

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Induktion einer mammären Endotoxintoleranz zur Mastitis-Prophylaxe bei der puerperalen Kuh

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

von Katharina Waldmüller
aus Immenstadt im Allgäu

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Gefördert aus Mitteln der Firma Pfizer Animal Health Europe Paris
durch Personal- und Sachmittel.

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Die <i>E. coli</i>-Mastitis des Rindes	3
1.1	<i>Escherichia coli</i>	3
1.2	Ätiologie und Pathogenese	4
1.2.1	Die Reaktion des angeborenen Immunsystems bei intramammärer <i>E. coli</i> -Infektion	5
1.2.2	Lipopolysaccharid	5
1.2.3	Zelluläre Abwehr des unspezifischen Immunsystems: Makrophagen und neutrophile Granulozyten	6
1.3	Klinische Symptomatik	8
1.4	Besonderheiten der <i>E. coli</i> -Mastitis im geburtsnahen Zeitraum	9
1.4.1	Hormonelle Einflüsse	10
1.4.2	Metabolische Einflüsse	12
2	Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes	13
2.1	Historischer Hintergrund	14
2.2	Entstehung der Endotoxintoleranz	14
2.3	Positive Effekte der Endotoxintoleranz	15
3	Lokalisationsspezifische Wirt-Pathogen-Interaktionen in der bovinen Milchdrüse	16
3.1	Strichkanal	16
3.2	Fürstenberg'sche Rosette	17
3.3	Zitzen- und Drüsenzisterne	17
3.4	Drüsenparenchym	18
3.5	Vergleichende Beobachtungen von Wirt-Pathogen-Interaktionen in unterschiedlichen Kompartimenten der Milchdrüse	19
III	MATERIAL UND METHODEN	21
1	Materialien	21
1.1	Geräte	21
1.2	Klinikbedarf	22
1.3	Laborbedarf	23

1.4	Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien	24
1.5	Puffer und Lösungen	25
1.5.1	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	25
1.5.2	Lösungen für die Durchflusszytometrie	25
1.6	Versuchstiere	26
1.7	Modellkeim <i>E. coli</i> 1303	26
2	Methoden.....	28
2.1	Tierschutzantrag	28
2.2	Tiermodell	28
2.3	Voruntersuchung der Probanden	32
2.4	Lipopolysaccharid (LPS).....	34
2.4.1	Extraktion des LPS	34
2.4.2	Herstellung der Inokulationsdosis von LPS	35
2.4.3	Intramammäre Applikation des LPS	35
2.5	Modellkeim <i>E. coli</i> 1303	36
2.5.1	Herstellung der Infektionsdosis	36
2.5.2	Experimentelle Infektion	37
2.6	Gewinnung von Milchproben.....	37
2.7	Erhebung und Beurteilung allgemeiner klinischer Parameter.....	38
2.8	Erhebung und Beurteilung von Parametern am Euter.....	40
2.9	Labordiagnostische Beurteilung des Eutersekrets.....	42
2.9.1	Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets	42
2.9.2	Bestimmung von Milchinhaltsstoffen und der somatischen Zellzahl (SCC).....	42
2.10	Quantifizierung und Charakterisierung von Milchzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	43
2.10.1	Aufarbeitung der Milchproben für die Durchflusszytometrie.....	43
2.10.2	Vitalitätsbeurteilung und Quantifizierung nach Acridin- Orange/Propidiumjodid-Färbung	44
2.11	Klinische Labordiagnostik	46
2.11.1	Gewinnung von venösem Blut	46
2.11.2	Rotes Blutbild.....	46
2.11.3	Gewinnung von Serum und Plasma	46
2.11.4	Progesteronbestimmung aus dem Serum	47
2.12	Gewinnung von Gewebeproben	47

2.13	Statistische Verfahren	48
IV	ERGEBNISSE	50
1	Versuche zur Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS	50
1.1	Effekte der kurzfristigen und lokal begrenzten LPS-Exposition	50
1.1.1	Allgemeinbefinden	51
1.1.2	Rektale Körpertemperatur	51
1.1.3	Lokale Veränderungen am Euter.....	52
1.1.4	Sekretbefund nach LPS-Infusion	53
1.1.5	Somatische Zellzahl (SCC)	54
1.2	Effekte einer kurzzeitigen intrazisternalen oder intramammären LPS-Behandlung auf eine nachfolgende experimentelle Infektion mit <i>E. coli</i>	57
1.2.1	Allgemeinbefinden	57
1.2.2	Rektale Körpertemperatur	57
1.2.3	Lokale klinische Effekte.....	58
1.2.4	Somatische Zellzahl der Milch.....	59
2	Versuche zur intramammär induzierten Endotoxintoleranz bei Kühen im puerperalen Zeitraum.....	61
2.1	Effekte der alleinigen LPS-Infusion.....	61
2.1.1	Allgemeinbefinden	61
2.1.2	Rektale Körpertemperatur	61
2.1.3	Blutbild.....	62
2.1.4	Lokale klinische Veränderungen am Euter	64
2.1.4.1	Palpatorisch und adspektorisch erfassbare Veränderungen	64
2.1.4.2	Somatischer Zellgehalt der Milch	64
2.1.4.3	Milchleistung.....	65
2.1.4.4	Sekretveränderungen	66
2.1.4.5	Milchinhaltsstoffe.....	67
2.2	Effekte einer experimentellen Infektion mit <i>E. coli</i> 72h nach LPS-Vorbehandlung	69
2.2.1	Allgemeinbefinden	70
2.2.2	Rektale Körpertemperatur	71
2.2.3	Blutbild.....	74

2.2.4	Lokale klinische Veränderungen am Euter	75
2.2.5	Somatischer Zellgehalt der Milch (SCC)	76
2.2.6	Milchleistung	78
2.2.7	Sekretveränderungen	79
2.2.8	Milchinhaltsstoffe	80
2.2.9	Bakteriologische Befunde	83
2.3	Milchzelldifferenzierung bei puerperalen Kühen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	84
2.3.1	Veränderungen der Leukozytenfraktionen in den ersten 36 h <i>post</i> <i>partum</i>	84
2.3.2	Effekte der LPS-Infusion auf das Differentialzellbild der Milch puerperaler Kühe	85
2.3.3	Effekte einer experimentellen Infektion mit <i>E. coli</i> auf das Differentialzellbild der Milch puerperaler Kühe mit und ohne LPS- Vorbehandlung	87
V	DISKUSSION	89
1	Konzeptionelle Überlegungen	89
1.1	LPS und der Modellkeim <i>E. coli</i> 1303	89
1.2	Messparameter	91
2	Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS	92
2.1	Nur wenige lokale Entzündungssymptome infolge einer 30minütigen intrazisternalen LPS-Behandlung	94
2.2	Effekte einer mammären <i>E. coli</i> -Inokulation nach intrazisternaler LPS-Behandlung	96
3	Intramammäre Induktion einer Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh	97
3.1	Überlegungen zum Tiermodell	98
3.2	LPS-vermittelte Effekte	98
3.3	Auswirkungen der experimentellen intramammären Infektion mit <i>E. coli</i> 1303 bei LPS-vorbehandelten primiparen und multiparen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren	100
3.3.1	LPS-behandelte und -unbehandelte Tiere reagieren mit einer unterschiedlichen PMN-Dynamik auf eine <i>E. coli</i> -Exposition	101
3.3.2	Verbesserte bakterielle Elimination durch LPS-Vorbehandlung	103

3.3.3	Die Zusammensetzung der Milch spiegelt den Grad der Entzündung wider.....	104
4	Schlussbetrachtungen und Ausblick	105
VI	ZUSAMMENFASSUNG	108
VII	SUMMARY.....	111
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	114
IX	DANKSAGUNG	125

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SI-Einheiten, Abkürzungen und Zeichen chemischer Elemente sowie ihre Formeln sind in diesem Verzeichnis nicht aufgeführt.

Δ	Delta (Differenz)
μ	mikro
<i>ad us. vet.</i>	<i>ad usum veterinare</i> (lateinisch: für tierärztlichen Gebrauch)
<i>a. p.</i>	<i>ante partum</i>
AO	Acridin-Orange
AOHA	Acyloxyacyl Hydrolase
<i>Aqua tridest.</i>	<i>Aqua tridestillata</i> (lateinisch: dreifach destilliertes Wasser)
AST	Aspartat-Aminotransferase
BHI	Brain-Heart Infusion Broth
bzw.	beziehungsweise
C5a	Opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente C5
ca.	circa
CCL20	C-C-Motif Ligand 20
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony Forming Units
CK	Creatinkinase
„Cl“	Bezeichnung der Versuchsgruppe: Clamp; Kühe mit aufgesetzter Zitzenklemme
„Cl_L“	Bezeichnung der Versuchsgruppe: Clamp_LPS; LPS-Vorbehandlung mit 10 μ g LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne
CMT	California Mastitis Test
COX-2	Cyclooxygenase-2
CpG	Cytosin-Guanin-Motiv
d	<i>dies</i> (lateinisch: Tag)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
„EC“	Bezeichnung der Versuchsgruppe: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lateinisch: und andere)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Scanner (Durchflusszytometer)
FL1, FL2, FL3	Messkanäle des Durchflusszytometers für emmitierte Fluoreszenz FL1 = Grünfluoreszenz, FL2 = Orangefluoreszenz, FL3 = Rotfluoreszenz
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin Gamma
IL	Interleukin
IQR	Inter Quartil Range
IRAK-M	IL-1R-associated Kinase-M
IRF	Interferon Regulatory Factor-3
IU	International Units
i. v.	intravenös
„L“	Bezeichnung der Versuchsgruppe: LPS-Vor- behandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min
LBP	LPS-binding Protein
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichoic Acid
„L72EC“	Bezeichnung der Versuchsgruppe: mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation
MD-2	Lymphocyte Antigen 96
MEC	Mammary Epithelial Cells
min	Minute(n)
MHC	Major Histocompatibility Complex

MNC	Mononuclear Leukocytes
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl der Einzelbeobachtungen bei Berechnung des Mittelwertes
NEFA	Non-esterified Fatty Acid
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NFκB	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells
NOS	Nitric Oxide Synthetase
o. b. B.	ohne besonderem Befund
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
PAF	platelet activating factor
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
„pEC“	Bezeichnung der Versuchsgruppe: multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung
PJ	Propidiumiodid
„pL72EC“	Bezeichnung der Versuchsgruppe: multipare, mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche
PMN	Polymorphonuclear Leukocytes
<i>p. infect.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>p. infus.</i>	<i>post infusionem</i>
<i>p. p.</i>	<i>post partum</i>
PRR	Pattern Recognition Receptor
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SCC	Somatic Cell Count
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Error of the Mean
sog.	sogenannte(r)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
TLR	Toll-like-Receptor
TMR	Totale Mischration
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSB	Trypticase-Soy Broth

vgl.	vergleiche
VRB-Agar	Violet-Red Bile Agar
x g	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/ s ²)
z. B.	zum Beispiel

I EINLEITUNG

Die Euterentzündung (Mastitis) gilt als die bedeutendste Einzeltierererkrankung des Milchrindes. Hierbei wird die akute klinische Mastitis vor allem durch *Escherichia coli* (*E. coli*) verursacht. Gerade puerperale Kühe ab der zweiten Laktation sind besonders gefährdet, infolge einer intramammären Infektion mit *E. coli* schwerwiegend zu erkranken. Nicht selten nimmt die Erkrankung einen derart gravierenden Verlauf, dass sie mit nachhaltigen Schäden am milchbildenden Parenchym, aber auch mit dem Tod des Tieres enden kann. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist die *E. coli*-Mastitis durch Prophylaxe- und Therapiemaßnahmen nur unbefriedigend zu beeinflussen.

Prägend für die Entwicklung des klinischen Bildes sind Faktoren und Reaktionen im Wirtsorganismus selbst: Durch die Interaktion bakterieller Erregermuster, wie dem Lipopolysaccharid (LPS), mit wirtseigenen Pathogenerkennungsrezeptoren wird eine Signalkaskade initiiert, die zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine führt. Während der hierbei ausgelösten Entzündung bedarf es einer ausgewogenen Balance zwischen Erregerbekämpfung und wirtsschützenden Gegenregulationen. Versagen diese immunregulatorischen Mechanismen, kommt es zu einer überschießenden Entzündungsreaktion, die sich im typischen Bild einer schwerwiegenden akuten Mastitis manifestiert und zu einem septisch-toxischen Schocksyndrom mit Multiorganversagen führen kann. Während der Vermehrung und Abtötung von *E. coli* im Euter wird LPS in großen Mengen freigesetzt. Umso wichtiger ist es für den Verlauf der Infektion und der daraus resultierenden Mastitis, dass *E. coli* frühzeitig vom Wirtsorganismus erkannt wird und ein rasch einsetzender Phagozyteneinstrom in das infizierte Gewebe die Erregerlast begrenzt. Dieser Mechanismus ist bei der Kuh im peripartalen Zeitraum durch Immunsuppression jedoch eingeschränkt.

Wird ein Organismus wiederholt einem Pathogen oder einem seiner Bestandteile ausgesetzt, kann er in eine Art refraktären Immunstatus überführt werden. Die induzierte Entzündungsreaktion ist dann abgeschwächt. Antibakterielle Eigenschaften des Abwehrsystems bleiben hierbei jedoch erhalten oder werden darüber hinaus noch gesteigert. Dieses aus der Sepsisforschung lange bekannte Phänomen der Endotoxintoleranz könnte die konzeptionellen Anforderungen an neue Pro-

phylaxemaßnahmen im Euter erfüllen, eine überschießende Immunantwort bei gleichzeitiger Erhaltung eines antibakteriellen Milieus zu limitieren. Dies wurde experimentell bereits in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe getestet: Eine LPS-vermittelte Toleranz konnte erfolgreich intramammär induziert werden und schützte Kühe in der Mitte der ersten Laktation vor der Etablierung einer experimentellen Infektion mit *E. coli*. Hierauf aufbauend sollte in dieser Arbeit die Hypothese geprüft werden, ob die Endotoxintoleranz auch im Euter puerperaler Kühe induzierbar ist und den Verlauf einer experimentellen *E. coli*-Mastitis positiv beeinflussen kann.

Da eine intramammäre Infektion in der Regel durch das Eindringen von Mastitis-erregern über den Strichkanal erfolgt, wird der Zitze eine wichtige Rolle bei der Erregererkennung und -abwehr zugesprochen. Zahlreiche Studien zur Zitze mittels Histologie, Transkriptomanalysen und in Tierexperimenten haben deren maßgebliche Beteiligung an immunologischen Prozessen nachweisen können. Daraus ergab sich eine zweite zentrale Fragestellung der vorliegenden Dissertation: Ist eine auf die Zitze begrenzte Wirt-Pathogen-Interaktion ausreichend, um eine Entzündungsreaktion des gesamten Euterviertels im Sinne einer LPS-vermittelten Toleranz zu modulieren? Dies sollte anhand einer kurzfristigen LPS-Exposition des Zitzenlumens und einer anschließend experimentell induzierten intramammären *E. coli*-Infektion geprüft werden.

