscheider, ELISA, Somatische Zellen, Serologie, Serotypen, Biotypen, Varianten.

6.1 SUMMARY

IMMUNODIAGNOSTIC CHARACTERIZATION OF BOVINE PROTOTHALPICAL MASTITIS

Uwe Röslér

Institut für Tierhygiene und Veterinäre Public Health,
Faculty of Veterinary Medicine, University Leipzig

June 2001

133 Pages, 35 Tables, 14 Figures, 18 References

Protothecosis is a severe, often endemic mastitis in cattle caused by colorless algae of the genus *Prototheca*. Only little and insufficient knowledge about the organism itself, and the host immune response to this infection existed. Therefore, the aim of this thesis was to characterize the local and systemic immune response and the possible elimination or persistence of the pathogen in the host. To gain more information on the specific immune response, different clinical stages of infection were characterized serologically, culturally, and by determination of the number of somatic cells in milk. Three different ELISA systems were developed, which were also examined for their diagnostic application potential. For the investigations, a dairy herd highly infected with *Prototheca zopfii* and severe clinical manifestation of protothecal mastitis was used. The ELISA was evaluated using serum and whey from animals with different clinical stages of infection. As antibody isotypes, IgG in serum and IgA and IgG₁ in whey were used. In addition, different isolates of *P. zopfii* were biochemically, serologically, and genetically examined in order to allow a differentiation of individual isolates within the species *P. zopfii*. The biochemical, serological, and genetic investigations allowed a clear differentiation of the three known variants of *P. zopfii*. Examined mastitis isolates could be assigned to a variant of *P. zopfii*. Therefore, it can be concluded that this variant has a particular epidemiological significance in the etiology of bovine protothecal mastitis. The serological investigations showed high antibody activities during acute and chronic stages of infection. The antibody activity was low in chronically infected, but presently cultural negative animals and also in uninfected animals. A strong correlation was observed between whey IgA and whey IgG antibody activity and the count of somatic cells in milk. Whereas, only a weak correlation exists to the number of algae cells excreted with the milk. A

sensitivity of 96% and a specificity of 94% were calculated for the ELISA based on IgA levels. The ELISA for detection of specific IgG in whey shows a sensitivity of 92.6% and a specificity of 96.3%. Intra-assay and inter-assay variations were calculated to be 6.08% and 6.32%, respectively. Based on these data, these ELISA assays are suitable for discrimination between infected and uninfected animals, and might therefore be used for the screening of affected herds. When used in the remediation of a high-grade infected dairy herd the serological showed clear advantages in the identification of intermittent shedders. By culturing of *Prototheca* from milk, it was shown that 70.5% of the infected animals were permanent shedders, whereas 4.9% were intermittent shedders. Since intermittent shedders could not be clearly identified serologically, but might not be recognized by culturing, it can be assumed that serological diagnosis is more suitable for the identification of apparently infected intermittent shedders.

Keywords: *Algae* *Prototheca* mastitis cattle immunity antibody response whey, shedding ELISA serology variants.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aalbaek,B.,Jensen,H.E.,Huda,A.(1998):Identificati onof *Prototheca*frombovine mastitisinDenmark. *ActaPatholMicrobiolImmunolScand.* **106**,483-488.
2. Ahbel,D.E.,Alexander,A.H.,Kleine,M.L.,Lic htman,D.M.(1980):Protothecal olecranonbursitis.Acasereportandreviewofheli terature. *J.BoneJointSurg.* **62**, 835-836.
3. Anderson,E.H.(1944a)Natureofthegrowthfactorfor thecolorlessalga *Pzopfii* . *J. GenPhysiol.* **28**,287-296.
4. Anderson,E.H.(1944b):Studiesonthemetabolismoffh ecolorlessalga *Pzopfii* . *J. GenPhysiol.* **28**,297-327.
5. Arnold,P.undAhearn,D.G.(1972):Thesystematicsof thegenus *Prototheca*witha descriptionofnewspecies *Pfilamenta* . *Mycologia* **64**,265-275.
6. Ashford,B.K.,Ciferri,R.,Dalmau,L.M.(1930):Ane wspeciesof *Prototheca*and a varietyofthesamisolatedfromthèhumanintestine . *ArchProtistenkd.* **70**,619-638.
7. Baumgärtner,B.(1997):VorkommenundBekämpfungderPrototheken mastitides Rindes im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinär- und LebensmitteluntersuchungsamtePotsdam. *PraktTierarzt* **78**,406-414.
8. Bergmann, A. (1993a): Euterverträglichkeit von Tetramisol - und Levamisol- hydrochloridundRezepturvorschlagzumintramammärenEinsat zbeimRindgegen *P. zopfii*. *BerlMünchTierärztl.Wochenschr.* **106**,253-256.
9. Bergmann,A.(1993b):ExperimentellePrototheken-Mastiti sbeimRindundTherapie mitTetramisolhydrochlorid. *BerlMünchTierärztl.Wochenschr.* **106**,257-260.
10. Berkhoff,H.A.,Connelly,M.R.,Lockett,L.J.(1982) :Differentialmicrobiological diagnosisofprotothecosifromnon-humansources. *AmJMedTechnol.* **48**,609-612.
11. Bianchi,M.,Robles,A.M.,Vitale,R.,Helou,S., Arechavala,A.,Negroni,R.(2000): The usefulness of blood culture in diagnosing HIV-related sy stemic mycoses: evaluationofmanualysiscentrifugatiomethod. *MedMycol.* **38**,77-80.

12. Blaschke-Hellmessen, R. und Schuster, H. (1984): Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *Prototheca zopfii* und *Prototheca wickerhamii* unter verschiedenen Umweltbedingungen. *Mh.VetMed.* **39**,52-856.
13. Blaschke-Hellmessen, R., Schuster, H., Bergmann, V. (1985a): Differenzierung von Varianten bei *Pzopfii* (Krüger 894). *ArchExpVeterinärmed.* **39**,387-397.
14. Blaschke-Hellmessen, R., Schuster, H., Schuster, K. (1985b): Chlorophyllose Algen der Gattung *Prototheca* (Krüger) - Saprophyten und Krankheitserreger bei Mensch und Tier. *ZGesamtHyg.* **31**,561-564.
15. Blaschke-Hellmessen, R., Wilhelm, A., Teichmann, G., Schuster, H., Boeltzig, K. (1987): Orientierende Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Pzopfii* bei Rindern. *Mh.VetMed.* **42**,48-50.
16. Blaschke-Hellmessen, R. (2001) Persönliche Mitteilung
17. Blogg, J. R. und Sykes, J. E. (1995) Sudderblindness associated with protothecosis in a dog. *Aust.VetJ.* **72**,147-149.
18. Butler, J. E., Feldbush, T. L., McGivern, P. L., Stewart, N. (1978): The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a measure of antibody concentration or affinity. *Immunochemistry* **15**,131-136.
19. Buyukmihci, N., Rubin, L. F., DePaoli, A. (1975): Protothecosis with ocular involvement in a dog. *JAm.VetMedAssoc.* **167**,158-161.
20. Carey, W. P., Kaykova, Y., Bandres, J. C., Sidhu, G. S., Brau, N. (1997): Cutaneous protothecosis in a patient with AIDS and a severe functional neutrophil defect: successful therapy with amphotericin B. *ClinInfectDis.* **25**,1265-1266.
21. Casal, M. und Gutierrez, J. (1983a) In vitro activity of fibostamycin against *Prototheca* sp. *Mycopathologia* **83**,21-23.
22. Casal, M. und Gutierrez, J. (1983b): Simple new test for rapid differentiation of *Prototheca wickerhamii* from *Pzopfii*. *JClinMicrobiol.* **18**,992-993.
23. Casal, M. und Gutierrez, J. (1986): Simple new test for presumptive differentiation between genus *Candida* and genus *Prototheca*. *Mycopathologia* **94**,3-5.

24. Casal, M., Zerolo, J., Linares, U. J., Ibarra, A. (1983): First human case of possible protothecosis in Spain. *Mycopathologia* **83**, 19-20.
25. Casselton, P. J. (1967): Influence of the nitrogen source on the adenine reversibility of amino-1,2,4-triazole inhibition of *Pzopfi* growth. *Can J Microbiol.* **13**, 1564-1566.
26. Chandler, F. W., Kaplan, W., Callaway, C. S. (1978): Differentiation between *Prototheca* and morphologically similar green algae in tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **102**, 353-356.
27. Chodat R. (1913) Monographie der Algenkulturen. *Crypt. Suisse* **4**, 121.
28. Ciferri, O. (1956): Thiamine deficiency of *Prototheca*, yeast-like chloroalga. *Nature* **178**, 1475-1476.
29. Cochran, R. K., Pierson, C. L., Sell, T. L., Palella, T. (1986): Prototheca blebcranon bursitis treated with intrabursal amphotericin B. *Rev Infect Dis.* **8**, 952-954.
30. Coloe, P. J. und Allison, J. F. (1982): Protothecosis in a cat. *J Am. Vet. Med. Assoc.* **180**, 78-79.
31. Connor, D. H., Gibson, D. W., Ziefer, A. (1982): Diagnostic features of three unusual infections: micronemiasis, pleomycotic cyst, and protothecosis. *Monogr. Pathol.* **23**, 205-239.
32. Conte, M. V. und Pore, R. S. (1973): Taxonomic implications of *Prototheca* and *Chlorella* cell wall polysaccharide characterization. *Arch. Mikrobiol.* **92**, 227-233.
33. Cook, J. R., Jr., Tyler, D. E., Coulter, D. B., Chandler, F. W. (1984): Disseminated protothecosis causing acute blindness and deafness in a dog. *J Am. Vet. Med. Assoc.* **184**, 1266-1272.
34. Cooke, W. B. (1968) Studies in the genus *Prototheca*. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* **84**, 213-220.
35. Costa, E. O., Carciofi, A. C., Melville, P. A., Perada, M. S., Schalch, U. (1996): *Prototheca* outbreak of bovine mastitis. *Zentralbl. Veterinärmed [B]* **43**, 321-324.