Die vorliegende Dissertation ist Teil eines Forschungskonzepts zur Aufklärung initialer Mechanismen bei der Mastitis des Rindes. In assoziierten Studien wird die frühe Wirt-Pathogen-Interaktion im Tiermodell und *in vitro* im Explantmodell auf Transkriptomebene untersucht. Das übergeordnete Ziel der Forschergruppe ist es, Wege zu finden, die besonders gefährdete puerperale Kuh vor den Folgen einer schwerwiegenden *E. coli*-Mastitis zu schützen.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Die *E. coli*-Mastitis des Rindes

Milchleistungsrückgang, verminderte Milchqualität mit hoher Zellzahl, Therapie- und Medikamentenkosten und damit zusammenhängend verlängerte Wartezeiten auf Milch sowie krankheitsbedingte verfrühte Kuhabgänge – all diese Faktoren sind Folgen von Euterentzündungen bei Milchkühen. Die damit einhergehenden wirtschaftlichen Einbußen für die Landwirte sind beträchtlich (HOGEVEEN & ØSTERÅS, 2005). HUIJPS *et al.* (2008) berechneten die aufgrund von Mastitiden durchschnittlich anfallenden Kosten für niederländische Milchviehbetriebe und kamen auf ein Ergebnis von 65 - 182 Euro pro Kuh pro Jahr. In den USA belaufen sich die Verluste jährlich auf etwa 2 Milliarden US-Dollar insgesamt (DEGRAVES & FETROW, 1993). Gerade subklinische Mastitiden, verursacht beispielsweise durch *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus agalactiae*, spielen dabei eine wichtige Rolle. Sie machen etwa 71 % der durch Euterentzündungen hervorgerufenen wirtschaftlichen Verluste aus (HUIJPS *et al.*, 2008).

In den vergangenen Jahren konnte jedoch die Inzidenzrate für subklinische Mastitiden durch erfolgreiches Management und verbesserte Milchhygiene deutlich gesenkt werden (BRADLEY, 2002). Doch gerade in den gut geführten Betrieben mit niedrigem Tankmilchzellgehalt ist nun die Zahl der akuten, klinisch manifesten Euterentzündungen angestiegen (RADOSTITS *et al.*, 2007). Bei einem Großteil (58,9 %) der akuten Fälle werden koliforme Erreger nachgewiesen (HOBLET *et al.*, 1991).

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein gram-negatives, heterotrophes, nicht säurefestes und nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium. Es gehört der Familie der *Enterobacteriaceae* an und zählt zu den fakultativen Anaerobiern. Energie kann der Keim sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung gewinnen. Anhand der Oberflächenstrukturen wird *E. coli* serologisch in unterschiedliche Serotypen eingeteilt. Folgende Serotypen werden unterschieden: der O-Antigentyp (O-Antigene – Polysaccharid-Seitenketten der Lipopolysaccharide in

der äußeren Bakterienmembran), F (Fimbrien)-Antigentyp, H-Antigentyp (H-Antigene – flagellare Proteine, nur bei begeißelten Stämmen) und der K (Kapselpolysaccharide)-Antigentyp (ROLLE & MAYR, 2007).

Als Kommensale ist das natürliche Habitat des Bakteriums der Darm warmblütiger Tiere und des Menschen. Über den Kot ausgeschieden, wird es in der Umwelt weit verbreitet (ROLLE & MAYR, 2007). Beim Rind ist *E. coli* auf allen Körperoberflächen und in seiner Umgebung nachweisbar: im Wasser, in der Einstreu, an Wänden, Böden und Geräten (HOGAN & SMITH, 2003).

In der Tiermedizin ist dieser opportunistisch pathogene Keim als Erreger bedeutender Erkrankungen des Rindes bekannt, wie beispielsweise der neonatalen Kälberdiarrhöe, der Koliseptikämie des Kalbes (ROLLE & MAYR, 2007) und von Infektionen des Respirations-, sowie Urogenitaltraktes (HOGAN & SMITH, 2003). Durch seine Fähigkeit auch anaerob Stoffwechsel zu betreiben und Laktose zu fermentieren, kann *E. coli* auch in der Milchdrüse überleben und sich in der Milch hervorragend vermehren (HOGAN & SMITH, 2003). Aus den Zellwänden der sich vermehrenden und durch das Immunsystem abgetöteten Bakterien werden Lipopolysaccharid- (LPS-) Komplexe freigesetzt. LPS gilt als das Schlüsselmolekül in der Pathogenese der durch *E. coli* verursachten Euterentzündungen (CARROLL *et al.*, 1969) und als Initiator der Immunantwort (BURVENICH *et al.*, 2003).

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Man geht davon aus, dass die mammäre Infektion mit *E. coli* über den Strichkanal erfolgt. Eine hämatogene und lymphogene Streuung in die Milchdrüse wird zwar diskutiert, ist vermutlich aber zu vernachlässigen (HOGAN & SMITH, 2003). Gerade in der Zeit nach dem Melkakt, wenn der Schließmuskel der Zitze (*Musculus sphincter papillaris*) sich noch nicht wieder kontrahiert hat, können die Keime leichter diese erste mechanische Barriere überwinden und über die milchableitenden Gänge bis in die Milch produzierenden Alveolen aufsteigen (BRADLEY, 2002).

In vitro besitzt *E. coli* die Fähigkeiten, an Euterepithelzellen zu adhären, internalisiert zu werden und dort zu überleben, wie DÖPFER *et al.* (2001) zeigen konnten. Für die Etablierung einer intramammären Infektion sind diese

Eigenschaften oder besondere Virulenzfaktoren jedoch nicht erforderlich (OPDEBEECK *et al.*, 1988). In der Milchdrüse ist *E. coli* vor allem ein extrazellulär wirkendes Pathogen (BURVENICH *et al.*, 2003), dessen Fähigkeit Laktose zu verwerten die Vermehrung und die Ausbildung einer intramammären Infektion möglich macht. Milch stellt ein ideales Wachstumsmedium für *E. coli* dar. Nach experimenteller intramammärer Infektion mit 500 CFU (Colony Forming Units) *E. coli* beobachteten HILL *et al.* (1979) nach 10 h eine Multiplikation des Keims auf 10^6 bis 10^7 CFU. Während der rapiden Vermehrung, aber auch durch Zelltod und durch die einsetzende Immunabwehr wird aus der Zellwand LPS freigesetzt (RIETSCHEL *et al.*, 1994). LPS zählt zu den Endotoxinen und ist der wichtigste Faktor in der Pathogenese und Initiator der Immunantwort während einer *E. coli*-Mastitis (BURVENICH *et al.*, 2003).

1.2.1 Die Reaktion des angeborenen Immunsystems bei intramammärer *E. coli*-Infektion

Während einer intramammären Infektion mit *E. coli* sind Art und Stärke der Immunantwort entscheidende Kardinalfaktoren, von denen das klinische Bild der Erkrankung abhängt (BURVENICH *et al.*, 2003).

Die Milchdrüse ist neben der mechanisch-physikalischen Barriere des Strichkanals vor allem durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems geschützt (OVIEDO-BOYSSO *et al.*, 2007). Zellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten) aber auch Milchdrüsenepithelzellen (MEC, mammary epithelial cells) erkennen eingedrungene Pathogene anhand ihrer hochkonservierten molekularen Muster (IBEAGHA-AWEMU *et al.*, 2008). Zu den sogenannten PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns) zählen beispielsweise Lipopolysaccharide aus der bakteriellen Zellwand, unmethylierte Oligonukleotide mit einem zentralen Cytosin-Guanin-Motiv (CpG) und Lipoteichonsäure (LTA). Sie werden über präformierte, zellständige oder lösliche Rezeptoren, den PRRs (Pattern Recognition Receptors) gebunden (PALM & MEDZHITOV, 2009). Auf diese Weise kann das angeborene Immunsystem trotz limitierten Rezeptor-Repertoires auf ein breites Erregerspektrum reagieren (BANNERMAN *et al.*, 2003).

1.2.2 Lipopolysaccharid

Das Molekül LPS besteht aus 3 Teilen: dem Lipid A, das in der bakteriellen Zell-

wand verankert ist, einer Oligosaccharid-Kernregion und der Polysaccharid-Seitenkette, dem O-Antigen (CAROFF *et al.*, 2002). Lipid A ist der entscheidende Rezeptor-aktive Ligand des LPS; erst wenn Lipid A aus der Zellwand herausgelöst wird, kann LPS toxisch wirken (VAN AMERSFOORT *et al.*, 2003).

LPS stimuliert Wirtszellen, indem es mit verschiedenen löslichen und membranständigen Proteinen interagiert. Von LBP (LPS Binding Protein) transportiert, wird es an einen Rezeptor der Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) gebunden. Sowohl lösliches als auch membranständiges CD14 (Cluster of Differentiation) und MD-2 erleichtern und verstärken dabei die Bindung des LPS an TLR4 (LU Y. C. *et al.*, 2008b). Diese Bindung ist der initiale Reiz für den Ablauf einer Reaktionskaskade, die in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B (Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells), AP-1 (Activator-Protein-1) und IRF3 (Interferon Regulatory factor-3) mündet. Diese drei Moleküle vermitteln die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) sowie von Adhäsionsmolekülen und Cyclooxygenase-2 (COX-2). Die Zytokine werden in das Gewebe und in den Kreislauf abgegeben und locken weitere Immunzellen an. Dies ist der Beginn der Entzündungsreaktion.

1.2.3 Zelluläre Abwehr des unspezifischen Immunsystems: Makrophagen und neutrophile Granulozyten

Das Differentialzellbild der Milch einer gesunden Milchdrüse setzt sich zusammen aus neutrophilen Granulozyten (PMN, Polymorphonuclear Leukocytes), Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen und variiert in Abhängigkeit vom Laktationsstadium stark (MEHRZAD *et al.*, 2010). Während die B- und T-Lymphozyten der spezifischen Abwehr schnell und effektiv auf bereits bekannte Antigene reagieren können, erkennen die Zellen der unspezifischen Abwehr (Makrophagen, PMN) und MEC auch PAMPs der bis dahin „unbekannten“ Pathogene. Sobald Makrophagen einen Erreger oder einen seiner Bestandteile detektiert haben, werden sie aktiviert und beginnen mit der Phagozytose und der Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8), GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor) und TNF- α . Durch deren Sekretion werden weitere, im Blut zirkulierende Effektorzellen, PMN, rekrutiert und an den Ort der Entzündung gelockt. Auch auf das Knochenmark wirken die Zytokine ein, wo sie unreife PMN mobilisieren. Entlang

eines Konzentrationsgradienten chemoattraktiver Faktoren gelangen PMN schließlich in infizierte Bereiche der Milchdrüse (PAAPE *et al.*, 2003). Während einer Mastitis machen PMN über 90 % der Leukozyten in der Milch aus (PAAPE *et al.*, 2002).

Nach BURTON und ERSKINE (2003) durchlaufen PMN im Rahmen einer immunologischen Abwehrreaktion fünf Schlüsselfunktionen: Margination, Migration, Phagozytose, Respiratory burst und Degranulation. Werden in einem Entzündungsgebiet vermehrt Adhäsionsmoleküle (L-, E-, P-Selektine) auf den Endothelzellen exprimiert und ist im angrenzenden Gewebe auch die Konzentration von Mediatoren wie PAF (Platelet Activating Factor), verschiedenen Arachidonsäuremetaboliten, proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, Interferon (IFN)- γ oder Komplementfaktoren erhöht, verlangsamen PMN ihre Geschwindigkeit durch Interaktion mit den aktivierten Gefäßendothelzellen und gehen dann in eine „rollende“ Bewegung über (Margination). Sich an den Konzentrationsgradienten der Zytokine und Chemokine orientierend passieren die PMN die Basalmembran der Gefäßwand und wandern in die entzündete Milchdrüse ein (Migration). Die Dynamik der PMN-Rekrutierung stellt bei der *E. coli*-Mastitis den entscheidenden Faktor für den Verlauf der Entzündung dar. Eine um eine Stunde verzögerte Immigration der PMN kann eine 8fache Erhöhung der Zahl der zu eliminierenden Bakterien bedeuten (BURVENICH *et al.*, 2003).

Makrophagen und PMN exprimieren PRRs, die PAMPs von Mastitis-Pathogenen binden. LPS gramnegativer Bakterien interagiert mit TLR und CD-14 sowie CD-18. Dies ist der Reiz für PMN, ihre Pseudopodien auszubilden und Mikroorganismen damit zu umgeben. Anschließend werden diese im Phagosom internalisiert (BURTON & ERSKINE, 2003). Die daraufhin folgende Bakterienlyse geschieht in einer sauerstoffabhängigen Reaktion (Respiratory burst): Die PMN setzen große Mengen Superoxid und Hydrogenperoxid frei, die mit der Membran des Phagosoms interagieren und Hydroxylradikale und Sauerstoffradikale bilden (PAAPE *et al.*, 2003). Diese Substanzen schädigen Proteine, RNA und DNA der Bakterien. Aber auch in sauerstoffarmem Milieu ist es den Granulozyten möglich, Mikroorganismen zu töten. In ihren Granula enthaltene Proteine wie Laktoferrin, Bactenektin, Lysozym, Peroxidase, Defensine und andere hydrolytisch aktive Enzyme und Peptide wirken allesamt bakterizid (SORDILLO *et al.*, 1997).

Diese für die Keimabwehr unabdingbaren Substanzen werden auch sezerniert, um

extrazellulär auf die Pathogene zu wirken. Jedoch schädigen sie so auch die sekretorisch aktiven Parenchymzellen der Milchdrüse. Um diesen Schaden möglichst gering zu halten, sind PMN durch baldiges Einsetzen von Apoptose, dem programmierten Zelltod, nur kurzlebig und werden von Makrophagen zusammen mit anderem Zelldetritus beseitigt (SLADEK & RYSANEK, 2001).

Generell ist die Phagozytosekapazität der in der Milchdrüse ansässigen Makrophagen und PMN deutlich geringer als die derjenigen, die im Blut zirkulieren (PAAPE *et al.*, 1975). Ein Grund dafür ist die Ingestion von Zelldebris, Fett, Kasein und anderen Milchkomponenten, die einen Verlust der zytoplasmatischen Granula und der Fähigkeit Pseudopodien auszubilden nach sich zieht (SORDILLO *et al.*, 1987; RAINARD & RIOLLET, 2006). SMITS *et al.* (1999) zeigten zudem, dass allein die Diapedesis durch das Milchdrüsenepithel die mikrobizide Aktivität der Granulozyten nachteilig beeinflusst.

1.3 Klinische Symptomatik

Das klinische Bild der *E. coli*-Mastitis ist geprägt von einer akuten bis perakuten, serofibrinösen lokalen Entzündung meist begleitet von stark gestörtem Allgemeinbefinden. Das Euter ist hochgradig geschwollen, schmerzhaft und vermehrt warm. Das Milchsekret zeigt typische Veränderungen: Es ist wässrig, wässrig-blutig, eitrig oder sogar jauchig mit Beimengungen von Fibrin. Teilweise werden die Gefäße durch Fibrinthrombi verschlossen; mögliche Folgen davon sind Nekrosen mit anschließender Sequesterbildung einzelner Parenchymbezirke (THOMSON *et al.*, 2001; DAHME & WEISS, 2007).

Die durch LPS aktivierte Expression proinflammatorischer Zytokine hat neben den lokalen Effekten auch systemische Auswirkungen: In der Leber wird die Synthese von Akute-Phase-Proteinen aktiviert, die unter anderem verantwortlich sind für Fieber, Anorexie, Depression, gesteigerte Blutgerinnung, Tachypnoe sowie Tachykardie, Pansenparese und Durchfall. Im schlimmsten Fall gerät der Wirtorganismus in den Zustand des Toxin-induzierten Schocks und stirbt aufgrund eines Multiorganversagens (VAN AMERSFOORT *et al.*, 2003).

Eine *E. coli*-Mastitis muss aber nicht immer mit solch schwerwiegenden Symptomen einhergehen. Vor allem bei Kühen in der Mitte der Laktation wird überwiegend ein moderater oder milder Verlauf der Erkrankung beobachtet. Hierbei wird

der Erreger innerhalb kürzester Zeit eliminiert. Eine Ausheilung erfolgt meist unabhängig von einer Behandlung der Tiere (BURVENICH *et al.*, 2003).

1.4 Besonderheiten der *E. coli*-Mastitis im geburtsnahen Zeitraum

Die Transitperiode, der Übergang vom hochtragenden und trockenstehenden zum nicht tragenden und laktierenden Zustand, stellt für die Milchkuh eine Zeit schweren körperlichen Stresses dar. Sie ist gekennzeichnet durch eine Reihe von lokalen und systemischen Veränderungen: Der Körper erfährt starke hormonelle Schwankungen; die Milchdrüse muss für die Laktation umgebaut werden; Kolostrogenese und Laktogenese verbrauchen enorm viel Energie. Der Uterus wird zunächst für die Geburt und anschließend erneut auf eine bevorstehende Trächtigkeit vorbereitet. In eben diesem Zeitraum, etwa 3 Wochen vor bis 3 Wochen nach der Kalbung, ist die Inzidenz infektiöser Erkrankungen beim hochleistenden Milchrind besonders hoch (MALLARD *et al.*, 1998). Mastitiden werden hierbei vor allem in den ersten zwei Wochen der Laktation klinisch apparent (GOFF & HORST, 1997; BURVENICH *et al.*, 2007).

Von großem Interesse für die Wissenschaft ist hierbei die Frage, warum die peripartale Kuh einem erhöhten Risiko ausgesetzt ist, ernstlich zu erkranken. Der Grund ist in einem supprimierten Immunsystem und, im Besonderen, in einer gestörten Funktionalität der zellulären Immunabwehr zu suchen (BURVENICH *et al.*, 2003; MEHRZAD *et al.*, 2010). PMN als Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems müssen schnell an den Ort der Entzündung gelangen und das Pathogen eliminieren. Ist die Migration verzögert und oder die Effizienz ihrer antimikrobiellen Leistung nicht ausreichend, hat das fatale Folgen: Der Organismus muss mit einer fortwährend wachsenden Keimzahl und damit zusammenhängend mit einer steigenden Konzentration bakterieller Toxine kämpfen. Im Falle einer intramammären Infektion mit *E. coli* manifestiert sich diese sehr oft als toxische Mastitis mit schweren lokalen Entzündungssymptomen und Sepsis (HOGAN *et al.*, 1989). Etwa 25 % dieser Tiere sterben oder müssen getötet werden (BURVENICH *et al.*, 2007).

Die Funktionalität und die Anzahl rekrutierter PMN sind stark von den peripartalen systemischen Veränderungen des Hormon- und Energiehaushaltes abhängig. Die PMN zeigen eine veränderte Expression zahlreicher Gene der normalen Zell-

funktionen, wie Zellwachstum und -stoffwechsel, aber auch immunsystemassoziierte Gene der Immunantwort (BURTON *et al.*, 2001).

1.4.1 Hormonelle Einflüsse

Die hormonelle Situation der Kuh unterliegt im peripartalen Zeitraum enormen Schwankungen. Die Progesteronkonzentration im Plasma fällt kurz vor der Geburt rapide ab, diejenige der Glucocorticoide dagegen steigt auf bis zu fünffach erhöhte Werte am Tag der Geburt an (BURTON *et al.*, 2005). Auch der Gehalt an 17- β -Östradiol nimmt in der letzten Woche *ante partum* (*a. p.*) deutlich zu, fällt aber kurz nach der Geburt auf das Ausgangsniveau zurück (LAMOTE *et al.*, 2004).

PMN reagieren auf peripartale Schwankungen im Hormonhaushalt mit einer Modulation der Expression verschiedener Gene, die in Zellfunktionen involviert sind (MADSEN *et al.*, 2002).

Ein hoher Cortisolspiegel geht einher mit einem erhöhten Mastitisrisiko im peripartalen Zeitraum (BURTON & ERSKINE, 2003). Cortisol ist ein endogenes Glucocorticoid, das vom Fetus sezerniert wird und im Muttertier die Östrogenproduktion und die Freisetzung von PGF_{2 α} (Prostaglandin F_{2 α}) zur Geburtseinleitung induziert (JAINUDEEN & HAFEZ, 2000). Bei Kühen mit normalem Geburtsverlauf konnten NIKOLIĆ *et al.* (2003) einen Konzentrationshöhepunkt zum Zeitpunkt der Geburt und ein anschließend rasches Absinken auf niedrige Werte beobachten. Tiere, die im Puerperium an einer Mastitis erkrankten, zeigten einen verlängerten Cortisolanstieg, oder die Konzentration kulminierte ein wiederholtes Mal.

Zum einen kommt es durch Cortisol zu einer reduzierten Expression von Adhäsionsmolekülen (L-Selektin) auf der Zelloberfläche der PMN (ZERBE *et al.*, 2000; BURTON *et al.*, 2005). Im Blutbild macht sich dies in einer Neutrophilie ohne Linksverschiebung bemerkbar (BURTON *et al.*, 1995). Durch den aufgehobenen direkten Kontakt mit dem Endothel ist die Margination gestört und die Diapedese in das umliegende Gewebe deutlich verzögert (HUSZENICZA *et al.*, 2004). Im Falle eines entzündlichen Geschehens kommt es dadurch zu einer verspätet einsetzenden Immunabwehr. Zusätzlich fördern Glucocorticoide etwas zeitversetzt (> 24 h) die Mobilisierung junger PMN aus dem Knochenmark und führen so zu einer Neutrophilie mit Linksverschiebung (BURTON *et al.*, 2005). Erst vollstän-

dig ausgereifte Granulozyten verfügen über die volle funktionelle Kapazität, bei jungen dagegen sind Chemotaxis- und Phagozytoseleistung (BURVENICH *et al.*, 2003) sowie die Aktivität der Endotoxin-Detoxifikation durch AOA_H (Acyloxyacyl hydrolase) limitiert (DOSOGNE *et al.*, 1998).

Nach BURTON *et al.* (2003) verändern sich Phänotyp und Funktion der PMN unter dem Einfluss von Cortisol. Die Zellen werden aufgrund von gehemmter Expression proapoptotischer Gene langlebiger und exprimieren vermehrt Gene für Proteine, die eine Schlüsselrolle im Abbau extrazellulärer Matrix innehaben. Die PMN werden überwiegend in den Uterus rekrutiert und übernehmen dort notwendige Umbauvorgänge. Die Pathogenabwehr gerät in den Hintergrund (BURTON *et al.*, 2005)

Nach SCHEIBL und ZERBE (2000) hat Progesteron während der Trächtigkeit sowohl einen negativen als auch einen positiven Effekt auf das Immunsystem: Die Blastogenese und diverse Funktionen der Lymphozyten, wie z. B. antikörpervermittelte Zytotoxizität, werden supprimiert, wohingegen beispielsweise die Migration und ROS (Reactive Oxygen Species)-Bildung der PMN gesteigert wird. Frucht und Eihäute sind somit vor einer Reaktion des spezifischen maternalen Immunsystems geschützt, und trotzdem bleibt die Funktionsfähigkeit der maternalen Immunabwehr gegen Pathogene aufrechterhalten. Progesteron zeigt einen nachteiligen Effekt auf die Lebensfähigkeit und Funktionalität von PMN. *Post partum (p. p.)* ist die Rolle dieses Hormons in der Modulation des Immunsystems wohl eher gering, da die Plasmakonzentration nach der Kalbung schnell wieder zu seinem Basalniveau zurückkehrt (GOFF & HORST, 1997).

Wie schon über Progesteron kann man in der Literatur sehr unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Angaben zum Einfluss der Östrogene auf die Funktionalität der Leukozyten finden. Östrogene vermitteln ihre Effekte über intrazelluläre Rezeptoren, die auch in PMN exprimiert werden (LAMOTE *et al.*, 2006). LAMOTE *et al.* (2004) beschrieben einen suppressiven Einfluss von 17- β -Östradiol auf die Viabilität und Chemotaxis der PMN. Die ungerichtete Migration ist gesteigert (SAAD & ASTROM, 1988). Ob das Hormon auch die Leukozytenzahl beeinflusst, ist nicht geklärt. Während SAAD und ASTRÖM (1988) feststellten, dass sich die PMN-Zahl zusammen mit steigenden Östrogenkonzentrationen *a. p.* erhöht, konnten ROTH *et al.* (1982) keine Veränderung und ZERBE *et al.* (1998) eine Verminderung der PMN-Zahl im Blut *p. p.* beobachten. Bezüglich der Pha-

gozytoseleistung stehen sich die Ergebnisse der Forschungsgruppen in ähnlicher Weise gegenüber: auch hier konnten ROTH *et al.* (1982) keinen Einfluss von Östrogenen nachweisen, nach SAAD und ASTRÖM (1988) dagegen steigerte Östrogen die Phagozytosekapazität, GOFF und HORST (1997) wiederum dokumentierten sogar eine negative Östrogeneinwirkung.

Bisher besteht nur Einigkeit darüber, dass Östrogene einen modulatorischen Einfluss auf das Immunsystem und vor allem auf die PMN haben.

1.4.2 Metabolische Einflüsse

Die veränderte Stoffwechsellage *p. p.* spielt eine große Rolle hinsichtlich der Immunabwehr. Mit Beginn und steilem Anstieg der Milchleistung werden große Mengen an Energie benötigt, die meist durch die Futteraufnahme nicht abgedeckt werden können. Die Pansenflora ist nicht auf leicht verdauliches, energiereiches Futter eingestellt, da in der Trockenstehperiode rohfaserreiches Futter die Grundlage war (GOFF & HORST, 1997). Das postpartale hochleistende Milchrind befindet sich somit in einer katabolen Stoffwechsellage. Körpereigene Fettreserven werden mobilisiert, und es entstehen kurzkettige Fettsäuren und Ketonkörper. Die negative Energiebilanz, die erhöhte Konzentration von Ketonkörpern und NEFA (Non-esterified Fatty Acids) konnten mit der peripartalen gestörten Funktion von Immunzellen in Zusammenhang gebracht werden (ZERBE *et al.*, 2000; HUSZENICZA *et al.*, 2004).

Im Puerperium werden zahlreiche PMN für die Umbauvorgänge im Uterus gebraucht. Der erhöhte Umsatz und die damit gesteigerte Granulopoese im Knochenmark erfordern viel Energie. Negative Energiebilanz und Ketose korrelieren mit postpartaler Neutropenie (SURIYASATHAPORN *et al.*, 2000). Weiterhin benötigt jede Immunzelle Energie für die Produktion ihrer antimikrobiellen Substanzen. Hierbei stehen vor allem reaktive Sauerstoffspezies, Zytokine und Opsonine im Vordergrund. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch PMN parallel zu steigenden Konzentrationen an β -Hydroxybutyrat reduziert ist (HOEBEN *et al.*, 1997). Ketonkörper wirken sich darüber hinaus negativ auf die Fähigkeit von PMN zur Chemotaxis, Phagozytose und Lysis der Pathogene aus (SURIYASATHAPORN *et al.*, 1999; ZERBE *et al.*, 2000).

Die Veränderungen in Stoffwechsel und Hormonhaushalt sind somit vermeintlich die Hauptgründe für die Dysfunktion der PMN im geburtsnahen Zeitraum. Diese

Zusammenhänge sind in Abbildung 1 schematisch zusammengefasst:

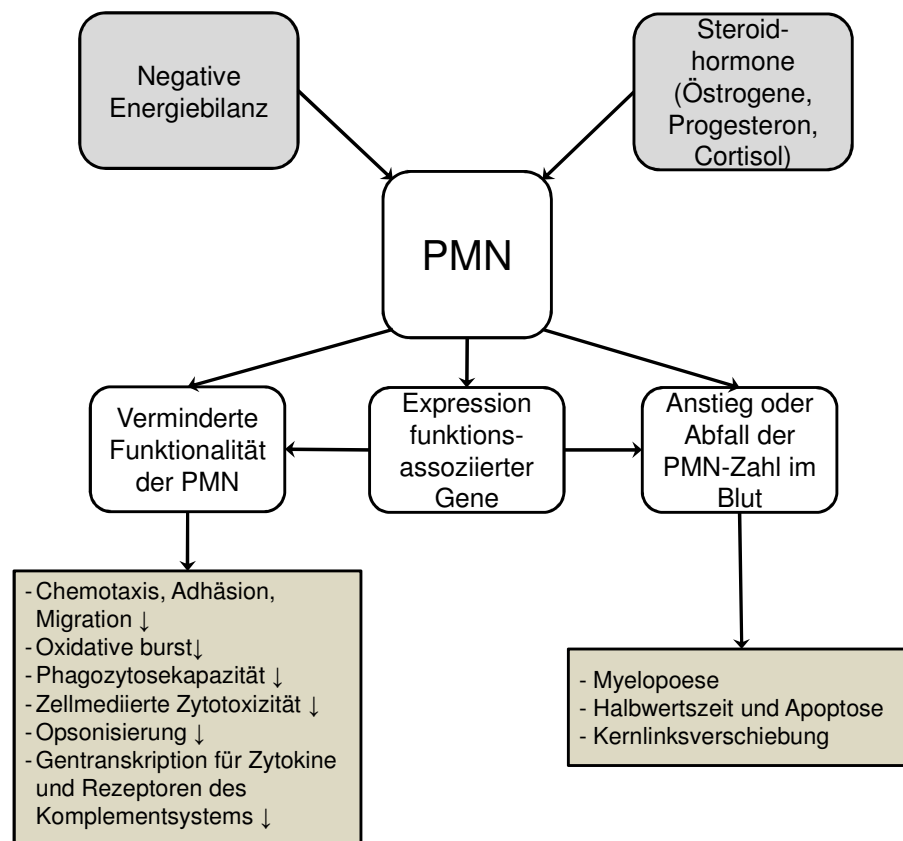


Abbildung 1: Einfluss peripartaler Faktoren auf PMN

Dargestellt sind verschiedene Faktoren, die auf neutrophile Granulozyten (PMN) im peripartalen Zeitraum einwirken.

Nach unten gerichtete Pfeile bedeuten eine Reduktion der jeweiligen PMN-Funktion.

2 Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes

Die durch LPS ausgelöste TLR4-Signalkaskade während einer intramammären *E. coli*-Infektion ist ein komplexer pathophysiologischer Vorgang. Die Folge ist eine Entzündung mit Neutralisation und Elimination der Pathogene und Reparatur geschädigten Gewebes. Normalerweise ist dies eine streng regulierte Reaktion. Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen Stimulation und Suppression der Gentranskription und der Synthese proinflammatorischer Zytokine (FOSTER & MEDZHITOV, 2009). Nehmen die entzündungsfördernden Mediatoren überhand, kann es zu einer Überreaktion des Immunsystems kommen, die sich klinisch als systemischer Schock manifestiert (BISWAS & LOPEZ-COLLAZO, 2009).