36. Costa, E.O., Melville, P.A., Ribeiro, A.R., Watanabe, E.T., Parolari, M.C. (1997): Epidemiologic study of environmental sources in *Pzopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia* **137**, 33-36.
37. Da Costa, E.O., Ribeiro, A.R., Watanabe, E.T., Pardo, R.B., Silva, J.B., Sanches, R. B. (1996): An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on farms in São Paulo, Brazil. *Vet Res Commun.* **20**, 237-241.
38. Davies, R.R. and Wilkinson, J.L. (1967) Human protothecosis: supplementary studies. *Ann Trop Med & Parasitol.* **61**, 112-115.
39. De Camargo, Z.P. and Fischman, O. (1979): *Prototheca stagnora*, an encapsulated organism. *Sabouraudia* **17**, 197-200.
40. De Camargo, Z.P., Fischman, O., Regis, Silva, M.R. (1980) Experimental protothecosis in laboratory animals. *Sabouraudia* **18**, 237-240.
41. De Hoog, G.S., Bowman, B., Graser, Y., Haase, G., Fari, M., Gerrits, van der Ende, A.H., Melzer-Krick, B., and Untereiner, W. A. (1998): Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. *Med Mycol.* **36** Suppl, 52-56.
42. De Vargas, A.C., Lazzari, A., Santurio, J.M., Alves, S.H., Ferreira, G., Kreutz, L.C. (1998): Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. *Mycopathologia* **142**, 135-137.
43. Deutz, A. and Kuttin, E.S. (1990): Übereine sichere und einfache mikroskopische Nachweismethode von Pilzen und Algen in Milchproben. *Wien. Tierärztl. Mschr.* **77**, 213-215
44. Dieudonné, M. (1997) Mammite à *Prototheca* dans la province du Hainaut. Institut de Médecine Tropicale, Département de Production et Santé Animale Tropicales, Antwerpen, Belgique. Dissertation.
45. Dillberger, J.E., Homer, B., Daubert, D., Altman, N.H. (1988) Protothecosis in two cats. *J Am Vet Med Assoc.* **192**, 1557-1559.
46. Dion, W.M. (1982) Bovine mastitis due to *Pzopfii* II. *Canvet J.* **23**, 272-275.

47. Dlačny D., Tornai-Lehoczki J., Peter G. (1999) Restriction enzyme analysis of PCR amplified DNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 445-453.
48. Enders, F. und Weber, A. (1993a): Pilotstudie zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Pferden. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **106**, 264-265.
49. Enders, F. und Weber, A. (1993b): Untersuchungen zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Rindern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **106**, 165-169.
50. Espinel-Ingroff A., Stockman L., Roberts G., Pincus D., Pollack J., Marler J. (1998): Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new and emerging yeasts pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 883-886.
51. Font, R.L. und Hook, S.R. (1984): Metastatic prototheca retinitis in dog. *Electron Microscopical Observations.* *Vet. Pathol.* **21**, 61-66.
52. Frank, N., Ferguson, L.C., Cross, R.F., Redman, D. R. (1969): *Prototheca caudae* of bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.* **30**, 1785-1794.
53. Frese, K. und Gedek, B. (1968): Ein Fall von Protothecose beim Reh. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **9**, 174-178.
54. Furuoka, H., Anri, A., Arita, Y., Tuzuki, N., Satoh, H., Itakura, C. (1989): Protothecal mastitis in cow. *Nippon Juigaku Zasshi* **51**, 197-199.
55. Gaunt, S.D., McGrath, R.K., Cox, H.U. (1984): Disseminated protothecosis in dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **185**, 906-907.
56. Gedek, B. und Weber, A. (1978): *Prototheca*-Mastitiden beim Rind als Bestandsproblem. *Tierärztl. Prax.* **6**, 441-450.
57. Gentles, J.C. und Bond, P.M. (1977): Protothecosis of Atlantic salmon. *Sabouraudia* **15**, 133-139.
58. Gibb, A.P., Aggarwal, R., Swainson, C.P. (1991): Successful treatment of *Prototheca* peritonitis complicating continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Infect.* **22**, 183-185.

59. Ginel, P.J., Perez, J., Molleda, J.M., Lucena, R., Mozos, E. (1997): Cutaneous protothecosis in dog. *VetRec.* **140**, 651-653.
60. Gorr, K. (1982): Die Strategie der Bekämpfung der Protothekenmastitis. Universität Leipzig Fachtierarztarbeit.
61. Gronberg, A., Fryden, A., Kihlstrom, E. (1989): Humoral immune response to individual *Yersinia enterocolitica* antigens in patients with and without reactive arthritis. *ClinExpImmunol.* **76**, 361-365.
62. Grunert, E., Hoedemarker, M., Weigt, U. (1996): Algenmastitis. In: Buiatrik, Band 1. Hannover, Verlag H. & M Schapper.
63. Heesemann, J. und Karch, H. (1995): Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). *Internist* **36**, 102-105.
64. Heitzman, H.B., Brooks, T.J., Phillips, B.J. (1984): Protothecosis. *SouthMedJ.* **77**, 1477-1478.
65. Heney, C., Greeff, M., Davis, V. (1991) Hickmar, C. et al. Enter-related protothecalgaemia in an immunocompromised child. *J Infect Dis.* **163**, 930-931.
66. Hensel, A., Pabst, R., Bunka, S., Petzoldt, K. (1994): Oral and aerosol immunization with viable or inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacteria: antibody response to capsular polysaccharides in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) and sera of pigs. *ClinExpImmunol.* **96**, 91-97.
67. Hepperle, D., Nozaki, H., Hohenberger, S., Huss, V.A., Morita, E., Krienitz, L. (1998): Phylogenetic position of the *Phacotaceae* within the Chlamydomonadales revealed by analysis of 18S rDNA and bc1 sequences. *J Mol Evol.* **47**, 420-430.
68. Hodges, R.T., Holland, J.T.S., Neilson, F.J.A., Wallace, N.M. (1985): *P. zopffii* mastitis in herdfairy cows. *NZvetJ.* **33**, 108-111.
69. Holcomb, H.S., Behrens, F., Winn, W.C., Jr., Hughes, J.M., McCue, F.C. (1981): Protothecosis in a hamster. *J Hand Surg [Am.]* **6**, 595-599.
70. Horiuchi, Y., Tomizawa, N., Higuchi, I., Nagasaka, K. (1991) Experimental cutaneous protothecosis in mice: epithelioid and granulomatous reaction. *J Dermatol.* **18**, 74-78.

71. Huss, V.A. und Sogin, M.L. (1990): Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *MolEvol.* **31**, 432-442.
72. Iacoviello, V.R., DeGirolami, P.C., Lucarini, J., Sutker, K., Williams, M.E., Wanke, C.A. (1992): Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. *Clin Infect Dis.* **15**, 959-967.
73. Imes, G.D., Lloyd, J.C., Brightman, M.P. (1977): Dissemminated protothecosis in a dog. *Onderstepoort Vet Res.* **44**, 1-6.
74. Janosi, S., Ratz, F., Szigeti, G., Kulcsar, M., Kerényi, J., Lauko, T., Katona, F., Huszenicza, G. (2001a): Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet Q.* **23**, 58-61.
75. Janosi, S., Szigeti, G., Ratz, F., Lauko, T., Kerényi, J., Tenk, M., Katona, F., Huszenicza, A., Kulcsar, M., Huszenicza, G. (2001b): *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Vet Q.* **23**, 80-83.
76. Jark, U. (1996): Etablierung eines ELISA zur Erkennung subklinischer Paratuberkulose-Infektionen beim Rind Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover. Dissertation.
77. Jensen, H.E. und Aalbaek, B. (1994): Pathogenicity of yeasts and algae isolated from bovine mastitis secretions in a murine model. *Mycoses* **37**, 101-107.
78. Jensen, H.E., Aalbaek, B., Bloch, B., Huda, A. (1998): Bovine mammary protothecosis due to *P. zopfii*. *Med Mycol.* **36**, 89-95.
79. Johnstone, A. und Thorpe, R. (1987): Immunochimistry in practice 2. Auflage Oxford, London Edinburgh Blackwell Scientific Publications.
80. Joshi, K.R., Gavin, J.B., Wheeler, E.E. (1975): The ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. *Mycopathologia* **56**, 9-13.
81. Kaminski, Z.C., Kapila, R., Sharer, L.R., Kloser, P., Kaufman, L. (1992): Meningitis due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* **15**, 704-706.
82. Kaplan, W. (1977): Protothecosis and infections caused by morphologically similar green algae. *Proc 4th Int Conference on the Mycoses* **356**, 218-232.

83. Kaplan,W.,Chandler,F.W.,Holzinger,E.A.,Plue, R.E.,Dickinson,R.O.(1976):
Protothecosis in cat first recorded case. *Sabouraudia* **14**,281-286.
84. Kemeny,DM.(1994)ELISA-Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay
in biologisch/medizinischen Labor. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer Verlag,
24-29.
85. Kerfin,W.und Kessler,E.(1978):Physiological and biochemical contribution to the
taxonomy of the genus *Prototheca* II. Starch hydrolysis and base composition of DNA.
Arch Mikrobiol. **116**,105-107.
86. Kessler,E.(1977)Physiological and Biochemical Contribution to the taxonomy of the
Genus *Prototheca* I. Hydrogenase, Acid Tolerance, Salt Tolerance, Thermophily, and
Liquefaction of Gelatin. *Arch Mikrobiol.* **113**,139-141.
87. Kessler,E.(1982)Physiological and Biochemical Contribution to the taxonomy of the
Genus *Prototheca* III. Utilization of Organic Carbon and Nitrogen Compounds. *Arch.
Mikrobiol.* **132**,103-106.
88. Kockova-Kratochvilova,A.und Havelkova,M.(1974): *Prototheca hydrocarbonearan.*
sp. Lebenszyklus, Metabolismus und Feinstruktur. *Z Allg Mikrobiol.* **14**,123-134.
89. Krüger, W.(1894):Kurze Charakteristike in einigen niederen Organismen im Saftfluss der
Laubbäume. *Hedwigia* **XXXIII**,16-24.
90. Laemmli,U.K.(1970):Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
of bacteriophage T4. *Nature* **227**,680-685.
91. Laeng,RH.,Egger,C.,Schaffner,T.,Borisch,B., Pedrinis,E.(1994)Protothecosis in
an HIV-positive patient. *Am J Surg Pathol.* **18**,1261-1264.
92. Lampen,J.O.und Arnow,P.(1961):Inhibition of fungal growth by Nystatin. *J Bacteriol.* **82**,
247-251.
93. Larsen,D.L.,Karasin,A.,Zuckermann,F.,Ilsen, C.W.(2000)Systemic and mucosal
immune response to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet Microbiol.* 117-131.
94. Lee,J.-A.(1989)Protothecosis. *Aust Vet Practit.* **19**,103.