2.1 Historischer Hintergrund

Seit Ende der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts ist ein Phänomen bekannt, das man Endotoxintoleranz nennt (BEESON, 1947): Das Immunsystem, das wiederholt mikrobiellen Pathogenen oder ihren PAMPs ausgesetzt wird, verfällt in einen transienten, refraktären Status. Dies gilt zum einen für LPS (Endotoxin) andererseits aber auch für diverse andere PAMPs, wie beispielsweise Muramyl-dipeptid und LTA (FERREIRA *et al.*, 2001; LEHNER *et al.*, 2001a). Auf eine erneute Exposition antwortet der Organismus mit einer reduzierten Reaktionsbereitschaft. BEESON (1947) stellte beispielsweise fest, dass bei Kaninchen, denen täglich kleine Dosen Pyrogene appliziert wurden, nach wenigen Tagen die Fieberreaktion deutlich geringer ausfiel oder ganz ausblieb.

Im Laufe der Jahre folgten eine ganze Reihe weiterer Studien an Menschen und Tieren, in denen die Endotoxintoleranz im Zusammenhang mit Sepsis insbesondere zur Verbesserung der Überlebensrate untersucht wurde (CAVAILLON & ADIB-CONQUY, 2006; WHEELER *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2010).

2.2 Entstehung der Endotoxintoleranz

Bisher konnte die Entstehung der Endotoxintoleranz mit einer veränderten Regulation der TLR4-Signalkaskade in Verbindung gebracht werden (FOSTER & MEDZHITOV, 2009). Wenn eine Entzündung außer Kontrolle zu geraten droht, tritt ein negativer Feedback-Mechanismus in Kraft. Wie diese Reaktion auf molekularer Ebene im Detail abläuft, konnte bis heute noch nicht ausreichend geklärt werden. Bisher ist bekannt, dass es sich dabei nicht um eine allübergreifende Herabregulierung der Genexpression handelt (CROSS, 2002; WEST & HEAGY, 2002). Vielmehr findet eine Adaptation und Reprogrammierung statt: die Transkription von TLR4 (PARKER *et al.*, 2005) und proinflammatorischer Gene, wie z.B. TNF α , IL-6, IL-12, wird gehemmt, wohingegen die Expressionsrate von IRAK-M (IL-1R-associated kinase M), einem negativen Regulator des TLR-Signalweges, sowie die Transkription anti-inflammatorischer (IL-10) und antimikrobieller Faktoren (z. B. AOA) gesteigert wird oder nicht in den refraktären Status überführt wird (DEL FRESNO *et al.*, 2009).

2.3 Positive Effekte der Endotoxintoleranz

Es wurde gezeigt, dass während der frühen Phase der Endotoxintoleranz, die einige Stunden bis wenige Tage andauert, einige Aspekte der Immunreaktion sogar noch verstärkt werden (LU M. *et al.*, 2008a). PMN reagierten sensibler auf LPS, ihre Lebensdauer verlängerte sich (FETEROWSKI *et al.*, 2001), und es wurden mehr PMN in entzündetes Gewebe gelockt (LEHNER *et al.*, 2001a). Humane Monozyten (MNC, Mononuclear Leukocytes) zeigten nach wiederholter Stimulation mit LPS eine erhöhte Expressionsrate des Zelloberflächenrezeptors CD64, die stark mit einer gesteigerten Phagozytoseaktivität korreliert (DEL FRESNO *et al.*, 2009). Gleichzeitig konnte jedoch auch eine verminderte Expression von MHC (Major histocompatibility complex) class II und somit eine reduzierte Antigenpräsentation nachgewiesen werden.

Durch diese Reprogrammierung der Gentranskription während der Endotoxintoleranz bleibt die bakterielle Clearance aufrechterhalten, gleichzeitig ist der Organismus vor der Entwicklung eines septischen Schocks geschützt (BISWAS & LOPEZ-COLLAZO, 2009; DEL FRESNO *et al.*, 2009).

Auch bei der Mastitis des Rindes konnte das Phänomen der Endotoxintoleranz beobachtet werden. In einem Mastitismodell reagierten Kühe, die im Abstand von zwei Wochen wiederholt mit *E. coli* infiziert wurden, mit einer reduzierten Akute-Phase Reaktion und mildereren klinischen Symptomen (SUOJALA *et al.*, 2008). Eine klinisch apparente Mastitis etablierte sich jedoch zu beiden Zeitpunkten. LOHUIS *et al.* (1990b) infundierten 100 µg LPS, gelöst in steriler NaCl-Lösung, in ein Euterviertel. Neunzehn Stunden später wurde das gleiche Viertel mit *E. coli* experimentell infiziert. Die Ausbildung einer klinisch manifesten Mastitis konnte dabei verhindert werden.

PFISTER (2009) zeigte im Rahmen einer Studie, dass bei primiparen Kühen in der Mitte der Laktation die intramammäre Applikation von 1 µg LPS eine Endotoxintoleranz hervorrief und sich schützend gegenüber einer nachfolgenden experimentellen intramammären *E. coli*-Infektion auswirkte. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Endotoxintoleranz als Mastitis-Prophylaxe auch bei multiparen Kühen im peripartalen Zeitraum nützlich sein könnte.

3 Lokalisationsspezifische Wirt-Pathogen-Interaktionen in der bovinen Milchdrüse

Die Milchdrüse des Rindes sieht sich tagtäglich mit eindringenden Keimen konfrontiert und ist dagegen gut gewappnet. Jede Region des Euters, ob Strichkanal, Fürstenberg'sche Rosette, Zitzen- und Drüsenzisterne oder Drüsenparenchym, ist mit verschiedenen Eigenschaften ausgestattet, die in die lokale Immunabwehr integriert sind und mit den Pathogenen interagieren. Diese Eigenschaften und unterschiedlichen Kompetenzen werden im Folgenden erörtert.

3.1 Strichkanal

Die erste Hürde gegenüber eindringenden Pathogenen ist der Strichkanal, der als die vorderste Front der Erregerabwehr gilt (SORDILLO *et al.*, 1997). Er ist mit mechanischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften ausgestattet, die Bakterien daran hindern sollen in die Milchdrüse einzuwandern.

Der Strichkanal oder *Ductus papillaris* wird durch den *Musculus sphincter papillaris*, einem Muskel aus zirkulär verlaufenden, glatten Muskelfasern, aktiv und durch das Zitzenkanalkeratin im Lumen des Kanals passiv verschlossen. Das Keratin ist Produkt des mehrschichtig verhornenden Plattenepithels, dessen Keratinozyten verhornen und in das Lumen des Strichkanals abgeschilfert werden (Keratinisierung und Desquamation). Vermischt mit Fett und Laktose bildet das Keratin das sogenannte Laktosebum. Die Kontraktion des *Musculus sphincter papillaris* presst das Laktosebum zusammen und verdichtet es. Gemeinsam mit der zum *Ostium papillare* gerichteten Keratindesquamation und dem Milchstrom beim Melken ist das Eindringen von Erregern deutlich erschwert (NICKEL *et al.*, 2005).

Dem Zitzenkanalkeratin wird zusätzlich zur mechanischen auch eine bakterio-statische und bakterizide Wirkung seiner Proteine und Lipide zugesprochen (ADAMS & RICKARD, 1963; HIBBITT *et al.*, 1969; HIBBITT & BENIANS, 1971). Bakterien zeigen eine hohe Affinität zum Keratin und werden im Strichkanal durch Sequesterbildung eingeschlossen und anschließend während der Desquamation wieder nach außen befördert (NICKERSON, 1987).

Die zelluläre Immunabwehr spielt im Strichkanal ebenfalls eine Rolle.

NICKERSON und PANKEY (1985) konnten in elektronenmikroskopischen Studien PMN und Lymphozyten nachweisen. Die Transmigration der PMN findet dabei vor allem im proximalen Teil des Strichkanals statt, wo das verhornende Epithel dünner wird und in das zweischichtige Epithel der Fürstenberg'schen Rosette übergeht. Die Lymphozyten besiedeln die basale Schicht des *Stratum granulosum* (NICKERSON & PANKEY, 1983).

3.2 Fürstenberg'sche Rosette

An der Fürstenberg'schen Rosette endet der Strichkanal mit einem abrupten Wechsel vom mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel zu zweischichtiger, isoprismatischer Schleimhaut. Durch Kontraktion des Zitzensphinkters werden die radiär angeordneten Schleimhautfalten der Rosette erhöht (MOSIMANN *et al.*, 1990) und durch den Milchdruck in den Strichkanal gepresst (POUNDEN & GROSSMAN, 1950). Dies ist als eine Unterstützung der mechanischen Barriere des Strichkanals zu sehen. Außerdem finden sich im subepithelialen Bindegewebe und in den basalen Schichten des Epithels leukozytäre Infiltrationen. Dort machen die Leukozyten sogar bis zu 85 % der gesamten subepithelialen Zellpopulation aus (COLLINS *et al.*, 1986). Sie sind meist lose verteilt, finden sich aber auch in Akkumulationen zusammen, die sich histologisch wie germinale Zentren darstellen. Den Großteil der infiltrierenden Zellen bilden Lymphozyten, genauer gesagt Plasmazellen. Daneben treten aber auch, vor allem in infizierten Vierteln, PMN und Monozyten auf (NICKERSON & PANKEY, 1983, 1985; COLLINS *et al.*, 1986). Im Vergleich zur Zitzenzisterne ist während einer Mastitis der Anteil an PMN in der Fürstenberg'schen Rosette deutlich höher. COLLINS *et al.* (1986) sahen hierin einen Zusammenhang zwischen dem häufigen Pathogen-Kontakt und der besonderen Kapazität dieser Region eine Immunantwort zu induzieren.

3.3 Zitzen- und Drüsenzisterne

Auf die Fürstenberg'sche Rosette folgt proximal die Milchzisterne (*Sinus lactiferus*) mit ihrem Zitzenteil (*Pars papillaris sinus lactiferi*) und ab dem Übergang Zitzenbasis zu Drüsenkörper mit ihrem Drüsenteil (*Pars glandularis sinus lactiferi*). Ausgekleidet ist die Zisterne ebenso wie die milchableitenden Gänge (*Ductus lactiferi*) mit zweischichtigem, hochprismatischem Epithel, dessen Zellen

reichlich mit Mikrovilli-artigen Zytoplasmafortsätzen besetzt sind und über *Zonulae occludentes* und Desmosomen einen festen Zellverband bilden. Die Schleimhaut erfüllt damit die strukturellen Voraussetzungen für die Blut-Milch-Barriere, die sie zusammen mit dem subepithelialen Bindegewebe und dem Endothel der mammären Blutgefäße bildet (SCHULZ *et al.*, 1974). Im Bindegewebe liegen diffus verteilt einzelne Lymphozyten und gelegentlich Makrophagen (NICKERSON & PANKEY, 1984; COLLINS *et al.*, 1986). Wie auch schon in der Region der Fürstenberg'schen Rosette sind es vorwiegend Plasmazellen, die die Population mononukleärer Zellen ausmachen.

In einer Reihe von Studien untersuchten PERSSON *et al.* (1992) die Entzündungsreaktion der Zitzenzisterne nach Endotoxinapplikationen. Sie verschlossen chirurgisch die Schleimhaut der Zitzenzisterne trockenstehender Euter auf Höhe der Zitzenbasis und trennten die Zitze somit von der Drüse. Nach Abheilung und Durchgängigkeitskontrolle instillierten sie Endotoxin in die Zitzen und beobachteten die Immunantwort über einen Zeitraum von sieben Stunden. Hierfür spülten sie die Zisterne in regelmäßigen Abständen mit steriler NaCl-Lösung und untersuchten die wiedergewonnene Flüssigkeit mikroskopisch und biochemisch. Bereits nach einer Stunde konnten sie eine Erhöhung der Konzentration bovinen Serumalbumins als Hinweis gestörter epithelialer Integrität und nach zwei Stunden einen signifikant erhöhten Zellgehalt feststellen. PMN nahmen dabei den größten Anteil ein (93,2 %). In einer zweiten Studie wurden PMN mit Indium-111 markiert und ihre Migration in die Zitze untersucht. Vor Endotoxininfusion wurden in den Biopaten keine PMNs nachgewiesen. Innerhalb einer Stunde akkumulierten die markierten Zellen in dieser Region. Transmigration in das Lumen der Zisterne wurde ab der zweiten Stunde *post infusionem* (*p. infus.*) bis zum Ende des Versuchs nach 22 h beobachtet (PERSSON *et al.*, 1992).

3.4 Drüsenparenchym

Die kleinsten geschlossenen funktionellen Einheiten der Milchdrüse bilden die *Lobuli glandulae mammae*. Sie setzen sich zusammen aus rebenartig verzweigten, alveolären Bläschen, die durch dünne Septen voneinander getrennt und von einschichtigem Epithel ausgekleidet sind. In den Septen eingelagert liegen Myoepithelzellen, Bindegewebsfasern und Blutkapillaren. Die Alveolen sind der Ort der Milchbildung und Milchabgabe (NICKEL *et al.*, 2005).

Auch im Bindegewebe des Drüsenparenchyms sind Leukozyten angesiedelt. Im Falle einer intramammären Infektion durchbrechen PMN die interzellulären Brücken des Epithels. Die Zellen des sekretorischen Epithels sterben ab und füllen, losgelöst aus dem Zellverband, zusammen mit den PMN die Lumina der Alveolen (PAAPE *et al.*, 1995).

Die Hauptaufgabe der MEC ist die Milchproduktion, jedoch nehmen sie auch eine Rolle in der Immunabwehr ein, da sie zu den ersten Zellen gehören, die mit dem Pathogen konfrontiert werden. MEC können mikrobielle Substanzen erkennen und eine Entzündungsreaktion einleiten. Sie exprimieren nachweislich TLR, Zytokine, Chemokine und β -Defensine (YANG *et al.*, 2008; GÜNTHER *et al.*, 2009).

3.5 Vergleichende Beobachtungen von Wirt-Pathogen-Interaktionen in unterschiedlichen Kompartimenten der Milchdrüse

Untersuchungen der Genexpressionen eröffnen detaillierte Informationen über die pathogeninduzierten Veränderungen in unterschiedlichen Lokalisationen der bovinen Milchdrüse. Bislang lag das Hauptaugenmerk auf dem Drüsenparenchym und den MEC.

PAREEK *et al.* (2005) beispielsweise inkubierten MEC mit LPS und beobachteten bei einer Reihe von Genen eine gesteigerte Expression. Neun dieser Erbfaktoren konnten sie dem unspezifischen Immunsystem und der Regulation der Apoptose zuweisen. Darunter waren beispielsweise Chemokin-codierende Gene wie CXCL5, dessen Expression um das zehnfache erhöht war, und RANTES, das sogar in 208fach erhöhtem Maße gemessen wurde. Daneben konnte BRUCKMAIER (2005) feststellen, dass Milchdrüsenbiopate bereits 3 h nach einer LPS-Infusion gesteigerte mRNA-Werte des Zytokins TNF- α , des Prostaglandins COX-2 sowie antibakterieller Proteine wie Laktoferrin und Lysozym aufwiesen.