95. Lee, W. S., Lagios, M. D., Leonards, R. (1975): Wound infection by *Prototheca wickerhamii* as a phytoplankton pathogen of man. *J Clin Microbiol.* 262-66
96. Lerche, M. (1952): Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastitis der Kuh. *Berl Münch Tierärztl. Wochenschr.* 464-69.
97. Lloyd, D. und Turner, G. (1968): The cell wall of *Pzopfii*. *J Gen Microbiol.* 50, 421-427.
98. Loupal, G., Kutin, E. S., Kölbl, O. (1992): Die Schwimmblasenentzündung der Karpfen (*Cyprinus carpio*) - ätiologisches Agens eine Alge. *Tierärztl Umschau* 47, 850-854.
99. Macartney, L., Rycroft, A. N., Hammil, J. (1988): Cutaneous protothecosis in the dog: first confirmed case in Britain. *Vet Rec.* 123, 494-496.
100. Machouart-Dubach, M., Lacroix, C., de Chauvin, M. F., Gall, J., Giudicelli, C., Lorenzo, F., Derouin, F. (2001): Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium* spp., and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism ribotyping method. *J Clin Microbiol.* 39, 685-690.
101. Manners, D. J., Pennie, I. R., Ryley, J. F. (1973): The molecular structures of α -glucan and galactans synthesised by *Pzopfii*. *Carbohydr Res.* 29, 63-77.
102. Matsuda, T. und Matsumoto, T. (1992): Protothecosis: a report of two cases in Japan and review of the literature. *Eur J Epidemiol.* 8, 397-406.
103. McDonald, J. S., Richard, J. L., Anderson, A. J. (1984a): Antimicrobial susceptibility of *Pzopfii* isolated from bovine intramammary infections. *Am J Vet Res.* 45, 1079-1080.
104. McDonald, J. S., Richard, J. L., Cheville, N. F. (1984b): Natural and experimental bovine intramammary infection with *Pzopfii*. *Am J Vet Res.* 45, 592-595.
105. McGill, R. J., Tukey, W., Larson, W. A. (1978): Variations on Box Plots. *Am Statist.* 32, 12-16.
106. Melville, P. A., Watanabe, E. T., Benites, N. R., Ribeiro, A. R., Silva, J. A., Garino, Junior, F., Costa, E. O. (1999): Evaluation of the susceptibility of *Pzopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia* 146, 79-82.

107. Menke, W. und Fricke, B. (1962): Einige Beobachtungen an *Prototheca zoffenii*. *Portug. Acta Biol.* **6A**, 243-251.
108. Mettler, F. (1975): Generalisierte Protothekose bei einem Flughund (*Pteropusylei*). *Vet Pathol.* **12**, 118.
109. Mettler, F. (1983): Algeninfektionen bei Mensch und Tier. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **125**, 433-442.
110. Migaki, G., Font, R. L., Sauer, R. M., Kaplan, W., Miller, R. L. (1982): Canine protothecosis: review of the literature and report of a new case. *J Am. Vet. Med. Assoc.* **181**, 794-797.
111. Migaki, G., Garner, J. F., Imes, G. D. (1969): Bovine protothecosis: a report of three cases. *Vet Pathol.* **6**, 444-453.
112. Moore, F. M., Schmidt, G. M., Desai, D., Chandler, F. W. (1985): Unsuccessful treatment of disseminated protothecosis in a dog. *J Am. Vet. Med. Assoc.* **186**, 705-708.
113. Muggli, U. (1977): Prüfung der Verträglichkeit einiger antimykotischer Substanzen am gesunden Rindereuter. Universität München Dissertation.
114. Müller, G. H., Kirk, R. W., Scott, D. W. (1993): Protothekose. In: Kleintier-Dermatologie Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer Verlag 281.
115. Müller, W. (1988): Aggregationstests als Schnellmethode zur Abgrenzung der Gattung *Prototheca* von verschiedenen Arten der Gattung *Candida*. *Mh. Vet. Med.* **43**, 278.
116. Nadakavukaren, M. J. und McCracken, D. A. (1973): *Prototheca* als Algenpilz? *J Phycol.* **9**, 113-116.
117. Naryshkin, S., Frank, I., Nachamkin, I. (1987): *P. zoffenii* isolated from a patient with olecranon bursitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **6**, 171-174.
118. Nickerson, S. C. (1985): Immunemechanisms of the bovine udder: an overview. *J Am. Vet. Med. Assoc.* **187**, 41-45.

119. Paar F., Franz B., Nowotny N., Petzold K. (1989): Entwicklung eines Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern in Perdeserengengendaequin Herpesvirus. *Wien Tierärztl Mschr.* **76**, 401-404.
120. Padhye, A.A., Baker, J.G., D'Amato, R.F. (1979): Rapid identification of *Prototheca* species by the AP20C system. *J Clin Microbiol.* **10**, 579-582.
121. Pal, M., Hasegawa, A., Ono, K., Lee, C.W. (1990): A new staining solution for the morphological studies of fungi and *Prototheca*. *Nippon Juigaku Zasshi* **52**, 527-531.
122. Patni, N. J. und Aaronson, S. (1974): The nutrition, resistance to antibiotics and ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. *J Gen Microbiol.* **83**, 179-182.
123. Perez, J., Ginel, P.J., Lucena, R., Hervás, J., Mozos, E. (1997): Canine cutaneous protothecosis: an immunohistochemical analysis of the inflammatory cellular infiltrate. *J Comp Pathol.* **117**, 83-89.
124. Perlman, D. (1964): Antibiotic inhibition of algal growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 114-119.
125. Playfair, J. (1995): Natural Immunity. In: Playfair, J.: Infection and Immunity. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 44-50.
126. Polk, P. und Sanders, D. Y. (1997): Cutaneous protothecosis in association with the acquired immunodeficiency syndrome. *South Med J.* **90**, 831-832.
127. Pore, R.S. (1972): Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*. *Can. J. Microbiol.* **18**, 1175-1177.
128. Pore, R.S. (1973): Selective medium for the isolation of *Prototheca*. *Appl Microbiol.* **26**, 648-649.
129. Pore, R.S. (1985a): *Prototheca* associated with banana. *Mycopathologia* **90**, 187-189.
130. Pore, R.S. (1985b): *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia* **90**, 129-139.
131. Pore, R.S., Barnett, E.A., Barnes, W.C., Jr., Walker, J.D. (1983): *Prototheca* ecology. *Mycopathologia* **81**, 49-62.

132. Pore R.S., Shahan, T.A., Pore, M.D., Blauwiel, R. (1987): Occurrence of *Prototheca* mastitis pathogen in milk. *Vet Microbiol.* **15**:315-323.
133. Poyton, R.O. und Branton, D. (1972): Control of daughter-cell number variation in multiple fission: genetic versus environmental determinants in *Prototheca*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**:2346-2350.
134. Pringsheim, E.G. (1963) *Farblose Algen*. Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
135. Printz, A. (1927): *Chlorophyceae*. In: Engler, A. und Prantl, K.: Die natürlichen Pflanzenfamilien Leipzig Engelmann Verlag, 131-132.
136. Prinz, M. (1988): Untersuchungen zum Vorkommen der Gattung *Prototheca* im Abwassersystem von Milchviehanlagen in Raum Dresden und Beiträge zu ihrem Resistenzverhalten gegenüber ausgewählten Umweltfaktoren und antimikrobieller Hemmstoffen. Technische Universität Dresden Dissertation.
137. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. (1999): *Clinical veterinary microbiology* Edinburgh London New York Mosby, 343-344.
138. Rakich, P.M. und Latimer, K.S. (1984): Altered immune function in a dog with disseminated protothecosis. *J Am. Vet. Med. Assoc.* **185**:681-683.
139. Raza, P. (1998) Lokales und systemisches Immunantwortverhalten von Welpen gegen *Actinobacillus pleuropneumoniae* und Wirksamkeit von Bakterienghosts als Impfstoffe. Veterinärmedizinische Universität Wien Dissertation.
140. Riollot, C., Rainard, P., Poutrel, B. (2000): Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* **480**:247-258.
141. Roesler, U., Scholz, H., Hensel, A. (2001): Immunodiagnostische Identifizierung von Milchkuhinfektionen mit *Prototheca zopfii* zu verschiedenen klinischen Stadien und Diskriminierung zwischen infizierten und nicht infizierten Kühen. *J Clin Microbiol.* **39**:539-543.
142. Rogers, R. (1974) *Prototheca* lymphadenitis in Ox. *Aust. Vet. J.* **50**:281-282.
143. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (2000): Detektion und Analyse von Proteinen, die von klonierten Genen exprimiert werden. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning* 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.7-9.12.

- cloning: laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18.3-18.74.
144. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* **74**, 467.
145. Schick W. und Kutzer H. (1982): Zum Auftreten und Diagnostik zur Bekämpfung der durch *Prototheca trispora* bedingten Mastitis des Rindes. *Mh. Vet. Med.* **37**, 295-298.
146. Schiefer B. und Gedek B. (1968): Zum Verhalten von *Prototheca*-Species in Gewebe von Säugtieren. *Berl Münch Tierärztl. Wochenschr.* **81**, 485-490.
147. Schmalreck, A. F., Trankle, P., Vanca, E., Blaschke-Hellmessen, R. (1998): Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (*Candida albicans*, *Exophiala dermatidis*) und tierpathogenen Algen (*Prototheca* spp.) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden. *Mycoses* **41** Suppl., 71-77.
148. Schmaltz R., Bhogal B., Wang J., Wang Y.Y., Mackay C.R., Chen S.S., Larson L. (1996): Characterisation of leucocytic somatic cells in bovine milk. *Res. Vet. Sci.* **61**, 179-181.
149. Schönborn, C., Pöhler, H., Blaschke-Hellmessen, R. (1974): Neue Befunde über das Vorkommen von Algen der Gattung *Prototheca* auf der Haut des Menschen. *Dermatol. Monatsschr.* **160**, 798-811.
150. Schönborn, C. und Seffner, W. (1977): Zur Pathologie und Mikrobiologie einer durch *Prototheca trispora* ausgelösten Mastitis des Rindes. *Mh. Vet. Med.* **32**, 685-693.
151. Schuster, H. und Blaschke-Hellmessen, R. (1983): Zur Epidemiologie der Protothekenmastitis des Rindes - Anzucht von Algen der Gattung *Prototheca* aus der Umgebung und wirtschaftliche Nutztiere. *Mh. Vet. Med.* **38**, 24-29.
152. Schuster, H. und Schuster, K. (1982): Zur Bekämpfung der Prototheken-Mastitis des Rindes. Humboldt-Universität Berlin Dissertation.