Die Interaktionen der verschiedenen Euterregionen mit den Pathogenen wurden durch eine Studie von RINALDI *et al.* (2010) herausgestellt. Hierbei untersuchten sie transkriptomweit Gewebe der Fürstenberg'schen Rosette, der Zitzen- und Drüsenzisterne sowie des Drüsenparenchyms. Zwölf Stunden nach experimenteller Infektion mit *E. coli* waren in den distalen Regionen vor allem Gene der Pathogenerkennung und der Immunantwort aktiviert, während die lobulo-alveoläre

Region noch keine gesteigerte Genexpression zeigte. Ein Beispiel dafür ist NOS2 (Nitric Oxide Synthetase) und CCL (C-C-Motif Ligand) 20, deren Transkriptionsraten in der Fürstenberg'schen Rosette signifikant erhöht waren. TLR4, als Beispiel für eine Genexpression der Erregererkennung, konnte in allen Regionen in erhöhtem Maße nachgewiesen werden. Besonders früh und deutlich galt dies für das Gebiet der Fürstenbergschen Rosette. Die Mehrheit der Gene, die distal bereits aktiviert waren, wurden 24 h *post infectionem* (*p. infect.*) auch im Drüsengewebe in erhöhtem Maße transkribiert: das Chemokin CCL4, wichtig in der Rekrutierung der Leukozyten, antimikrobielle Peptide, wie Lysozym und S100 calcium binding protein A12, sowie Proteine der Immunantwort, wie der Rezeptor für das Komplementfragment C5a (RINALDI *et al.*, 2010).

Die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt führt folglich in allen Regionen des Euters zu Expressionssteigerungen. Die distalen Regionen der Milchdrüse, Fürstenberg'sche Rosette, Zitzen- und Drüsenzisterne, reagieren jedoch bereits in der frühen Phase einer Infektion, während die Expressionssteigerung immunrelevanter Gene im Drüsenparenchym zeitverzögert einsetzt.

III MATERIAL UND METHODEN

Diese Arbeit ist eine Folgestudie der Arbeiten von PETZL (2005), PFISTER (2009) und MEHNE (2010). Um Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden die gleichen Materialien verwendet und die Versuchsmethoden weitestgehend übernommen.

1 Materialien

1.1 Geräte

Autoklav „D65“	(Systec, Wettenberg)
Automatischer Kolonienzähler “Flash & Go”, mit Software Flash & Go (Version 1.0)	(IUL Instruments S. A., Spanien)
Brutschrank „Incucell“	(MMM Medcenter, Planegg)
Dampfsterilisator „Varioklav®“	(H+P Labortechnik - Thermo Scientific, München)
DeLaval Cell counter DCC	(DeLaval, Schweden)
Eismaschine „ZBE 70-35“	(Ziegra, Isernhagen)
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell Accuri C6 Flow Cytometers, mit Software CFlow®	(Accuri Cytometers Inc., Großbritannien)
Roche/Hitachi 911 Chemistry Analyzer	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Kühlzentrifuge „Rotina 420 R“	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
Kühlzentrifuge „Rotina 50 RS“	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
Laborgasbrenner mit automatischer Zündung „Gasprofi 2 SCS“	(WLD-TEC GmbH, Göttingen)
Laborwaage „PLJ 360-3M“	(Kern & Sohn, Bahlingen)
Melkanlage „RPA 40“	(Westfalia, Oelde)
Photometer “Spectra Classic”	(Tecan, Crailsheim)
Reinstwassersystem „GenPure“	(TKA, Niederelbert)
Schlauchpumpe zum Absaugen von Flüssigkeiten „Rumo100“	(Heidolph, Schwabach)
Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“	(Kojar, Finnland)
Sysmex pocH-100i	(Sysmex, Norderstedt)
Thermometer	(Microlife, Schweiz)
Temp logger hobo® U12	(Onset, USA)
Tiefkühltruhe -80°C „Forma ULT Freezer“	(Thermo Electron, Dreieich)
Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA®, Staufen)

Vierviertel-Melkeinheit (Spezialanfertigung)	(Melk-und Kühltechnik Josef Zirnbauer, Anzing)
Vierwegemelkzeug	(GEA WestfaliaSurge, Bönen)
Zentrifuge „Universal 32R “	(Roth, Karlsruhe)
Zitzenklemme	(Dr. Fritz, Tuttlingen)

1.2 Klinikbedarf

California-Mastitis-Test	(WDT, Garbsen)
EDTA-Blutentnahmesystem „Monovette®“(9 mL)	(Sarstedt, Nümbrecht)
Einmalspritzen „BD Plastipak™“ (Luer, steril, 50 mL)	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Einmalspritzen „BD Discardit™“ II (steril, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL)	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Einmal-Überziehtiefel „Clinhand“	(Samco clinhand, Mainburg)
Einmal-Untersuchungshandschuhe, “Gentle skin® sensitive“	(Meditrade, Kiefersfelden)
Einmal-Untersuchungshandschuhe für rektale Untersuchung „Krutex“	(Kruuse, Dänemark)
Einmal-Zitzenkanüle „Bovivet“	(Kruuse, Dänemark)
Intravaginalspange für Rinder „EAZI-BREED™ CIDR®“	(Pfizer Animal Health, USA)
Kanülen „BD Microlance™ 3“ (steril, 1,2 x 40 mm)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Kanülen „TSK STERIJECT“ (steril, 1,80 x 40 mm)	(TSK-Supra, Japan)
Knopfsonde, 1,5 mm, 14,5 cm,	(Eickemeyer, Tuttlingen)
Pinzette, chirurgisch, 130 mm	(Heiland Vet, Hamburg)
Polystyrol-Röhrchen (steril)	(Sarstedt, Nümbrecht)
Präparierschere Metzenbaum 180 mm gebogen	(Heiland Vet, Hamburg)
Serum-Blutentnahmesystem „Monovette®“(9 mL)	(Sarstedt, Nümbrecht)
Skalpellklingen „Bayha“ (steril, Fig. 21)	(Eickemeyer, Tuttlingen)

1.3 Laborbedarf

Applikatoren (steril)	(Böttger, Bodenmais)
Combitips (1,25 mL, 2,5 mL)	(Eppendorf, Hamburg)
Cryotubes (3,5 mL)	(Roth, Karlsruhe)
Columbia-Agar mit Schafblut plus	(Oxoid, Wesel)
Edwards-Nährböden mit Schafblut (modifiziert)	(Oxoid, Wesel)
Einmalküvetten makro (PMMA, 2,5 mL)	(Brand, Wertheim)
Einmal-Nitrilhandschuhe "Blue Nitril"	(neoLab Migge, Heidelberg)
Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld.	(Merck, Darmstadt)
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 mL)	(Greiner, Frickenhausen)
Glasperlen Kalk-Natron-Glas (4 mm)	(Roth, Karlsruhe)
Hirn-Herz-Boillon, brain-heart-infusion-broth (BHI)	(Oxoid, Wesel)
Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (VRB-Agar)	(Oxoid, Wesel)
Kryo-Boxen aus Karton	(Süd Laborbedarf, Gauting)
Laborglasflaschen mit Gewinde Schott Duran® (500 mL, 2000 mL)	(Schott, Mainz)
Mikrobank-System Cryobank™	(Mast Diagnostika, Reinfeld)
Multipette	(Eppendorf, Hamburg)
Pasteurpipetten aus Glas (22,5 mm)	(Brand, Wertheim)
PC Comorack-24 mit cover	(Micronic B.V., Niederlande)
Pipetten, einstellbar (10-100 µL, 20-200 µL)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar (1-10 µL, 20-200 µL, 100- 1000 µL, 1-5 mL)	(Biohit, Köln)
Pipettenspitzen "Biohit optifit Tip 5000 µL"	(Biohit, Köln)
Pipettenspitzen weiß, gelb und blau	(Brand, Wertheim)
Pipettierhilfe "accu-jet®"	(Brand, Wertheim)
Polystyrolröhrchen	(Nerbe Plus, Winsen/Luhe)
PP- Röhrchen "Cellstar" (50 mL, steril)	(Greiner bio-one, Frickenhausen)
PP Tubes (RNase und DNase frei, 7,5 mL)	(Micronic B.V. , Niederlande)

Röhrchen für die Durchflusszytometrie (5 mL)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Saugpipetten (10 mL)	(Sarstedt, Nürnberg)
Schraubdeckeldosen "Rotilabo [®] "	(Roth, Karlsruhe)
Serologische Pipetten "10 mL Stripette [®] "	(Corning Incorporated, USA)

1.4 Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien

Acridin-Orange	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Bacteriostatic Concentrate Solution	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
Cleaning Solution Concentrate	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
Dalmazin [®] , Cloprostenol-Natriumsalz	(Selectavet, Weyarn)
Decontamination Concentrate Solution	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
Ethanol 70 %	(Roth, Karlsruhe)
Cobactan [®] DC <i>ad us. vet.</i>	(Intervet, Unterschleißheim)
Natriumchlorid (NaCl)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Oxytozin <i>ad us. vet.</i>	(aniMedica, Senden-Börsensell)
Propidiumjodid (PI), minimum 95 % (HPLC)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco, ohne Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	(Biochrom, Berlin)
RNAlater [®]	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Trypton-Soja-Bouillon, Trypticase-Soy Broth (TSB)	(Sigma, Steinheim)
Semiquantitativer, visueller Progesterontest für Serumproben von Färsen und Kühen „Hormonost [®] Rind“	(Biolab, München)

1.5 Puffer und Lösungen

1.5.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Die PBS (Phosphate-buffered Saline)-Trockensubstanz (siehe III.1.4) setzt sich aus den genannten Bestandteilen in den folgenden Konzentrationen zusammen:

NaCl	8,0 g
KCl	1,24 g
Na ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

Die Trockensubstanz wurde in 1000 mL *Aqua tridest.* gelöst. Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

1.5.2 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Nach den Anweisungen des Herstellers wurde das Messkanalsystem des Durchflusszytometers nach den Messungen mit 2 mL der Cleaning Solution und anschließend mit 2 mL sterilfiltriertem *Aqua tridest.* gespült.

Hüllflüssigkeit (Sheath fluid)

Als Hüllflüssigkeit für die durchflusszytometrische Messung wurde sterilfiltriertes *Aqua tridest.* verwendet, dem Bacteriostatic Concentrate Solution (siehe III.1.4) zugesetzt wurde.

Propidiumjodid-Stammlösung

Die Stammlösung von 100 µg/mL Propidiumjodid (PI) gelöst in PBS wurde in aliquoten Teilen bei -20°C gelagert. Zum Anfärben toter Zellen wurden der Zellsuspension entsprechende Teile der Stammlösung zugesetzt, um eine Endkonzentration von 4 µg/mL PI zu erreichen.

Acridin-Orange-Stammlösung

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

1.6 Versuchstiere

Teilprojekt „Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS“

Für dieses Projekt wurden ausschließlich Tiere der Rasse Holstein-Friesian verwendet, die sich in der ersten oder zweiten Laktation befanden. Die 3 Tiere wurden aus bayerischen Zuchtbetrieben zugekauft und waren 2 bis 5 Jahre alt. Vor Ankauf wurden sie im Herkunftsbetrieb im Abstand von 7 d dreimal auf folgende Kriterien untersucht: sie mussten klinisch allgemeingesund und nach Vorbericht noch nie an einer Mastitis erkrankt gewesen sein. Die bakteriologische Untersuchung des Sekrets der vier Euterviertel (siehe III.2.9.1) musste negativ ausfallen und die Milch durfte einen maximalen Zellgehalt von $50 \cdot 10^3/\text{mL}$ Milch nicht überschreiten (siehe III.2.9.2).

Teilprojekt „Intramammäre Induktion der Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh“

Auch für diese Versuchsreihe wurden Tiere der Rasse Holstein-Friesian ausgewählt. Sie waren klinisch allgemeingesund, vorberichtlich eutergesund und zum Zeitpunkt des Ankaufs mit mindestens dem zweiten Kalb tragend. Nur Tiere, die nach einer allgemeinen klinischen und speziellen Untersuchung des Euters sowie nach einer labordiagnostischen Untersuchung des Blutes als allgemein- und eutergesund eingestuft werden konnten, wurden ausgewählt und angekauft.

Alle im Rahmen dieses Versuchs verwendeten Tiere ($n = 9$) erfüllten diese Voraussetzungen. Die Tiere waren 3 bis 7 Jahre alt, mit dem zweiten bis maximal fünften Kalb tragend und bisher noch nie an einer Mastitis erkrankt. Alle Tiere stammten aus bayerischen Zuchtbetrieben.

1.7 Modellkeim *E. coli* 1303

Der verwendete Bakterienstamm *E. coli* 1303 wurde aus dem Eutersekret von einer an einer klinischen Mastitis erkrankten Kuh isoliert. Er gehört zur phylogenetischen Hauptgruppe A (*E. coli*-Sammlung von Referenzstämmen, ECOR-A), ist ein Subtyp des Serotyps O5 und besitzt die LPS Core Region K-12. Diese Region konnte aus Fäkalisolaten kaum nachgewiesen werden, während 12,3 % der Mastitisisolate K-12 enthielten (DUDA *et al.*, 2011). Ein multiplex PCR-basiertes Screening nach bekannten Virulenzfaktoren ergab, dass es sich bei *E. coli* 1303 weder um einen klassischen enterohämorrhagischen, -pathogenen, -toxischen,

-invasiven oder enteroaggregativen noch um einen klassischen extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stamm handelt (JOHNSON & STELL, 2000; MÜLLER *et al.*, 2007). Es konnten nur die Gene identifiziert werden, die Typ 1 Fimbrien, F17 Fimbrien, Antigen 43, das Eisenzitratsiderophorensystem und das EAST1-Toxin kodieren (MITTERHUEMER *et al.*, 2010).

Die Stammhaltung der Bakterien in Glycerinstocks und die biochemische Charakterisierung erfolgte freundlicherweise im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Valentin-Weigand. Der Stamm wurde nach der für *Enterobacteriaceae* zusammengestellten „Bunten Reihe“ charakterisiert (siehe Tabelle 1; BURKHARDT, 1992). Die benötigten Testmedien wurden im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover hergestellt.

Tabelle 1: Biochemisches Reaktionsspektrum des verwendeten Stammes *E. coli* 1303

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

+ = positiver Nachweis; - = kein Nachweis

Zur weiteren Charakterisierung des Modellkeims *E. coli* 1303 wurde ein Antibio-gramm mittels Agargel-Diffusion in der Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der fachlichen Anleitung von Frau Dr. Schröder erstellt (siehe Tabelle 2).

Die Bakterienstämme wurden in 20er Aliquoten mit Hilfe des Systems „Cryobank™“ (siehe III.1.3) bei -80°C gelagert. Bei Bedarf musste der Erreger

somit nicht mehr subkultiviert werden. Es konnte auf ein tiefgefrorenes Aliquot zurückgegriffen und jeweils unter vergleichbaren Bedingungen neu angezüchtet werden.

Tabelle 2: Antibiotika Resistenzprofil des verwendeten Stammes *E. coli* 1303

Antibiotika	<i>E. coli</i>
Amoxicillin/Clavulansäure	sensibel
Ampicillin	sensibel
Apramycin	sensibel
Cefquinom	sensibel
Cephalothin	resistent
Colistin	sensibel
Enrofloxazin	sensibel
Erythromycin	resistent
Gentamicin	sensibel
Neomycin	sensibel
Tetracyclin/Oxytetracyclin	resistent
Trimethoprim/Sulphamethoxazol	sensibel

2 Methoden

2.1 Tierschutzantrag

Bei den Tierversuchen handelte es sich um durch die Regierung Oberbayern genehmigte Versuchsvorhaben mit den Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-108-05 sowie 55.2-1-54-2531-102-09.

2.2 Tiermodell

Für die Durchführung der Untersuchungen wurden ausschließlich Tiere verwendet, die den unter III.1.6 genannten Kriterien entsprachen.

Teilprojekt „Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS“

Die Tiere (n = 3) dieses Projektes waren in der ersten oder zweiten Laktation. Pro Tier wurden drei Versuche im Abstand von 2 Monaten durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 2 gezeigt.

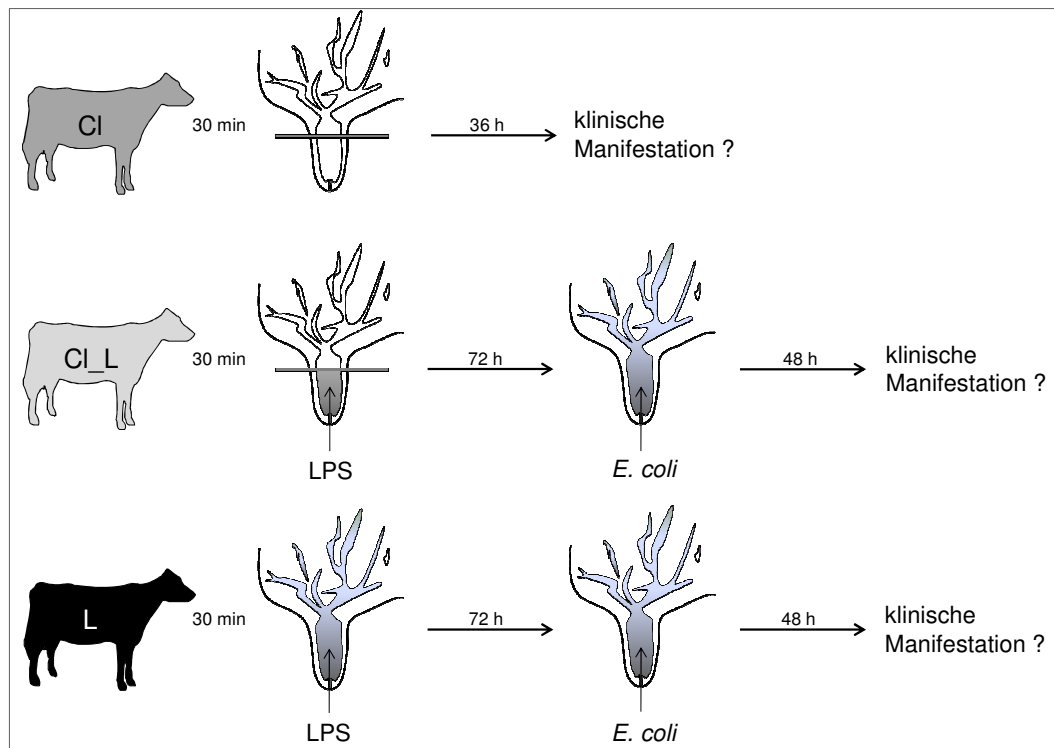


Abbildung 2: Tiermodell des Teilprojekts „Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS“

Für die Versuche wurden jeweils 12 h vor Versuchsbeginn die Viertel mit dem niedrigsten SCC in der Milch für die Behandlung ausgewählt. Über einen Zeitraum von 30 min wurde eine Zitzenklemme an die Zitzenbasis eines Euterviertels von je 3 Tieren („CI“) angesetzt und die klinisch erfassbaren Auswirkungen für 36 h überprüft. An drei weiteren Zitzen („CI_L“) wurde ebenfalls eine Zitzenklemme für 30 min angesetzt und 10 µg LPS in die Zitzenzisterne appliziert. In Gruppe „L“ wurde in die Zitzen (n = 3) 10 µg LPS langsam intramammär infundiert. Nach einem Zeitraum von 72 h wurden die vorbehandelten Euterviertel der Gruppen „CI_L“ und „L“ experimentell mit 500 CFU *E. coli* infiziert und die klinischen Manifestationen für weitere 48 h überwacht.

Abkürzungen: „CI“ = Ansetzen der Zitzenklemme ohne sonstige Manipulation; „CI_L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne; „L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min.

Bei der Versuchsgruppe „CI“ (Clamp: Ansetzen der Zitzenklemme ohne sonstige Manipulation) wurde zum Zeitpunkt 0 h eine Zitzenklemme (siehe III.1.1) unterhalb des Fürstenberg’schen Venenrings angesetzt und für 30 min dort belassen. Anschließend wurde alle 12 h über einen Zeitraum von 36 h die somatische Zellzahl der einzelnen Viertel überprüft und dokumentiert (siehe III.2.9.2).

Die Zitzenklemme wurde auch bei der zweiten Versuchsgruppe „CI_L“ (Clamp/LPS: LPS-Infusion mit aufgesetzter Zitzenklemme) verwendet. Zum Zeitpunkt 12 h vor Versuchsbeginn wurde der Zellgehalt der Euterviertel bestimmt und das zellniedrigste Viertel für den Versuch ausgewählt. Die entsprechende Zitze wurde zum Zeitpunkt 0 h gründlich gereinigt und desinfiziert. Die Zitzenklemme wurde an dieselbe Lokalisation wie in Gruppe „CI“ angesetzt. Nach sorgfältigem, 3mali-

gem Spülen der Zitzenzisterne mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung (15 mL) wurde das LPS in einer Dosierung von 10 µg/mL vorsichtig in die Zitzenzisterne appliziert (zur detaillierten Beschreibung des Prozederes siehe III.2.4.3). Nach 30minütiger Einwirkzeit wurde das LPS wieder aus der Zisterne herausgestrichen, die Zitze 3mal mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung (15 mL) gespült und das Euter mit Hilfe von 20 IU (International Units) Oxytozin i. v. sorgfältig ausgemolken. Zum Zeitpunkt 72 h nach LPS-Vorbehandlung wurde das Viertel mit 500 CFU *E. coli* experimentell infiziert. Der Versuch endete nach weiteren 48 h.

Die Versuchsgruppe „L“ (LPS-Infusion ohne aufgesetzte Klemme) wurde analog zur Gruppe „CL_L“ durchgeführt. Hierbei wurde jedoch keine Zitzenklemme verwendet und die LPS-Lösung direkt in die Zitzenzisterne appliziert.

Teilprojekt „Intramammäre Induktion einer Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh“

Etwa zwei Wochen vor errechnetem Kalbetermin wurden die Versuchstiere in der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim in einer Isolierabteilung in Einzelhaltung aufgestellt. Die Tiere standen auf Gummimatten mit Stroheinstreu und wurden mit Heu *ad libitum* und nach der Kalbung mit TMR *ad libitum* sowie leistungsabhängigen Mengen an Kraftfutter und Getreideschrot gefüttert. Ab dem Zeitpunkt der Einstellung standen die Tiere ganztägig unter Geburtsüberwachung. So wurden die Tiere per Video überwacht, zusätzlich alle 3 h durch eine Person kontrolliert und mindestens einmal pro Tag rektal untersucht. Ab dem dritten Tag vor dem errechneten Geburtstermin wurde zusätzlich die Progesteronkonzentration im Serum semiquantitativ bestimmt (siehe III.2.11.4). Im Übrigen wurde morgens und abends die Körpertemperatur rektal gemessen und zusammen mit der Futteraufnahme dokumentiert.

Eine Übersicht zum Versuchsaufbau ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: jedes Euterviertel der Kühe in Gruppe „pL72EC“ (p = puerperale, multipare Kühe, L = LPS-Vorbehandlung, 72EC = 72 h später folgende *E. coli*-Infektion) wurde 36 bis 48 h nach der Kalbung mit jeweils 1 µg LPS gelöst in 5 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung vorbehandelt. Nach weiteren 72 h wurde jeweils das Viertel, das zu diesem Zeitpunkt den niedrigsten SCC aufwies, mit 500 CFU *E. coli* 1303 experimentell infiziert. Die Versuchstiere der Gruppe „pEC“ (p = puerperale, multipare Kühe, EC = *E. coli*-Infektion) wurden keiner Vorbehandlung unterzogen und maximal 156 h nach der Kalbung

mit *E. coli* infiziert.

Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Versuchsreihen von PFISTER (2009) und MEHNE (2010) herangezogen. Bei MEHNE (2010) wurden erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (2. - 6. Laktationsmonat, SCC < 50.000 Zellen/mL Milch) auf dem zellniedrigsten Viertel experimentell mit *E. coli* 1303 infiziert. Diese Gruppe ist für die hier vorliegende Studie eine Kontrollgruppe und trägt den Namen „EC“.

Die Gruppe „L72EC“ wurde analog zur Gruppe „pL72EC“ zunächst mit LPS vorbehandelt und 72 h nach Infusion mit *E. coli* 1303 infiziert. Es handelte sich dabei nicht um puerperale, multipare, sondern um erstlaktierende Kühe aus der Arbeit von PFISTER (2009), die sich in der Mitte der Laktation (2. - 6. Laktationsmonat, SCC < 50.000 Zellen/mL Milch) befanden.

Die Versuche aller Gruppen endeten 24 h *p. infect.* mit der Tötung der Tiere und Entnahme von Gewebeproben. Während des gesamten Zeitraumes des Versuches wurden die Allgemein- und Eutergesundheit der Tiere überwacht (siehe III.2.7 bis einschließlich III.2.9). Zusätzlich wurde bei den puerperalen Tieren täglich die Kalziumkonzentration im Blut bestimmt. Bei entsprechend niedrigen Werten (< 1,0 mmol/L) wurde zur Prophylaxe gegen Festliegen Kalzium in Form von Kalziumborogluconat infundiert. Bei zwei puerperalen Tieren wurde eine Labmagenverlagerung diagnostiziert, die jedoch durch konservative Methoden mittels Wälzen therapiert werden konnte. Keines der Versuchstiere wurde im Versuchszeitraum mit antimikrobiellen oder antiphlogistischen Therapeutika behandelt. Ein Tier der Gruppe „pEC“ entfiel als Proband, da es vor Beginn des Versuches Fieber unbekannter Genese zeigte.

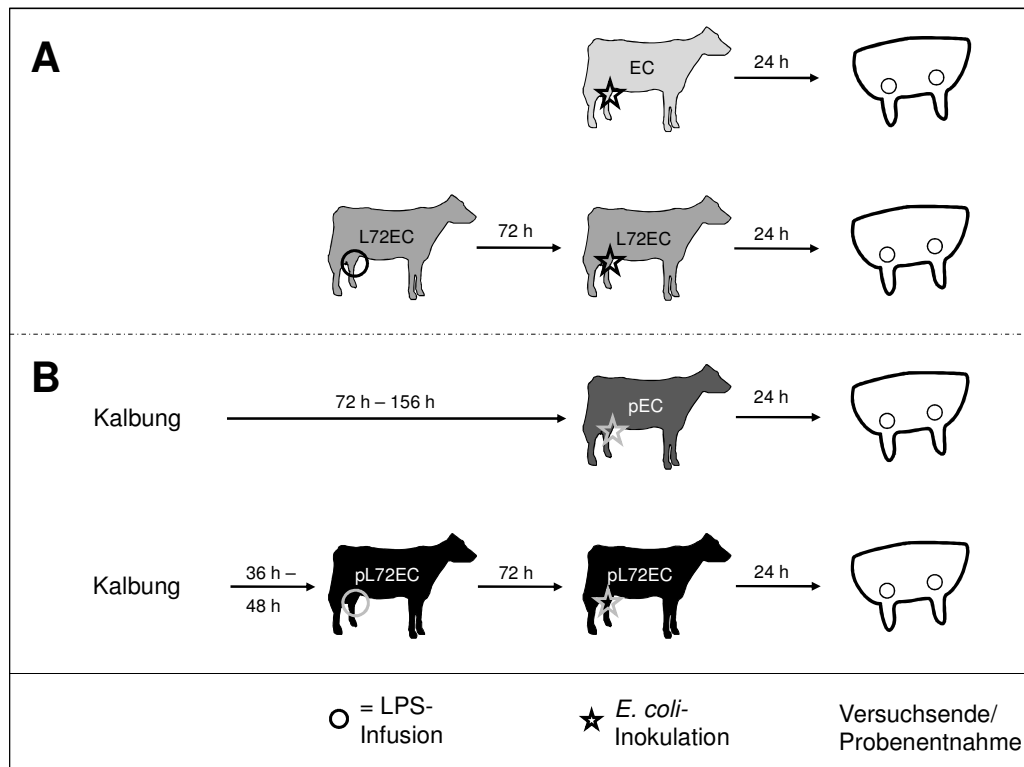


Abbildung 3: Tiermodell des Projektteils „Intramammäre Induktion einer Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh“

Bei fünf erstlaktierenden („L72EC“) sowie fünf multiparen, puerperalen Kühen („pL72EC“) wurde in die vier Euterviertel jeweils 1 µg LPS gelöst in 5 mL NaCl-Lösung infundiert. 72 h später wurde das Viertel eines Tieres mit dem niedrigsten Zellgehalt mit 500 CFU *E. coli* experimentell infiziert. Die Gruppen „EC“ (erstlaktierend) und „pEC“ (multipar, puerperal) dienen als Kontrolle; auch hier wurde in das zellniedrigste Viertel 500 CFU *E. coli* inokuliert. Die Tiere wurden 24 h *p. infect.* getötet und Gewebeproben verschiedener Regionen entnommen (siehe III.2.12).

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung (n = 5); „L72EC“: mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (n = 5); „pEC“ multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung (n = 4); „pL72EC“: multipare, mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche (n = 5).

2.3 Voruntersuchung der Probanden

Der allgemeine Gesundheitsstatus der in Frage kommenden Kühe wurde anhand von Verhalten, Ernährungs- und Pflegezustand sowie durch eine gründliche Untersuchung der Organsysteme, wie bei ROSENBERGER (1990) beschrieben, beurteilt. Um die Beurteilung der Allgemeingesundheit zu vervollständigen, wurde ein rotes und weißes Blutbild angefertigt und die chemischen Blutparameter auf physiologische Werte untersucht (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Untersuchte Blutparameter der Versuchstiere

Blutparameter	Referenzbereich	Einheit
Erythrozyten	5 - 8	Tera/L
Leukozyten	4 - 10	Giga/L
Thrombozyten	200 - 800	Giga/L
Retikulozyten	≤ 1	‰
Hämoglobin	6,2 - 8,7	mmol/L
Hämatokrit	30 - 36	%
Myelozyten	0	G/L
Metamyelozyten	0	G/L
Stabkernige neutrophile Granulozyten	0 - 0,1	G/L
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	0,85 - 1,53	G/L
Lymphozyten	2,5 - 5,5	G/L
Monozyten	0 - 0,2	G/L
Eosinophile	0 - 0,9	G/L
Basophile	0 - 0,01	G/L
Glukose	2,5 - 3,3	mmol/L
Harnstoff	≤ 5,5	mmol/L
Kreatinin	≤ 110	μmol/L
Gesamteiweiß	60 - 80	g/L
Albumin	30 - 40	g/L
Globulin	10 - 40	g/L
Gesamt-Bilirubin	≤ 8,5	μmol/L
Glutartest	> 15	min
Phosphor	1,5 - 2,1	mmol/L
Mg²⁺	0,74 - 1,44	mmol/L
Ca²⁺	2 - 3	mmol/L
Na⁺	135 - 150	mmol/L
K⁺	4 - 5	mmol/L
Cl⁻	90 - 105	mmol/L
AST	≤ 80	U/L
GGT	≤ 36	U/L
GLDH	≤ 16	U/L
CK	≤ 245	U/L
GSH-Px	> 250	U/gHb

Abkürzungen: AST = Aspartat-Aminotransferase, GGT = Gamma Glutamyl-Transferase, GLDH = Glutamatdehydrogenase, CK = Creatinkinase, GSH-Px = Glutathion-Peroxidase

Besonderes Augenmerk lag auf der Untersuchung des Euters: Das Euterparenchym sowie die Zitzen wurden gründlich palpiert, um fühlbare Veränderungen zu detektieren. Im Falle eines laktierenden Tieres wurde das Milchsekret nach Melkbarkeitsprüfung anschließend makroskopisch beurteilt und die somatische Zellzahl (SCC) mit Hilfe des DeLaval cell counters (siehe III.1.1) bestimmt. Für eine

bakteriologische Untersuchung (siehe III.2.9.1) wurden sterile Milchproben (siehe III.2.6) jedes Euterviertels gewonnen, gekühlt ins Labor der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München transportiert und umgehend weiterverarbeitet.