153. Seffner, W. (1987): Prototheken-Infektionen. *In: Beer, J.: Infektionskrankheiten der Haustiere* Jena, Gustav Fischer Verlag 859-861.
154. Seffner, W. (1994) Prototheken-Mastitis. *In: Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H., Fuchs, H.W.: Euter- und Gesäugekrankheiten* Jena, Gustav-Fischer Verlag 431-434.
155. Segal, E., Padhye, A., Ajello, L. (1976): Susceptibility of *Prototheca* species to antifungal agents. *Antimicrob Agent Chemother.* **10**:75-79.
156. Shahan, T.A. und Pore, R.S. (1991): In vitro susceptibility of *Prototheca* spp. to gentamicin. *Antimicrob Agent Chemother.* **35**:2434-2435.
157. Smith, J.L., Hogan, J.S., Smith, K.L. (1999) Efficacy of intramammary immunization with an *Escherichia coli* bacterin. *J Dairy Sci.* **82**:2582-2588.
158. Sonck, C.E. und Koch, Y. (1971): Vertreter der Gattung *Prototheca* als Schmarotzer auf der Haut. *Mykosen* **14**:475-482.
159. Sordillo, L.M., Doymaz, M.Z., Oliver, S.P. (1990): Distribution of immunoglobulin-bearing leukocytes in bovine mammary tissue infected chronically with *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl. Veterinärmed [B]* **37**:473-476.
160. Spalton, D.E. (1985): Bovine mastitis caused by *Pzopfii* - case study. *Vet Rec.* **116**, 347-349.
161. Sudman, M.S. und Kaplan, W. (1973): Identification of the *Prototheca* species by immunofluorescence. *Appl Microbiol.* **25**:981-990.
162. Sudman, M.S. und Kaplan, W. (1974): Antigenic relationships between *Chlorella* and *Prototheca* spp. *Sabouraudia* **12**:364-370.
163. Tejada, E. und Parker, C.M. (1994): Cutaneous erythematous nodules in a crab fisherman Protothecosis. *Arch Dermatol.* **130**:244-248.
164. Tenhagen, B. A., Kalbe, P., Klunder, G., Heuwieser, W., Baumgartner, B. (1999): Tierindividuelle Risikofaktoren für die Protothekenmastitis des Rindes. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **106**:376-380.

165. Thiele, D. (1997): Protothekosen bei Mensch und Tier sowie in-vitro-Untersuchungen zur Wirksamkeit und lokalen Euterverträglichkeit von Polyvinylpyrrolidon-Iodlösung und Lugolscher Lösung Universität Leipzig Dissertation.
166. Thomas, J.B. und Preston, N. (1990): Generalised protothecosis in a collie dog. *Aust. Vet. J.* **67**:25-27.
167. Tomita, G.M., Nickerson, S.C., Owens, W.E., Wren, B. (1998) Influence of route of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* **81**:2159-2164.
168. Tsuji, K., Hirohara, J., Fukui, Y., Fujinami, S., Shiozaki, Y., Inoue, K., Uoi, M., Hosokawa, H., Asada, Y., Toyazaki, N. (1993) Protothecosis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Intern Med.* **32**:540-542.
169. Tubaki, K. und Soneda, M. (1959): Cultural and taxonomic studies on *Prototheca*. *Nagoya* **6**:25-34.
170. Tuzuki, N. (1987): A case of *P. zopfii*-mastopathy in a cow: Patho-morphological observations. *Jpn. J. Vet. Res.* **35**:154.
171. Tyler, D.E., Lorenz, M.D., Blue, J.L., Munnell, J.F., Chandler, F.W. (1980): Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **176**:987-993.
172. Tyler, J.W. und Cullor, J.S. (1989): Titer tests and diagnostic serologic testing. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **194**:1550-1558.
173. Venezio, F.R., Lavoo, E., Williams, J.E., Zeiss, C.R., Caro, W.A., Mangkornkanok, Mark, M., Phair, J.P. (1982) Progressive cutaneous protothecosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **77**:485-493.
174. Watson, D.L. (1987): Synergism between antibody and neutrophils in the ruminant mammary gland. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**:389-400.
175. Watson, D.L. (1992): Vaccination against experimental taphylococcal mastitis in dairy heifers. *Res. Vet. Sci.* **53**:346-353.

176. Weber, A. und Enders, F. (1993): Untersuchungen zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Haus- und Wildschweinen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **106**, 261-263.
177. Wilhelm, A., Blaschke-Hellmessen, R., Zieris, H. (1992): Zur Protothekenmastitis des Rindes. *Prakt. Tierarzt* **65**, 556-560.
178. Wolff, G., Burger, G., Lang, B. F., Kuck, U. (1993): Mitochondrial genes in the colourless alga *Prototheca wickerhamii* resemble plant genes in their exons but fungal genes in their introns. *Nucleic Acid Res.* **21**, 719-726.
179. Wolff, G. und Kuck, U. (1990): The structural analysis of mitochondrial SSU rRNA implies a close phylogenetic relationship between mitochondria from plants and from the heterotrophic alga *Prototheca wickerhamii*. *Curr. Genet.* **17**, 347-351.
180. Woolrich, A., Koestenblatt, E., Don, P., Szaniawski, W. (1994): Cutaneous protothecosis and AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31**, 920-924.

ANHANG

Tabellen und Abbildungen

Tabelle 24. Vergleich der Extinktionen auf zwei verschiedenen Typen unter Anwendung des IgA-ELISA.
Prototheca-Referenzserum vom Rind.

blockten Mikrotiterplattentypen
Verwendung fand das positive

	Polysorp®						Maxisorp®					
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A	0,128	0,149	0,143	0,142	0,162	0,129	0,122	0,128	0,128	0,133	0,126	0,137
B	1,143	1,108	1,128	1,062	1,102	1,055	2,091	1,984	2,005	1,924	1,904	1,986
C	0,938	1,005	0,916	0,908	0,886	1,018	1,771	1,723	1,680	1,726	1,631	1,734
D	0,773	0,782	0,781	0,789	0,821	0,873	1,565	1,521	1,473	1,491	1,427	1,476
E	0,700	0,619	0,705	0,727	0,635	0,651	1,169	1,140	1,154	1,200	1,249	1,185
F	0,550	0,436	0,500	0,525	0,503	0,515	1,051	1,034	0,951	1,012	1,032	0,925
G	0,325	0,367	0,353	0,388	0,359	0,370	0,877	0,908	0,825	0,802	0,759	0,732
H	0,398	0,428	0,465	0,415	0,413	0,415	3,140	3,062	2,977	3,060	3,163	2,895

Tabelle 25. Vergleich der Extinktionen auf zwei verschiedenen Typen unter Anwendung des IgA-ELISA.
Prototheca-Referenzserum vom Rind.

ockten Mikrotiterplattentypen
Verwendung fand das positive

	Polysorp®						Maxisorp®					
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A	0,120	0,134	0,139	0,121	0,123	0,138	0,105	0,106	0,105	0,110	0,101	0,120
B	1,366	1,296	1,285	1,375	1,271	1,265	1,639	1,513	1,517	1,548	1,553	1,523
C	1,023	1,014	0,997	1,042	1,039	0,965	1,154	1,046	1,054	1,054	1,057	1,066
D	0,758	0,743	0,766	0,708	0,729	0,755	0,756	0,780	0,742	0,677	0,696	0,730
E	0,548	0,517	0,522	0,498	0,494	0,529	0,491	0,521	0,470	0,415	0,430	0,511
F	0,362	0,361	0,314	0,355	0,382	0,373	0,325	0,358	0,299	0,289	0,300	0,313
G	0,244	0,261	0,240	0,220	0,230	0,256	0,236	0,234	0,209	0,209	0,206	0,212
H	0,095	0,102	0,093	0,102	0,108	0,104	0,082	0,083	0,086	0,081	0,085	0,085

Tabelle 26. Extinktionswerte bei der Konjugat- und Serumauswertung für den Immunglobulin-IsotypgGimBlutserum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte von Typ Maxisorp®, das positive und negative Prototheken-Referenzserum sowie im Schaf hergestelltes, mit Peroxidasekonjugiertes Anti-Rind-IgG.

	Serumverdünnung											
	1:10		1:100		1:1000		1:10		1:100		1:1000	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
A	0,123	0,080	0,087	0,084	0,081	0,079	0,079	0,083	0,085	0,086	0,083	0,079
B	3,382	0,684	3,330	0,588	0,549	0,178	2,268	0,486	3,183	0,701	0,743	0,240
C	3,056	0,638	2,216	0,434	0,273	0,137	1,794	0,362	2,415	0,551	0,346	0,162
D	2,579	0,471	1,197	0,280	0,176	0,109	1,556	0,351	1,680	0,429	0,214	0,129
E	1,853	0,397	0,725	0,222	0,125	0,099	1,192	0,268	1,025	0,307	0,147	0,119
F	1,154	0,257	0,445	0,171	0,098	0,093	0,889	0,215	0,643	0,260	0,112	0,094
G	0,763	0,224	0,275	0,139	0,090	0,085	0,553	0,172	0,399	0,201	0,096	0,089
H	0,487	0,164	0,194	0,113	0,086	0,081	0,365	0,148	0,260	0,166	0,092	0,080
	1:5000						1:8000					
	Konjugatverdünnung											

Tabelle 27. Extinktionswerte bei der Konjugat- und Milchserumauswertung für den Immunglobulin-IsotypgAimMilchserum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte von Typ Maxisorp®, das positive und negative Prototheken-Referenzserum sowie im Schaf hergestelltes, mit Peroxidasekonjugiertes Anti-Rind-IgA.

	Milchserumverdünnung											
	1:10		1:20		1:50		1:10		1:20		1:50	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
A	0,207	0,204	0,218	0,218	0,153	0,172	0,213	0,201	0,173	0,165	0,146	0,183
B	2,339	0,260	2,307	0,179	1,900	0,156	1,478	0,235	1,445	0,187	1,283	0,169
C	2,175	0,209	1,880	0,158	1,320	0,139	1,439	0,145	1,169	0,145	0,972	0,112
D	1,832	0,173	1,407	0,133	0,954	0,122	1,211	0,139	0,927	0,127	0,668	0,123
E	1,532	0,175	1,133	0,141	0,624	0,137	1,044	0,146	0,788	0,145	0,472	0,126
F	1,099	0,153	0,717	0,117	0,411	0,134	0,791	0,135	0,526	0,124	0,337	0,135
G	0,779	0,153	0,539	0,139	0,306	0,128	0,592	0,149	0,377	0,131	0,256	0,135
H	0,449	0,159	0,366	0,142	0,262	0,167	0,420	0,163	0,279	0,156	0,226	0,160
	1:5000						1:8000					
	Konjugatverdünnung											

Tabelle 28. Ergebnis der Konjugatauswertung für den Immunglobulin-Isotyp IgG₁ im Milchserum. Extinktionswerte bei der Konjugat- und Milchserumauswertung für den Immunglobulin-Isotyp IgG₁ im Milchserum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte von Typ Maxisorp[®], das positive und negative Prototheken-Referenzserum sowie im Schaf hergestelltes, mit Peroxidasekonjugiertes Anti-Rind-IgG₁.