Der Ankauf der Versuchstiere kam nur zustande, wenn sich alle Parameter der zweimal im Abstand von einer Woche erfolgten Allgemeinuntersuchung im physiologischen Bereich befanden und das Euter als gesund eingestuft werden konnte. Die bakteriologische Milchuntersuchung der laktierenden Tiere (Gruppen „EC“, „L72EC“, „Cl“, „Cl_L“, „L“) und der eventuell noch trockenzustellenden Tiere musste negativ ausfallen. Der SCC dieser Tiere durfte eine definierte Grenze von $5 \cdot 10^4$ Zellen/mL Milch in den 4 Eutervierteln nicht überschreiten.

2.4 Lipopolysaccharid (LPS)

2.4.1 Extraktion des LPS

Die Extraktion des verwendeten Lipopolysaccharids erfolgte am Lehrstuhl für Biochemische Pharmakologie im Fachbereich Biologie der Universität Konstanz unter Leitung von Frau Dr. Sonja von Aulock. Dazu wurde zuerst aus einer Bakterienreinkultur von *E. coli* 1303 eine Suspension mit einer definierten Anzahl an CFU hergestellt, die anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht inaktiviert wurde. Nach einer von MORATH *et al.* (2001) entwickelten Methode wurden die Bakterien nun zunächst in Natriumcitratlösung suspendiert und ihre Zellwände durch Ultraschall mit Hilfe eines Sonifiers aufgeschlossen. Es folgte eine Zugabe von n-Butanol. Durch anschließende Zentrifugation wurde die Suspension in ihre Phasen getrennt. Die wässrige Phase, die das LPS enthielt, wurde durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie auf einer Octyl-Sepharose-Säule in einer Fast Protein Liquid Chromatography-Anlage weiter aufgereinigt. Nach Inkubation mit Vollbut wurden die LPS-haltigen Fraktionen, anhand der mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bestimmten Zytokinfreisetzung (TNF- α und IFN- γ) identifiziert. Das extrahierte LPS wurde nach der Methode von HIRSCHFELD (2000) mit Triethylamin-Lösung und Desoxycholat nachgereinigt. Das LPS wurde durch Inkubation bei -20°C ausgefällt, mit Ethanol nochmals gereinigt und anschließend für den Versand luftgetrocknet.

2.4.2 Herstellung der Inokulationsdosis von LPS

Die Lagerung der LPS-Portionen in Konzentrationen von 1 und 10 µg/mL 0,9 %iger NaCl-Lösung erfolgte in sterilen Cryotubes bei -80°C. Für das Teilprojekt „Intramammäre Induktion der Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh“ wurde eine finale Gebrauchsverdünnung von 1 µg LPS mittels 5 mL steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt. Für das Teilprojekt „Immunmodulation im distalen Milchdrüsenkompartiment“ wurden 10 µg LPS gelöst in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung verwendet.

2.4.3 Intramammäre Applikation des LPS

Teilprojekt „Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS“

Das Auswahlkriterium für das Euterviertel, an dem die Studie durchgeführt werden sollte, war der niedrigste Zellgehalt in der Milch, die 12 h vor Versuchsbeginn ermolken worden war. Am Versuchstag wurde die Zitze unter besonderer Beachtung der Zitzenkuppe mit Zellstoff zunächst grob gereinigt und anschließend mit 70 %igem Ethanol getränktem Papier aseptisch vorbereitet. Dabei war zu beachten, das Euter möglichst wenig zu stimulieren, um ein Einschießen der Milch zu vermeiden. Insgesamt 10 µg LPS gelöst in 1 mL steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung wurden in einer Einmalspritze aufgezogen und vorsichtig mit geringem Druck innerhalb von etwa 5 s über eine Zitzenkanüle in die Zitzenzisterne appliziert. Nach 30 min Wartezeit wurde den Tieren 20 IU Oxytozin (in 2 mL) in die Schwanzvene appliziert und das Euter unmittelbar danach gründlich ausgemolken.

Für die Versuche, bei denen die räumliche Verbindung zwischen Zitzen- und Drüsenzisterne unterbunden werden sollte („Cl_L“), wurde vor Applikation des LPS eine Zitzenklemme unterhalb des Fürstenberg'schen Venenrings angesetzt. Darauf folgten das Ausstreichen der Zitzenzisterne mit zwei Fingern und die anschließende Spülung mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung über eine Einwegspritze mit aufgesetzter steriler Zitzenkanüle bis die wiedergewonnene Spülflüssigkeit vollkommen klar war. Schließlich wurde 1 mL der LPS-Lösung (10 µg/mL) vorsichtig und langsam über etwa 5 s appliziert und 30 min intrazisternal belassen. Nach der Einwirkzeit erfolgten ein nochmaliges Ausstreichen und Spülen der Zisterne, die Entfernung der Zitzenklemme und das Ausmelken des Euters nach Oxytozin-Injektion.

Teilprojekt „Intramammäre Induktion der Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh“

Die Kühe (Gruppe „pL72EC“) waren zunächst mit einer eigens angefertigten Vierviertelmelkmaschine (siehe III.1.1 und Abbildung 4) auszumelken. Um auch das Residualgemelk zu erhalten, wurde den Tieren anschließend 20 IU Oxytozin (in 2 mL) i. v. injiziert und das Melkzeug nochmals angesetzt. Die je Viertel gewonnene Milchmenge wurde dokumentiert. Die Zitzen der einzelnen Euterviertel wurden mit 70 %igem Ethanol getränktem Zellstoff gründlich gereinigt.

Die in 1 µg/mL vorliegende LPS-Lösung wurde mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung auf eine Konzentration 0,2 µg LPS/mL verdünnt. Pro Viertel wurden 5 mL der körperwarmen LPS-Lösung mittels einer Einwegspritze über eine Zitzenkanüle nach aseptischer Reinigung der Zitzenkuppe in die Zitzenzisterne appliziert. Während der Entfernung der Zitzenkanüle aus dem Zitzenkanal, wurde die Zitzenkuppe mit Daumen und Zeigefinger zusammengedrückt, um ein Zurücklaufen der Flüssigkeit zu verhindern. Bei so abgedichtetem Zitzenkanal wurde dann mit der anderen Hand der Inhalt in der Zitzenzisterne fünfmal Richtung Drüsenzisterne ausgestrichen und anschließend das Drüsengewebe 30 s lang durchmassiert, um eine gleichmäßige Verteilung des LPS zu erreichen.

2.5 Modellkeim *E. coli* 1303

2.5.1 Herstellung der Infektionsdosis

Der in den Versuchen eingesetzte Keim, *E. coli* 1303, lagerte kryokonserviert auf Cryoballs (Mikrobanksystem „CryobankTM“; siehe III.1.3). Nach dem Ausplattieren auf Columbia Schafblut-Agar folgte eine Inkubation bei 37°C für 24 h. Mehrere Kolonien wurden mittels einer Öse in 10 mL Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart Infusion Broth, BHI) überführt, auf dem Vortexer gut durchmischt und 6 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem intensivem Durchmischen wurden 100 µL dieser Suspension in 9,9 mL Trypton-Soja-Bouillon überführt, sorgfältig durchmischt und über 18 h bei 37°C inkubiert.

Um eine definierte Anzahl CFU zu erlangen, wurde die optische Dichte (OD) einer Bouillon photometrisch und die Keimzahl durch das Spatelverfahren bestimmt. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten mit 0,9 %iger NaCl-Lösung bis zu einer Stufe von 10^{-8} hergestellt. Aus den Verdün-

nungsstufen 10^{-6} bis 10^{-8} wurden 100 μL als Triplikate auf Columbia Schafblut-Agar Platten mit sterilen Glasperlen ausgestrichen. Die Platten wurden daraufhin bei 37°C über 24 h inkubiert. Platten, die zwischen 3 und 300 Kolonien aufwiesen, wurden mit Hilfe des Gerätes „Flash and Go“ (siehe III.1.1) ausgezählt. Diese Zahl wurde nun ins Verhältnis zur photometrisch bestimmten OD der ersten Verdünnungsstufe (10^{-1}) gesetzt. Durch wiederholt reproduzierbare Werte nach Ausplattieren konnte eine Eichkurve erstellt werden, die es ermöglichte, durch Ermittlung der OD der ersten Verdünnungsstufe bei einer Wellenlänge von 623 nm auf die Zahl der CFU in der Bouillon zu schließen. Mit ihrer Hilfe war durch Bestimmung der OD in der Bouillon die Errechnung der entsprechenden Bakterienkonzentration in CFU möglich. Die angestrebte *E. coli*-Infektionsdosis von 250 CFU/mL wurde mit entsprechenden Teilen steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung eingestellt und durch Ausplattieren sowie Inkubation bei 37°C über 24 h entsprechend kontrolliert.

2.5.2 Experimentelle Infektion

Nach dem Melken wurde den Kühen 20 IU Oxytozin (in 2 mL) i. v. injiziert. Anschließend wurden sie mit der Vierviertelmelkmaschine nochmals ausgemolken. Die gewonnene Menge Residualgemelk wurde für jedes Viertel dokumentiert.

Vor der Infektion mussten die ausgewählten Viertel mit 70 %igem Ethanol getränktem Zellstoff gründlich gereinigt und aseptisch präpariert werden. Die Infektionsdosis (500 CFU *E. coli*) wurde in einem Volumen von 2 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung mittels einer Einwegspritze und einer Zitzenkanüle in die Zitzenzisterne instilliert. Während der Entfernung der Zitzenkanüle aus dem Zitzenkanal musste die Zitzenkuppe mit Daumen und Zeigefinger zusammengehalten werden, um ein Zurücklaufen der Infektionsdosis zu verhindern. Um eine gleichmäßige Verteilung der Infektionsdosis zu erreichen, wurde der Zisterneninhalt bei verschlossenem Zitzenkanal mit der anderen Hand fünfmal in proximaler Richtung ausgestrichen und anschließend wurde das Drüsengewebe 30 s lang durchmassiert.

2.6 Gewinnung von Milchproben

Vor Beginn des Melkens waren das Euter und die Zitzen zunächst mit einem feuchten Tuch von grobem Schmutz zu befreien. Die ersten Strahlen der Milch

wurden mit der Hand in die Vertiefungen einer Vierviertelgemelks-Schale gemolken und grobsinnlich untersucht. Anschließend wurde die Milch bis zum Eichstrich abgekippt (ca. 1,8 mL) und ein California Mastitis Test (CMT) zur semi-quantitativen Bestimmung der Zellzahl durchgeführt.

Der nächste Schritt war die Reinigung der Zitzen für die Sekretprobenentnahme zur bakteriologischen Untersuchung (siehe III.2.9.1) unter besonders sorgfältiger Reinigung und Desinfektion der Zitzenkuppen mit 70 %igem Ethanol getränktem Zellstoff. Pro Euterviertel wurden ca. 5 mL Milch steril ermolken und bis zur bakteriologischen Untersuchung im Labor auf Eis gelagert.



Abbildung 4: Die Vierviertelmelkmaschine mit angesetztem Melkzeug

Diese Abbildung zeigt den Melkakt mit der Vierviertelmelkmaschine. Das Sammelstück ist in 4 Kammern geteilt und über 4 Milchschräuche mit den Milchauffangzylindern der Melkmaschine verbunden. An den Zylindern ist eine Eichskala angebracht, um die gewonnene Milchmenge pro Viertel direkt ablesen zu können.

Nach manuellem Anrüsten des Euters wurde die Vierviertelmelkmaschine (siehe III.1.1) ans Euter angesetzt. Hierauf folgte die Messung und Dokumentation der ermolkenen Milchmenge. Zum Schluss wurde Milch zur Untersuchung auf Inhaltsstoffe und Zellgehalt (siehe III.2.9.2) sowie zur durchflusszytometrischen Zellcharakterisierung und -quantifizierung (siehe III.2.10) entnommen.

2.7 Erhebung und Beurteilung allgemeiner klinischer Parameter

Der allgemeine klinische Status der Versuchstiere war Gegenstand regelmäßiger

Untersuchungen. Zu den Beobachtungszeitpunkten wurde Körpertemperatur, Herzfrequenz, Schleimhautfarbe, Pansenmotorik, Futteraufnahme und Körperhaltung sowie das Verhalten des Tieres festgestellt, dokumentiert und hinsichtlich des Grades einer Störung bewertet (siehe Tabelle 4). Die Einteilung erfolgte gemäß einer gering-, mittel- oder hochgradigen Veränderung.

Teilprojekt „Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS“:

Die Untersuchung der Tiere erfolgte zu folgenden Zeitpunkten: bei Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor und nach LPS-Inokulation, danach stündlich über 12 h, darauffolgend zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 60 h und 72 h nach LPS-Infusion. Letzterer entspricht dem Zeitpunkt unmittelbar vor der experimentellen Infektion mit *E. coli*. Nach der Infektion wurden die Tiere für weitere 24 h in Intervallen von 2 h untersucht.

Teilprojekt „Intramammäre Induktion der Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh“:

Bis zur Kalbung wurden die Kühe einmal täglich untersucht und danach zu folgenden Zeitpunkten: unmittelbar nach der Geburt bis unmittelbar vor LPS-Inokulation (entspricht 36 h oder 48 h *p. p.*) alle 12 h, ab dem Zeitpunkt der LPS-Vorbehandlung stündlich für 12 h, dann zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 60 h und 72 h nach LPS-Infusion (entspricht dem Zeitpunkt unmittelbar vor *E. coli*-Inokulation). Daraufhin wurden die Tiere alle zwei Stunden bis zur 24 h später erfolgenden Schlachtung untersucht.

Tabelle 4: Klinischer Score für Allgemeingesundheit (WENZ *et al.*, 2001)

Variable	Kriterium	Punkte
rektale Körpertemperatur (°C)	37,5 - 39,2	0
	39,3 - 40,0	1
	40,1 - 41,4	2
	$\geq 41,5$ oder $< 37,8$	3
Herzfrequenz (Schläge/min)	< 90	0
	≥ 90	1
Pansenkontraktionsrate (Kontraktionen/2min)	≥ 2	0
	1	1
	0	2
Verhalten (Anzeichen von Depression)	aufmerksam	0
	lethargisch	1
	apathisch	2
	hochgradig erkrankt, festliegend	3
Futtermaufnahme	unverändert	0
	reduziert	1
	keine	2
Gesamtpunktzahl systemischer Parameter	geringgradig erkrankt	1 - 3
	mittelgradig erkrankt	4 - 8
	hochgradig erkrankt	9 - 11

2.8 Erhebung und Beurteilung von Parametern am Euter

Die klinischen Parameter am Euter waren Gegenstand der Untersuchungen zu den unter III.2.8 genannten Beobachtungszeitpunkten. Anhand des klinischen Scores für lokale Parameter am Euter (siehe Tabelle 5) wurden die Befunde in gering-, mittel-, und hochgradige lokale entzündliche Veränderungen eingeteilt.