	Milchserumverdünnung											
	1:10		1:20		1:50		1:10		1:20		1:50	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
A	0,196	0,188	0,168	0,163	0,157	0,176	0,163	0,164	0,128	0,133	0,148	0,160
B	1,760	0,287	1,971	0,206	1,835	0,182	0,830	0,199	0,871	0,172	0,794	0,161
C	1,830	0,261	1,985	0,199	1,602	0,160	0,854	0,193	0,799	0,163	0,721	0,155
D	1,779	0,208	1,692	0,207	1,322	0,164	0,804	0,183	0,775	0,158	0,642	0,141
E	1,641	0,180	1,415	0,160	0,976	0,159	0,733	0,177	0,678	0,140	0,519	0,157
F	1,399	0,167	1,077	0,148	0,700	0,158	0,614	0,145	0,539	0,135	0,389	0,156
G	1,132	0,168	0,814	0,154	0,491	0,157	0,565	0,154	0,429	0,149	0,308	0,156
H	0,823	0,196	0,585	0,183	0,361	0,182	0,466	0,149	0,332	0,143	0,244	0,163
	1:2000						1:5000					
	Konjugatverdünnung											

Tabelle 29. Extinktionswerte zur Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISAs für den Nachweis von IgG im Serum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte von Typ Maxisorp[®], das positive Prototheken-Referenzserum sowie im Schaf hergestelltes, mit Peroxidasekonjugiertes Anti-Rind-IgG.

	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	0,076	0,074	0,077	0,076	0,077	0,084	0,082	0,080	0,080	0,084	0,082	0,088
B	1,140	1,183	1,051	1,157	1,074	1,079	1,049	1,130	1,143	1,118	1,081	1,091
C	1,078	1,207	1,099	1,086	1,112	1,144	1,111	1,027	1,015	1,036	1,086	1,075
D	1,082	1,104	1,084	1,031	1,001	1,026	1,061	1,097	1,043	1,031	1,040	1,127
E	1,111	1,055	1,027	1,031	1,006	1,160	1,014	1,036	1,027	1,014	1,096	1,129
F	1,089	1,049	1,049	1,059	1,009	0,954	1,060	1,041	1,067	1,042	1,074	1,052
G	1,110	1,149	1,132	1,061	1,100	1,154	1,072	1,057	1,117	1,080	1,090	1,098
H	1,185	1,252	1,133	1,131	1,254	1,144	1,169	1,174	1,095	1,186	1,252	1,202

Tabelle30 Extinktionswert zur Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgA im Milchserum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte von Typ Maxisorp®, das positive Prototheken-Referenzserum sowie im Schaf her gestelltes, mit Peroxidasekonjugiertes Anti-Rind-IgG.

	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	0,067	0,074	0,077	0,076	0,077	0,084	0,082	0,080	0,080	0,084	0,082	0,088
B	1,140	1,183	1,051	1,157	1,074	1,079	1,049	1,130	1,143	1,118	1,081	1,091
C	1,078	1,207	1,099	1,086	1,112	1,144	1,111	1,027	1,015	1,036	1,085	1,075
D	1,082	1,104	1,084	1,031	1,001	1,026	1,061	1,097	1,043	1,031	1,040	1,127
E	1,111	1,055	1,027	1,031	1,006	1,160	1,014	1,036	1,027	1,014	1,096	1,129
F	1,089	1,049	1,049	1,059	1,009	0,954	1,060	1,041	1,097	1,042	1,074	1,052
G	1,110	1,149	1,132	1,061	1,100	1,154	1,072	1,057	1,117	1,080	1,090	1,098
H	1,185	1,252	1,133	1,131	1,254	1,144	1,162	1,174	1,095	1,186	1,252	1,202

Tabelle31 Extinktionswert zur Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgG₁ im Milchserum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte von Typ Maxisorp®, das positive Prototheken-Referenzserum sowie im Schaf her gestelltes, mit Peroxidasekonjugiertes Anti-Rind-IgG₁.

	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	0,093	0,090	0,083	0,082	0,086	0,085	0,086	0,083	0,087	0,087	0,093	0,216
B	1,170	1,199	1,175	1,124	1,084	1,247	1,035	1,131	1,105	1,192	1,118	1,105
C	1,198	1,230	1,093	1,223	1,052	1,092	1,147	1,184	1,154	0,997	1,143	1,046
D	1,144	1,184	1,177	1,197	1,192	1,243	1,203	1,205	1,010	0,992	1,159	0,905
E	0,969	1,231	1,161	1,238	0,893	1,200	1,217	1,203	1,181	1,142	1,169	1,175
F	1,067	1,132	1,187	1,242	1,232	1,223	1,211	1,258	1,231	1,146	1,190	1,097
G	1,202	1,256	1,128	1,207	1,226	1,229	1,107	1,092	1,174	1,084	1,198	1,165
H	1,134	1,292	1,189	1,235	1,110	1,241	1,329	1,334	1,283	1,263	1,214	1,194

Tabelle 32 Assimilationsverhalten verschiedener *olatevon Pzopfi* und *P.wickerhamii* bei Verwendung des Identifikationssystems „BBL-Crystal@GramPositive“ (Fa. Beckton-Dickinson, Sparks, USA). Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C. Die Beurteilung der Reaktionen erfolgte nach 48 Stunden.

Stamm	Spezies/ Variante	FPH	FTR	FHO	TRE	SUC	ARA	BGL	PHO	URE	FGC	FGS	FAR	FGN	LAC	MNT	GLR	PCE	PAM	ESC	FVA	FPY	FGA	FIS	MAB	MTT	FRU	PLN	PGO	ARG
RZ1-1	Variante 1	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.	
RZ1-2	Variante 2	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.	
RZ1-3	Variante 3	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.	
RZ1I-1	Variante 1	pos.																												
RZ1I-2	Variante 2	pos.																												
RZ1I-3	Variante 3	pos.																												
RZ1II-1	Variante 1	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
RZ1II-2	Variante 2	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
RZ1II-3	Variante 3	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
SAG263-4	Variante 4	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
SAG263-8	Variante 8	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
LZ-5 (SAG2021)	Variante 5	pos.																												
LIP	Variante 1	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
CAl	Variante 1	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
DAI	Variante 1	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
LAI	Variante 1	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
SAG263-11	<i>P.wickerhamii</i>	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	
RW-1	<i>P.wickerhamii</i>	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	

FPH=Phenylalanin, FTR=Tryptophan, FHO=4MU-Phosphat, TRE=Trehalose, SUC=Saccharose, ARA=Arabinose, BGL= p-n-p-β-D-Glukosid, PHO=p-n-p-Phosphat, URE=Harnstoff, FGC =4MU-Glukosid, FGS=4MU-α-D-Glukosid, FAR=Arginin, FGN=4MU- β-D-Gluconid, LAC=Laktose, MNT=Mannitol, GLR=Glyc erol, PCE=p-n-p- β-D-Cellobiosid, PAM=p-n-p- α-D-Maltosid, ESC=Äsculin, FVA=Valin, FPY=L-Pyroglylutaminsäure-AMC, FGA=4MU-N-Azetyl- β-D-Glukosaminid, FIS=Isoleucin, MAB=Methyl- α& β-Glukosid, MTT=Maltotriose, FRU=Fruktose, PLN=Prolin & Leucin-p-Nitroamid, PGO=ONPG & p-n-p- α-D-Galaktosid, ARG=Arginin.

Tabelle33.AssimilationsverhaltenverschiedenerIsolate von *P.zopffii* und *P.wickerhamii* bei Verwendung des Identifikationssystems „BBL-Crystal@Enteric/Nonfermenter“ (FaBeckton-Dick inson, Sparks, USA). Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Die Beurteilung der Reaktionen erfolgte nach 48 Stunden.

Stamm	Spezies/ Variante	ARA	MNS	SUC	MEL	RHA	SOR	MNT	ADO	GAL	INO	PHO	BGL	NPG	PRO	BPH	BXY	AAR	PHC	GLR	NAG	GGL	ESC	PHE	URE	GLY	CIT	MLO	TTC	ARG	LYS
RZ1-1	Variante 1	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.																				
RZ1-2	Variante 2	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.																				
RZ1-3	Variante 3	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.																				
RZ1I-1	Variante 1	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	neg.																					
RZ1I-2	Variante 2	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
RZ1I-3	Variante 3	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
RZ1II-1	Variante 1	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.																						
RZ1II-2	Variante 2	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.																						
RZ1II-3	Variante 3	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.																						
SAG263-4	Variante 4	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
SAG263-8	Variante 8	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
LZ-5 SA2021)	Variante 5	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
LIP	Variante 1	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
CA1	Variante 1	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
DA1	Variante 1	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
LA1	Variante 1	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.																					
SA263-11	<i>P.wickerhamii</i>	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.	neg.																								
RW-1	<i>P.wickerhamii</i>	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	pos.																				

ARA=Arabinose, MNS=Mannose, SUC=Saccharose, MEL=Melibiose, RHA=Rhamnose, SOR=Sorbitol, MNT=Mannitol, ADO=Adonitol, GAL=Galaktose, INO=Inositol, PHO=p-n-p-Phosphat, BGL=p-n-p-β-Glukosid, NPG=p-n-p-β-Galaktosid, PRO=Prolin-Nitroanilid, BPH=p-n-p-Biphenyl, BXY=p-n-p-Xylosid, AAR=p-n-p-α-Arabinosid, PHC=p-n-p-Phosphorylcholin, GLR=γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid, NAG=p-n-p-N-Azetil-Glukosaminid, GGL=γ-L-Glutamyl-p-Nitroanilid, ESC=Äskulin, PHE=Phenylalanin, URE=Harnstoff, GLY=Glycin, CIT=Citrat, MLO=Malonat, TTC=Tetraazolum, ARG=Arginin, LYS=Lysin.

Tabelle 34. Spezifische Antikörper-Aktivitäten im Blut und unterschiedlicher klinischer und kultureller Stadien

ut- und Milchserum von Tieren mit der Protothekenmastitis.

Nr.	Bestand	Infektionsstadium	kultureller Befund	Serum-IgG [EU]	Milchserum-IgA [EU]	Milchserum-IgG [EU]
1	A	akut	positiv	115	81	30
2	A	akut	positiv	134	81	39
3	A	akut	positiv	307	182	61
4	A	akut	positiv	107	75	60
5	A	akut	positiv	185	9	52
6	A	akut	positiv	236	30	170
7	A	chronisch	positiv	22	0	0
8	A	chronisch	positiv	114	150	73
9	A	chronisch	positiv	73	122	28
10	A	chronisch	positiv	107	53	21
11	A	chronisch	positiv	115	120	24
12	A	chronisch	positiv	87	137	27
13	A	chronisch	positiv	73	4	4
14	A	chronisch	positiv	81	147	34
15	A	chronisch	positiv	77	11	6
16	A	chronisch	positiv	127	175	153
17	A	chronisch	positiv	214	174	60
18	A	chronisch	positiv	37	4	13
19	A	chronisch	positiv	54	163	213
20	A	chronisch	positiv	62	194	182
21	A	chronisch	positiv	135	9	20
22	A	chronisch	positiv	22	2	0
23	A	chronisch	positiv	30	4	1
24	A	chronisch	positiv	47	24	32
25	A	chronisch	positiv	176	10	3
26	A	chronisch	positiv	77	11	6
27	A	chronisch	positiv	30	7	3
28	A	chronisch	negativ, ehem. positiv ^a	14	0	0
29	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	14	0	0
30	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	15	0	0
31	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	28	0	0
32	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	13	0	0
33	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	14	21	3
34	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	21	4	1
35	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	17	0	0
36	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	20	2	0
37	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	34	4	4
38	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	32	10	22
39	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	35	49	139
40	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	36	2	2
41	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	22	50	20
42	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	41	0	0

Tabelle 34 Fortsetzung auf Seite 26.

Tabell 34 Fortsetzung von Seite 25.

Nr.	Bestand	Infektionsstadium	kultureller Befund	Serum-IgG [EU]	Milchserum-IgA [EU]	Milchserum-IgG [EU]
43	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	32	0	0
44	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	19	0	0
45	A	chronisch	negativ, ehem. positiv	16	2	0
46	A	eutergesund	negativ	34	0	0
47	A	eutergesund	negativ	24	0	0
48	A	eutergesund	negativ	23	0	0
49	A	eutergesund	negativ	26	0	0
50	A	eutergesund	negativ	12	0	0
51	A	eutergesund	negativ	12	0	0
52	A	eutergesund	negativ	23	0	0
53	A	eutergesund	negativ	30	1	0
54	A	eutergesund	negativ	17	0	0
55	A	eutergesund	negativ	16	0	0
56	A	eutergesund	negativ	15	0	0
57	A	eutergesund	negativ	12	0	0
58	A	eutergesund	negativ	10	0	0
59	A	eutergesund	negativ	14	0	0
60	A	eutergesund	negativ	19	2	0
61	A	eutergesund	negativ	18	0	0
62	A	eutergesund	negativ	15	0	0
63	A	eutergesund	negativ	8	0	0
64	A	eutergesund	negativ	16	0	0
65	A	eutergesund	negativ	18	0	0
66	A	eutergesund	negativ	20	0	0
67	A	eutergesund	negativ	19	0	0
68	A	eutergesund	negativ	14	0	0
69	A	eutergesund	negativ	17	0	0
70	A	eutergesund	negativ	16	0	0
71	A	eutergesund	negativ	12	0	0
72	A	eutergesund	negativ	9	0	0
73	A	eutergesund	negativ	17	0	0
74	A	eutergesund	negativ	29	0	0
75	A	eutergesund	negativ	26	0	0
76	A	eutergesund	negativ	18	0	0
77	A	eutergesund	negativ	22	0	0
78	A	eutergesund	negativ	31	0	0
79	A	eutergesund	negativ	20	0	1
80	A	eutergesund	negativ	15	0	0
81	A	eutergesund	negativ	25	0	0
82	A	eutergesund	negativ	11	0	0
83	A	eutergesund	negativ	8	0	1
84	A	eutergesund	negativ	25	0	0
85	A	eutergesund	negativ	25	0	0
86	C	eutergesund	negativ	22	0	0
87	C	eutergesund	negativ	24	0	0

Tabell 34 Fortsetzung auf Seite 27.

Tabell 34 Fortsetzung von Seite 26.

Nr.	Bestand	Infektionsstadium	kulturelle Befund	Serum-IgG [EU]	Milchserum-IgA [EU]	Milchserum-IgG [EU]
88	C	eutergesund	negativ	28	0	0
89	C	eutergesund	negativ	24	0	0
90	C	eutergesund	negativ	19	0	0
91	C	eutergesund	negativ	29	0	0
92	C	eutergesund	negativ	27	0	0
93	C	eutergesund	negativ	22	0	0
94	C	eutergesund	negativ	12	0	0
95	C	eutergesund	negativ	19	0	0
96	C	eutergesund	negativ	17	0	0
97	C	eutergesund	negativ	13	1	0
98	C	eutergesund	negativ	13	0	0
99	C	eutergesund	negativ	19	0	0

^a negativ, ehem. positiv = Diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung kulturell *Prototheca*-negativ. Von diesen Tieren lag abereinführerpositiver *Prototheca*-befund vor, der mittels Plattenkulturen erhoben wurde.

Tabelle 35. Verlauf (Rohdaten) der Erregerausscheidung und der spezifischen Antikörperantwort in der Milch bei der Protothekenmastitis des Rindes. Die Untersuchung erfolgte durch dreimalige Bestandsuntersuchung (6-Monats-Intervalle) mittels Plattenkultur und mittels des IgA- und IgG₁-ELISA im Milchserum.

Kategorie ¹	Tier-Nr.	1 Bestands-Untersuchung ²		Zwischen-Untersuchung		2 Bestands-Untersuchung			3 Bestands-Untersuchung		
		BU ³	IgA	BU	IgA	BU	IgA	IgG ₁	BU	IgA	IgG ₁
1	116	0	?	+	2	0	0	1	0	0	0
1	395	(+) ⁴	? ⁵	nichtuntersucht		0	0	10	0	0	0
1	580	+++	1	nichtuntersucht		0	0	0	0	0	0
1	555	0	0	nichtuntersucht		+++	2	5	0	0	0
1	565	0	0	nichtuntersucht		+++	0	0	0	0	0
1	747	0	0	nichtuntersucht		+++	2	17	0	0	0
1	736	0	0	nichtuntersucht		+++	6	1	0	0	0
2	422	0	0	+++	1	+++	2	14	0	1	1
2	651	+++	0	nichtuntersucht		+++	1	6	0	0	2
2	606	0	0	nichtuntersucht		+++	2	6	0	0	1
2	713	nichtuntersucht		+	0	0	0	1	0	1	?
3	132	+	2	nichtuntersucht		++	17	20	gemerzt		
3	138	++	36	nichtuntersucht		+++	0	0	gemerzt		
3	186	(+) ⁴	0	nichtuntersucht		(+)	484	45	gemerzt		
3	197	+	43	nichtuntersucht		++	78	23	gemerzt		
3	234	0	0	nichtuntersucht		+++	5	10	gemerzt		
3	240	(+)	0	+	1	++	2	1	gemerzt		
35	242	0	? ⁵	+	1	+++	11	11	+++	6	26
35	244	0	4	nichtuntersucht		+++	1	14	+++	3	9
3	248	+++	0	+++	2	+++	120	29	+++	38	16
3	249	+++	15	nichtuntersucht		++	?	0	++	16	4
3	273	nichtuntersucht		+	?	+++	24	22	gemerzt		
3	330	++	0	nichtuntersucht		+++	20	7	gemerzt		
3	349	+++	5	+++	11	+++	140	65	gemerzt		
3	363	n.u.	n.u.	+	1	+++	?	10	gemerzt		
35	367	0	?	nichtuntersucht		+	2	1	+++	152	12
3	377	+++	2	nichtuntersucht		+++	2	8	gemerzt		
3	380	(+)	0	+	?	+++	5	12	(+)	0	1
3	516	+++	?	nichtuntersucht		++	1	10	+	12	9
35	528	0	53	nichtuntersucht		+++	3	14	+++	44	29
3	633	+++	0	+++	1	+++	13	22	+++	49	29
35	636	0	22	nichtuntersucht		+++	18	0	(+)	21	2
3	638	++	49	nichtuntersucht		++	6	6	gemerzt		
3	656	+++	151	nichtuntersucht		+++	59	66	gemerzt		
3	672	+++	52	nichtuntersucht		++	32	2	0	32	7
3	675	+++	0	nichtuntersucht		(+)	3	9	+++	12	43
3	734	0	0	+	1	++	1	1	gemerzt		
3	903	+++	37	nichtuntersucht		+++	4	1	+++	265	5
3	563	0	0	nichtuntersucht		+++	0	0	+++	33	12
3	488	Hefen+++		nichtuntersucht		+++	0	0	(+)	0	1
3	532	0	0	nichtuntersucht		+++	1	3	(+)	0	1

Tabelle 35 Fortsetzung auf Seite 29.

Tabell 35 Fortsetzung von Seite 28.

Kategorie ¹	Tier-Nr.	1 Bestands-Untersuchung ²		Zwischen-Untersuchung		2 Bestands-Untersuchung			3 Bestands-Untersuchung		
		BU ³	IgA	BU	IgA	BU	IgA	IgG ₁	BU	IgA	IgG ₁
3	508	0	0	nichtuntersucht		+++	0	1	+++	3	3
3	409	0	0	nichtuntersucht		+++	0	39	+	30	13
3	399	0	0	nichtuntersucht		+++	9	4	+++	12	39
3	80	0	0	nichtuntersucht		++	1	4	++	?	1
3	101	0	0	nichtuntersucht		+	13	5	++	1	?
3	625	0	0	nichtuntersucht		+++	56	20	(+)	30	1
3	525	0	0	nichtuntersucht		+++	22	11	+	0	1
3	587	0	0	nichtuntersucht		+++	0	1	++	24	4
3	514	0	0	nichtuntersucht		+++	22	19	++	132	45
3	919	+	57	nichtuntersucht		+++	16	14	+++	106	3
4	374	+++	0	nichtuntersucht		0	0	0	+++	7	1
4	735	Trockensteher		+	3	0	0	0	+	0	6
4	338	++	2	nichtuntersucht		0	0	3	+	1	2
5	644	0	0	nichtuntersucht		0	6	0	+++	119	23
5	181	0	3	nichtuntersucht		0	2	3	(+)		
5	562	0	3	nichtuntersucht		0	1	8	+++	2	5
5	485	0	4	nichtuntersucht		0	0	0	(+)	0	0
6	416	0	1	nichtuntersucht		0	1	1		gemerzt	
6	589	0	2	nichtuntersucht		0	?	0		gemerzt	
6	605	0	40	nichtuntersucht		0	6	0		gemerzt	
6	268	nichtuntersucht		0	34	0	0	?		gemerzt	
Tr	535	(+)	1	nichtuntersucht		Trockensteher			+++	7	61
Tr	532	0	0	nichtuntersucht		Trockensteher			(+)	0	1
Tr	320	++	2	nichtuntersucht		Trockensteher			+++	6	12
Tr	256	(+)	8	nichtuntersucht		Trockensteher			+++	10	12
Tr2	137	+	18	nichtuntersucht		Trockensteher			0	3	4
Tr	344	0	1	nichtuntersucht		Trockensteher			0	0	0
Tr5	664	0	?	nichtuntersucht		Trockensteher			+++	5	31

¹ Verlaufsformen der *P. zoffii*-Infektion: **1** = Erregereliminierung, **2** = Erregereliminierung mit in der Milch verbliebenen spezifischen Antikörpern, **3** = persistent infizierte Tiere, **4** = intermittierende Erregerausscheider, **5** = Tiere, die bereits vor dem Ausscheiden der Erreger spezifische Antikörper in der Milch aufwiesen, **6** = Tiere ohne positivem kulturellen Befund aber mit spezifischen Antikörpern in der Milch, **Tr** = Tier, die vor und nach der Trockensteherperiode kulturell und serologisch untersucht wurden.

² Es erfolgte die dreimalige Untersuchung aller Tiere des Bestandes im Abstand von jeweils 6 Monaten. Die Zwischenuntersuchung erfolgte im Anschluß an die erste Bestandsuntersuchung bei allen Mastitis-kranken Tieren sowie bei allen frisch abgekalbten Tieren nach der Kolostrum-Phase.

³ BU = kulturelle Untersuchung der Milchproben, IgA = Nachweis von spezifischen Antikörpern des Isotypes A im Milchserum, IgG₁ = Nachweis von spezifischen Antikörpern des Isotypes G₁ im Milchserum.

⁴ Semiquantitative Bestimmung der Erregerzahl: (+) < 3 Koloniebildende Einheiten (KBE)/50 µl Milch, + = 3 - 20 KBE/50 µl, ++ = 20 - 50 KBE/50 µl, +++ > 50 KBE/50 µl Milch.

⁵ ? = verdächtiger serologischer Befund. Als verdächtiger serologischer Befund galt ein deutlich sichtbarer und messbarer Extinktionserhöhung, die mittels der verwendeten Referenzstandard-methode jedoch rechnerisch nicht erfaßt werden konnte.

	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
RZI-3	CGCCTTTGG	GACCC	CCGGTGAATCATGAT	GGCTTTG-CGGATCG	CAGAGCGCCT	GCGC	GCGGCG-ACGTATCA	TTCAAGTTTCTGC	CC			
SAG 263-4	CGCCTTTGGGCACCC	CCGGTGAATCATGAT	GGCTTTG-YNGATCG	CAGAGCGCCTCGCGC	GCGGCG-ACGTATCA	TTCAAGTTTCTGC	CC					
SAG 2021	CGCCTTTGGGCACCC	CCGGTGAATCATGAT	GGCTTTG-MGGATCG	CAGAGCGCCTCGCGC	GCGGCG-ACGTATCA	TTCAAGTTTCTGC	CC					
Lip	CGCCTTTGGGCACCC	CCGGTGAATCATGAK	GGGTTNNNNNGATCG	CAGAGCGCCTCGCGC	GCGGCG-ACGTATCA	TTCAAGTTTCTGC	CC					
SAG 263-8	CGCCTTTGGGCACCC	CCGGTGAATCATGAT	GGCTTTG-CNGATCG	CAGAGCGCCTCGCGC	GCGGCG-ACGTATCA	TTCAAGTTTCTGC	CC					
RZIII-3	CGCCTTTGG-GACCC	CCGGTGAATCATGAT	GGCTTTG-CRGTATCG	CAGAGCGCCTCGCGC	GCGGCG-ACGTATCA	TTCAAGTTTCTGC	CC					
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
RZI-3	TATCAACTTTGGACG	GTAGGATAGAGGCCT	ACCGTGGTGGTGACG	GGTGACGGAGAATCA	GGGTTTCGATTCCGGA	GAGGGAGCCTGAGAA						
SAG 263-4	TATCAACTTTGGACG	GTAGGATAGAGGCCT	ACCGTGGTGGTGACG	GGTGACGGAGAATCA	GGGTTTCGATTCCGGA	GAGGGAGCCTGAGAA						
SAG 2021	TATCAACTTTGGACG	GTAGGATAGAGGCCT	ACCGTGGTGGTGACG	GGTGACGGAGAATCA	GGGTTTCGATTCCGGA	GAGGGAGCCTGAGAA						
Lip	TATCAACTTTGGACG	GTAGGATAGAGGCCT	ACCGTGGTGGTGACG	GGTGACGGAGAATCV	GGGTTTCGATTCCGGA	GAGGGAGCCTGAGAA						
SAG 263-8	TATCAACTTTGGACG	GTAGGATAGAGGCCT	ACCGTGGTGGTGACG	GGTGACGGAGAATCA	GGGTTTCGATTCCGGA	GAGGGAGCCTGAGAA						
RZIII-3	TATCAACTTTGGACG	GTAGGATAGAGGCCT	ACCGTGGTGGTGACG	GGTGACGGAGAATCA	GGGTTTCGATTCCGGA	GAGGGAGCCTGAGAA						
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450
RZI-3	ACGGCTACCACATCC	AAGGAAGGCAGCAGG	CGCGCAAATTACCCA	ATCCTGACGCAGGGA	GGTAGTGACAATACG	TAGCGATGCCGA	AACT					
SAG 263-4	ACGGCTACCACATCC	AAGGAAGGCAGCAGG	CGCGCAAATTACCCA	ATCCTGACGCAGGGA	GGTAGTGACAATACG	TAGCGATGCCGA	AACT					
SAG 2021	ACGGCTACCACATCC	AAGGAAGGCAGCAGG	CGCGCAAATTACCCA	ATCCTGACGCAGGGA	GGTAGTGACAATACG	TAGCGATGCCGA	AACT					
Lip	ACGGCTACCACATCC	AAGGAAGGCAGCAGG	CGCGCAAATTACCCA	ATCCTGACGCAGGGG	GGTAGTGACAANACN	TNNCRRTGCCGA	AACT					
SAG 263-8	ACGGCTACCACATCC	AAGGAAGGCAGCAGG	CGCGCAAATTACCCA	ATCCTGACGCAGGGA	GGTAGTGACAATACG	TAGCGATGCCGA	AACT					
RZIII-3	ACGGCTACCACATCC	AAGGAAGGCAGCAGG	CGCGCAAATTACCCA	ATCCTGACGCAGGGA	GGTAGTGACAATACG	TAGCGATGCCGA	AACT					
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540
RZI-3	TTTCAGTTTGGCAATC	GAAATGAGGGCAAAC	TAAACCCACACCGA	GGATCTATTGGAGGG	CAAGTCTGGTGCCAG	CAGCCCGGTAATTC						
SAG 263-4	TTTCAGTTTGGCAATC	GAAATGAGGGCAAAC	TAAACCCACACCGA	GGATCTATTGGAGGG	CAAGTCTGGTGCCAG	CAGCCCGGTAATTC						
SAG 2021	TTTCAGTTTGGCAATC	GAAATGAGGGCAAAC	TAAACCCACACCGA	GGATCTATTGGAGGG	CAAGTCTGGTGCCAG	CAGCCCGGTAATTC						
Lip	TTTCAGTTTGGCAATC	GAAATGAGGGCAAAC	TAAACCCACACCGA	GGATCTATTGGAGGG	CAAGTCTGGTGCCAG	CAGCCCGGTAATTC						
SAG 263-8	TTTCAGTTTGGCAATC	GAAATGAGGGCAAAC	TAAACCCACACCGA	GGATCTATTGGAGGG	CAAGTCTGGTGCCAG	CAGCCCGGTAATTC						
RZIII-3	TTTCAGTTTGGCAATC	GAAATGAGGGCAAAC	TAAACCCACACCGA	GGATCTATTGGAGGG	CAAGTCTGGTGCCAG	CAGCCCGGTAATTC						
	541	555	556	570	571	585	586	600	601	615	616	630
RZI-3	CAGTCCAAGAGCGT	ATATAANARTTGCTG	CAGTTAAAAAGCTCG	TAGTTGGATGTAGAC	GGTCGCTCGCGAGGC	GGTCCC						
SAG 263-4	CAGTCCAAGAGCGT	ATATAANARTTGCTG	CAGTTAAAAAGCTCG	TAGTTGGATGTAGAC	GGTCGCTCGCGAGGC	GGTCCC						
SAG 2021	CAGTCCAAGAGCGT	ATATAANARTTGCTG	CAGTTAAAAAGCTCG	TAGTTGGATGTAGAC	GGTCGCTCGCGAGGC	GGTCCC						
Lip	CAGTCCAAGAGCGT	ATATAANARTTGCTG	CAGTTAAAAAGCTCG	TAGTTGGATGTAGAC	GGTCGCTCGCGAGGC	GGTCCC						
SAG 263-8	CAGTCCAAGAGCGT	ATATAANARTTGCTG	CAGTTAAAAAGCTCG	TAGTTGGATGTAGAC	GGTCGCTCGCGAGGC	GGTCCC						
RZIII-3	CAGTCCAAGAGCGT	ATATAANARTTGCTG	CAGTTAAAAAGCTCG	TAGTTGGATGTG-AC	GGTCGCTCGCGAGGC	GGTCCC						
	631	645	646	660	661	675	676	690	691	705	706	720
RZI-3	CGGAGCACCCCTTCG	GCGTCCTCTGGCTGG	CGAGCGTCGCGGCTG	GGCTTCACCGCTCGG	CCGCGGGCCTCGCCG	TGGTTACTTTGAGTA						
SAG 263-4	CGGAGCACCCCTTCG	GCGTCCTCTGGCTGG	CGAGCGTCGCGGCTG	GGCTTCACCGCTCGG	CCGCGGGCCTCGCCG	TGGTTACTTTGAGTA						
SAG 2021	CGGAGCACCCCTTCG	GCGTCCTCTGGCTGG	CGAGCGTCGCGGCTG	GGCTTCACCGCTCGG	CCGCGGGCCTCGCCG	TGGTTACTTTGAGTA						
Lip	CGGAGCACCCCTTCG	GCGTCCTCTGGCTGG	CGAGCGTCGCGGCTG	GGCTTCACCGCTCGG	CCGCGGGCCTCGCCG	TGGTTACTTTGAGTA						
SAG 263-8	CGGAGCACCCCTTCG	GCGTCCTCTGGCTGG	CGAGCGTCGCGGCTG	GGCTTCACCGCTCGG	CCGCGGGCCTCGCCG	TGGTTACTTTGAGTA						
RZIII-3	CGGAGCACCCCTTCG	GCGTCCTCTGGCTGG	CGAGCGTCGCGGCTG	GGCTTCACCGCTCGG	CCGCGGGCCTCGCCG	TGGTTACTTTGAGTA						
	721	735	736	750	751	765	766	780	781	795	796	810
RZI-3	AAATGGAGTGTTC	AGCAGGCGTTCGCGC	TGG-ACACGTTAGCA	TGGWATAACGGCACA	GGACTCTGGCCTGTC	CCGTTGGTCTGCAGG						
SAG 263-4	AAATGGAGTGTTC	AGCAGGCGTTCGCGC	TGG-ACACGTTAGCA	TGGWATAACGGCACA	GGACTCTGGCCTGTC	CCGTTGGTCTGCAGG						
SAG 2021	AAATGGAGTGTTC	AGCAGGCGTTCGCGC	TGG-ACACGTTAGCA	TGGWATAACGGCACA	GGACTCTGGCCTGTC	CCGTTGGTCTGCAGG						
Lip	AAATGGAGTGTTC	AGCAGGCGTTCGCGC	TGG-ACACGTTAGCA	TGGWATAACGGCACA	GGACTCTGGCCTGTC	CCGTTGGTCTGCAGG						
SAG 263-8	AAATGGAGTGTTC	AGCAGGCGTTCGCGC	TGG-ACACGTTAGCA	TGGWATAACGGCACA	GGACTCTGGCCTGTC	CCGTTGGTCTGCAGG						
RZIII-3	AAATGGAGTGTTC	AGCAGGCGTTCGCGC	TGG-ACACGTTAGCA	TGGWATAACGGCACA	GGACTCTGGCCTGTC	CCGTTGGTCTGCAGG						
	811	825	826	840	841	855	856	870	871	885	886	900
RZI-3	ACCGG-AGTAATGAT	GAAGAGGAACAGTCG	GGGGCATTCTGATTT	CGTTGTCTCAGAGGTGA	AAATCTTTGGATTTAC	GAAAGACGAACCACT						
SAG 263-4	ACCGG-AGTAATGAT	GAAGAGGAACAGTCG	GGGGCATTCTGATTT	CGTTGTCTCAGAGGTGA	AAATCTTTGGATTTAC	GAAAGACGAACCACT						
SAG 2021	ACCGG-AGTAATGAT	GAAGAGGAACAGTCG	GGGGCATTCTGATTT	CGTTGTCTCAGAGGTGA	AAATCTTTGGATTTAC	GAAAGACGAACCACT						
Lip	ACCGG-AGTAATGAT	GAAGAGGAACAGTCG	GGGGCATTCTGATTT	CGTTGTCTCAGAGGTGA	AAATCTTTGGATTTAC	GAAAGACGAACCACT						
SAG 263-8	ACCGG-AGTAATGAT	GAAGAGGAACAGTCG	GGGGCATTCTGATTT	CGTTGTCTCAGAGGTGA	AAATCTTTGGATTTAC	GAAAGACGAACCACT						
RZIII-3	ACCGG-AGTAATGAT	GAAGAGGAACAGTCG	GGGGCATTCTGATTT	CGTTGTCTCAGAGGTGA	AAATCTTTGGATTTAC	GAAAGACGAACCACT						
	901	915	916	930	931	945	946	960	961	975	976	990
RZI-3	GCGAAAGCATTTG	CAAGGATGTTTTCGT	TAATCAAGAACGAAA	GTTGGGGGCTCGAAG	ACGATTAGATACCGT	CCTAGTCTCAACCGT						
SAG 263-4	GCGAAAGCATTTG	CAAGGATGTTTTCGT	TAATCAAGAACGAAA	GTTGGGGGCTCGAAG	ACGATTAGATACCGT	CCTAGTCTCAACCGT						
SAG 2021	GCGAAAGCATTTG	CAAGGATGTTTTCGT	TAATCAAGAACGAAA	GTTGGGGGCTCGAAG	ACGATTAGATACCGT	CCTAGTCTCAACCGT						
Lip	GCGAAAGCATTTG	CAAGGATGTTTTCGT	TAATCAAGAACGAAA	GTTGGGGGCTCGAAG	ACGATTAGATACCGT	CCTAGTCTCAACCGT						
SAG 263-8	GCGAAAGCATTTG	CAAGGATGTTTTCGT	TAATCAAGAACGAAA	GTTGGGGGCTCGAAG	ACGATTAGATACCGT	CCTAGTCTCAACCGT						
RZIII-3	GCGAAAGCATTTG	CAAGGATGTTTTCGT	TAATCAAGAACGAAA	GTTGGGGGCTCGAAG	ACGATTAGATACCGT	CCTAGTCTCAACCGT						

Abbildung 14. Vergleich der partiellen Sequenzen der 18 SrDNA von verschiedenen *P. zopfii* -Stämmen. Die Stämme wurden biochemisch und serologisch den folgenden Varianten von *P. zopfii* zugeordnet: RZ I-3 = Variante I; SAG 263-4, SAG 2021 und Lip = Variante II; SAG 263-8 und RZ III-3 = Variante III. Die spezifischen Nukleotide der Varietäten sind rot und die der Variante II blau unterlegt.

Chemikalien und Reagenzien

ELISA-Gebrauchslösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 0,15M pH 7,4

NaCl	85,0g
Na ₂ HPO ₄ (x2H ₂ O)	14,8g (8,5g)
KH ₂ PO ₄	3,54g
Abidest	adl Liter

Diese Stocklösung 10n Abidest verdünnt ergibt die Gebrauchslösung mit pH-Wert 7,2-7,4. Die Gebrauchslösung ist für ihren Einsatz zu autoklavieren.

PBS-Tween 0,05%

0,5ml Tween 20 adl Liter PBS

Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer)

NaHCO ₃	8,4g
Abidest	adl Liter

Der pH-Wert wird mit Na₂CO₃ auf 9,6 eingestellt.

Blockierungspuffer

Gelatin (Fa Serva)	5g
PBS	adl Liter

Zitrat-Phosphat-Puffer für die Substratlösung

Zitronensäure-Monohydrat	21,01g
Abidest	adl Liter

Na ₂ HPO ₄	35,8g
Abidest	adl Liter

Die Na₂HPO₄-Lösung wird mit der 0,1M Zitratlösung auf pH 4,25 eingestellt.

Substratlösung für den ELISA

0,8mg ABTS pro ml Zitrat-Phosphat-Puffer zugeben. Die Lagerung kann bei -20°C bis zum Gebrauch erfolgen. Nachdem Auftauen werden 25µl H₂O₂ 1% in pro 10ml Substratlösung hinzugefügt.

Pufferlösungen und Reagenzien für Gel-Elektrophorese und Immuno-Blot

Sammelgelpuffer (1,5M Tris-HCl pH 8)

Tris (Fa. Serva)	6g
Aqua bidest	60ml

Der pH-Wert wird mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und die Lösung auf 100ml mit Aqua bidest aufgefüllt.

Trenngelpuffer (0,5M Tris-HCl pH 8)

Tris	54,45g
Aqua dest.	150ml

Der pH-Wert wird mit HCl auf pH 8 eingestellt und mit Aqua bidest auf 600ml aufgefüllt.

Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

APS (Fa. Serva)	10% (w/vol)
-----------------	-------------

Die Lösung wird mit Aqua bidest vor dem Gebrauch frisch angefertigt.

Trenn- und Sammelgels (je 10ml)

	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
Aqua dest	3,35ml	1,3ml
1,5M Tris-HCl pH 8	2,5ml	-
0,5M Tris-HCl pH 8	-	2,5ml
10% (w/vol) SDS-Lösung	10µl	10µl
Acrylamid-Stammlösung	4,0ml	1,3ml
10% (w/vol) APS-Lösung	5µl	5µl
TEMED	5µl	1µl

SDS-Probenpuffer(8,0ml)

Aquadest	3,0ml
0,5M Tris-HCl(pH.8)	1,0ml
Glycerol	1,6ml
10%SDS	1,6ml
β -Mercaptoethanol	0,4ml
0,5%Bromphenolblau(w/vol)	0,4ml

Elektroden-Puffer

Tris	0,025M(pH,3)
Glycin	0,192M
SDS	1%(w/vol)

Coomassie®-Färbelösung

Coomassie®BrillanBlauR250	1,25g
Methanol	225ml
Eisessig	50ml
Adest	225ml

Coomassie®-Entfärbelösung

Methanol	300ml
Eisessig	100ml
Adest	600ml

Prototheken-Isolations-MediumachPor(1973)

Kaliumhydrogenphthalat	10,0g
Natriumhydroxid	0,9g
Magnesiumsulfat	0,1g
Kaliumhydrogenphosphat	0,2g
Ammoniumchlorid	0,3g
Glukose	10,0g
Thiaminhydrochlorid	0,001g
Fluorocytosin	0,25g
Agar	20,0g
Adest	ad 1000ml

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis aufgeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenso sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Desweiteren erkläre ich, dass Teile der Ergebnisse aus der vorliegenden Dissertation bereits unter der folgenden Titel veröffentlicht wurden:

1. Rösler, U., Scholz, H., Hensel, A. (2000): Die lokale und systemische Antikörperantwort bei der Protothekenmastitis der Rinde und Stand der Diagnostik, In: Proc. Tagung der Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie", 15.-17. Juni 2000, Leipzig Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 138 -142.
2. Roesler, U., Scholz, H., Hensel, A. (2001): Immunodiagnostische Identifikation von dairy cows infiziert mit *P. zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *J Clin Microbiol* . **39**, 539-543.

Leipzig im

Jun 2001

Uwe Rösler

DANKSAGUNG

Zum Schluß meiner Arbeit möchte ich allen, die mit Worten und Taten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben herzlich danken.

Insbesondere dank ich:

- ◆ Herrn Professor Dr. Dr. A. Hense für die Bereitstellung und wissenschaftliche Betreuung des Themas dieser Arbeit, die stets gewährte Hilfe sowie für die Bereitstellung einer Doktorandenförderstelle.
- ◆ Herrn Professor Dr. A. Bergmann für die Orientierungshilfen in Richtung der Protothekose des Rindes sowie die wertvollen Ratschläge zu diesem Thema.
- ◆ Herrn Dr. Holger Scholz für die solide Einweisung und Einarbeitung in die Geheimnisse der Molekularbiologie sowie für seine Arbeit an und nach dem Tag und Nacht.
- ◆ Herrn Dr. A. Meyer und Herrn Göpfert für die tatkräftige Unterstützung bei der Gewinnung der Blut- und Milchproben.
- ◆ Frank Wagner für die Herstellung des Anti-*Cryptococcus*-Hyperimmunserums.
- ◆ herzlich Dana Rüster und Eveline Brumme für die zuverlässige und immerwährende Unterstützung im Labor.
- ◆ ebenso herzlich den „Container-Kindern“, bestehend aus: Torsten Herold, Thorsten Arnold, Peter Burger, Steffi Mauer, Melanie Hassel und Heike Marg für ihre aufmunternden Worte und die Nachsicht mit meiner großen und kleineren Schwächen.
- ◆ den Angehörigen des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen für die ständig freundliche Unterstützung geglicher Art.
- ◆ allen anderen ungenannten Personen, die mit Worten und Taten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.