Die Adspektion und Palpation des Euters wurde zu den Melkzeiten (alle 12 h) und zu jedem Beobachtungszeitpunkt nach LPS-Vorbehandlung und *E. coli*- Infektion ausgeführt. Zunächst wurde auf Veränderungen der Farbe der Euterhaut und Abweichung in der Größe (Schwellung) der einzelnen Viertel geachtet. Der Grad der Schwellung wurde anhand des klinischen Scores für Eutergesundheit (siehe Tabelle 5) in die Stufen o. b. B. (ohne besonderen Befund), 1,5- und 2fach vergrößert eingeteilt.

Tabelle 5: Klinischer Score für Eutergesundheit (WENZ *et al.*, 2001)

Variable	Kriterium	Punkte
Schwellung/Induration des Viertels	o. b. B.	0
	1,5fach	1
	2fach	2
Subkutanes Ödem (infiziertes Euterviertel)	o. b. B.	0
	< 50 % des Viertels	1
	> 50 % des Viertels	2
Anzeichen für Schmerzhaftigkeit des Viertels (infiziertes Euterviertel)	o. b. B.	0
	schmerzhaft	1
Oberflächentemperatur (infiziertes Viertel verglichen mit nicht infiziertem Viertel)	unverändert	0
	erhöht	1
Milchsekret	o. b. B.	0
	einige Flocken	1
	viele Flocken	2
	Verlust des Milchcharakters, serumartiges Sekret	3
Gesamtpunktzahl der lokalen Parameter	geringgradige Entzündung	1 - 3
	mittelgradige Entzündung	4 - 7
	hochgradige Entzündung	8 - 9

Abkürzungen: o. b. B. = ohne besonderen Befund

Weitere zu beurteilende Parameter waren folgende Merkmale: Induration des Eutergewebes, Ausbildung eines subkutanen Ödems (Verschiebbarkeit der äußeren Haut), Oberflächentemperatur und Schmerzreaktion bei Palpation.

Mit der makroskopischen Beurteilung des Milchsekrets aus dem Vor- und Hauptgemelk endete die klinische Untersuchung des Euters. Dabei war auf Veränderungen des Milchcharakters und auf mögliche Flockenbildung zu achten.

2.9 Labordiagnostische Beurteilung des Eutersekrets

Zu jeder Melkzeit wurden Proben des Vorgemelks für die bakteriologische Untersuchung und Proben des Hauptmelks für die Bestimmung der Milchinhaltsstoffe und des SCC entnommen.

2.9.1 Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets

Für die bakteriologische Untersuchung wurde je Euterviertel eine Probe unter aseptischen Bedingungen entnommen (siehe III.2.6) und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Im Labor wurde die Milch resuspendiert und mit Hilfe einer sterilen Impföse (Durchmesser 5 mm) auf Columbia Schafblut-Agar, Edwards-Nährboden mit Schafblut und Kristallviolett-Galle-Laktose-Agar (siehe III.1.3) ausgestrichen. Für die Quantifizierung der Bakterienzahl (CFU/mL) war zu den Zeitpunkten 12 h und 24 h nach experimenteller *E. coli*-Infektion eine Verdünnungsreihe der Sekretproben bis zur Stufe $1:10^5$ mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung herzustellen. Jeweils 100 µL dieser Verdünnungen wurden auf Columbia Schafblut-Agar ausgestrichen. Mit der Bebrütung der Agarplatten über 24 h bei 37°C im Brutschrank und der Auszählung der gewachsenen Kolonien mit Hilfe des Gerätes „Flash and Go“ (siehe III.1.1) endete dieser Untersuchungsschritt.

2.9.2 Bestimmung von Milchinhaltsstoffen und der somatischen Zellzahl (SCC)

Unmittelbar nach dem Melkakt wurde der SCC durch fluoreszenzoptische Messung mit einem DeLaval cell counter (DCC; siehe III.1.1) bestimmt. So war es möglich, direkt vor Ort einen Wert in Zahlen des Milchzellgehalts zu erhalten. Für die Auswahl des zu infizierenden Viertels war dies besonders wichtig.

Zur exakten Bestimmung des SCC wurden Viertelmelksproben jedoch an das Zentrallabor (DIN EN/ISO 17025 akkreditiert) des Milchprüfrings Bayern e. V. in Wolnzach gesandt. Dafür wurden etwa 40 mL Milch aus den Zylindern der Viertelmelkmaschine entnommen und in spezielle Gefäße, in denen das Konservierungsmittel Acidol vorgelegt war, überführt. Der Zellgehalt ($\text{SCC} \cdot 10^3/\text{mL}$) wurde auch hier fluoreszenzoptisch mit dem Fossomatic-FC bestimmt. Die Untersuchung der Konzentrationen von Fett (%), Eiweiß (%), Laktose (%), Harnstoff (mg/mL) und des pH-Wertes erfolgte durch eine Infrarot-Absorptionsmessung mit dem MilcoScan-FT-6000. Nur die Ergebnisse der durch den Milchprüf-ring durchgeführten Analysen wurden zur Auswertung der Versuche genutzt.

2.10 Quantifizierung und Charakterisierung von Milchezellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von Zellen. Die Probensuspension wird dabei durch eine Kapillare geleitet und stark beschleunigt. So kommen die Zellen hintereinander in einer Reihe zu liegen. Die Einzelzellen werden nun an einem zur Kapillare rechtwinklig verlaufenden Laserstrahl vorbeigeleitet. Beim Auftreffen des monochromatischen Lichtstrahls einer bestimmten Wellenlänge (hier 488 nm) auf eine Zelle wird dieser Lichtstrahl gestreut oder er dient zur Anregung von Fluoreszenz-Markern. Auf diese Weise können verschiedene physikalische wie auch biochemische Eigenschaften der Zellen analysiert werden, wie zum Beispiel Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität. Wird der Lichtstrahl nur in einem kleinen Winkel (10°) abgelenkt, spricht man vom Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward scatter). Dieses gilt als Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side scatter) ist das in einem Winkel von 90° abgelenkte Licht. Durch den SSC kann man Aussagen über Granularität, Membranfaltung und Form der Zellen machen. Im Durchflusszytometer wird jedes Lichtsignal („Event“) detektiert, in ein elektrisches Signal umgewandelt und an einen angeschlossenen Computer weitergeleitet und gespeichert (ROTHER, 2009).

Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit kam ein Accuri[®] C6 Flow Cytometer zum Einsatz. Es ist mit zwei Lasern der Wellenlängen 488 nm und 640 nm ausgestattet, einem FSC-, einem SSC- und vier Fluoreszenzdetektoren. Mit Hilfe der Fluoreszenzdetektoren erfasst das Gerät Lichtemissionen in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen: Grün- (533/30 nm, FL1), Gelbrot- (585/40 nm, FL2) sowie Rot- (> 670 nm, FL3) und Dunkelrotfluoreszenz (675/25 nm).

Durch die 6 verschiedenen Parameter (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3) wird folglich jeder Partikel charakterisiert und als Messereignis festgehalten.

Die computergestützte Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FCS Express V3. Die Ergebnisse wurden multiparametrisch als korrelierte Punkte (Dot Plot) oder Dichtediagramme (Density Plot) dargestellt.

2.10.1 Aufarbeitung der Milchproben für die Durchflusszytometrie

Die Milchproben wurden unmittelbar nach ihrer Gewinnung auf Eis weiterverarbeitet, um verfälschte Ergebnisse durch Apoptose und Nekrose der Zellen wäh-

rend der Aufarbeitung zu vermeiden. Zur Herstellung der Zellsuspension für die Analyse am Durchflusszytometer wurden 10 mL Milch der Hauptgemelksfraktion in ein steriles Zentrifugenröhrchen (50 mL) gegeben, in das 40 mL PBS vorgelegt waren. Nach anschließender 10minütiger Zentrifugation der Suspension bei 4°C und 2250 x g ohne Bremse musste der Rahm, der sich am oberen Rand des Gefäßes abgesetzt hatte, vorsichtig mit einem Spatel gelöst und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe zusammen mit dem flüssigen Überstand abgesaugt werden. Das Zellpellet wurde im Zentrifugenröhrchen belassen und mit 1 mL PBS vorsichtig resuspendiert, um somit den an der Wand des Zentrifugenröhrchens haftenden Debris nicht ebenfalls wieder unterzumischen. Dieser Arbeitsschritt erwies sich bei Kolostrumproben als besonders wichtig. Anschließend wurde die Suspension in ein neues, steriles mit 50 mL PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (2250 x g, 10 min, 4°C, ohne Bremse). Am Ende stand ein dritter Waschschrift.

Für die Durchflusszytometrie wurde das Zellpellet mit 200 µL Trägerflüssigkeit (4µg/mL PJ) aufgelöst, auf dem Vortexer aufgeschüttelt und mit 80 µL Acridin-Orange (AO)-Lösung (siehe III.1.4) angefärbt. Die Suspension wurde anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

2.10.2 Vitalitätsbeurteilung und Quantifizierung nach Acridin-Orange/Propidiumjodid-Färbung

Die Vitalität der Zellen lässt sich durch Anfärben mit dem Farbstoff Acridin-Orange (AO) beurteilen. AO durchdringt intakte Zellmembranen und interkaliert mit der doppelsträngigen DNA. Wird der Kern mit UV-Strahlung angeregt, erscheint er grün fluoreszierend. Das Fluorochrom Propidiumjodid (PJ) dagegen kann nur in Zellen gelangen, wenn diese geschädigt sind und ihre Membranintegrität nicht mehr gegeben ist. Im Zellkern tritt PJ mit der DNA in Wechselwirkung. Aufgrund ihrer Rotfluoreszenz können diese membrangeschädigten, toten Zellen gut von den ungeschädigten Zellen unterschieden werden.

In der durchflusszytometrischen Analyse sind die unterschiedlich angefärbten Zellen mit den Fluoreszenzkanälen FL1 (grün) und FL3 (rot) erfassbar. Mit Hilfe der Software CFlow® wurden sogenannte „Gates“ (elektronische „Fenster“) gesetzt. So ist es möglich, einzelne Untergruppen der Messereignisse zu definieren und mehrere Gates logisch miteinander zu verknüpfen.

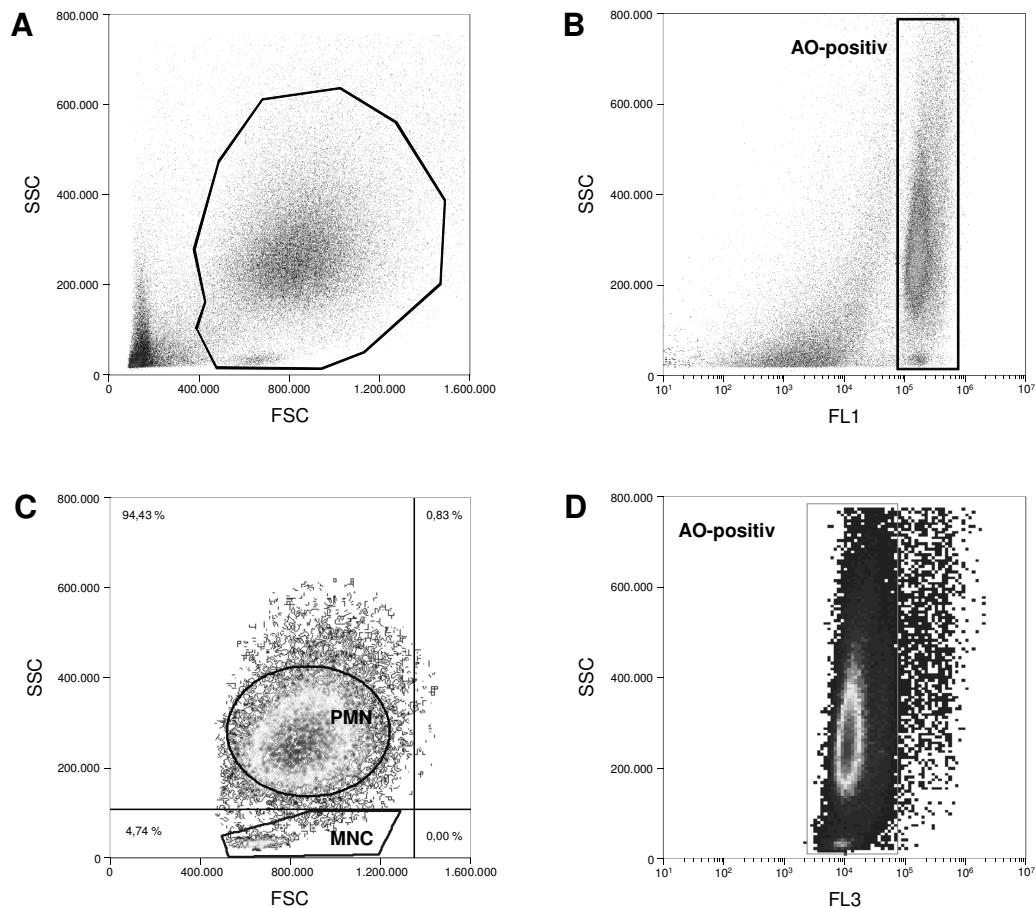


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse einzelner vitaler Milchkzellpopulationen anhand ihrer Anfärbbarkeit und Morphologie in hochzelliger Milch

Dargestellt sind Punkte- und Dichtediagramme nach Erfassung von 40.000 Ereignissen in hochzelliger Milch im Durchflusszytometer. **A:** Größe gegen Komplexität (FSC/SSC): Identifizierung der Zellen anhand ihrer Morphologie in den gemessenen Ereignissen im Punktediagramm; **B:** Grünfluoreszenz gegen Komplexität (FL1/SSC): Identifizierung Fluoreszenz-positiver, kernhaltiger Ereignisse (AO-positiv); **C:** Größe gegen Komplexität (FSC/SSC): Darstellung der Zellen aus A; Identifikation der Zellpopulationen PMN und MNC sowie Bestimmung des Verhältnisses MNC/PMN; **D:** Rotfluoreszenz gegen Komplexität (FL3/SSC): Identifizierung der vitalen Zellen (PI-negative Ereignisse).

Abkürzungen: MNC: Mononuclear Leukocytes, PMN: Polymorphonuclear Leukocytes.

Wie bei PETZL (2005) beschrieben, können im Punktediagramm FSC/SSC einzelne Zellsubpopulationen wie PMN, lymphoide Zellen, Makrophagen und Epithelzellen anhand ihrer morphologischen Charakteristika identifiziert werden. Nach Setzen eines Gates im FSC/SSC-Diagramm, das der Zellmorphologie entsprach, wurde die im Gate ausgewählten Zellen in SSC und Grünfluoreszenz (FL1) gesondert analysiert. Nicht-kernhaltige Messereignisse der Proben (außerhalb des Gates) konnten so ausgeschlossen werden. Auch in SSC/FL1 wurde ein Fenster gesetzt; dieses Mal auf die grün-fluoreszierenden, AO-positiven Ereignisse. Das Gate wurde mit dem der Zellmorphologie logisch verknüpft und als

Dichtediagramm dargestellt.

Es war nun möglich, die Zellfraktionen PMN und MNC zu definieren und ihre Anteile an den Events zu messen. Da bei jeder Milchprobe auch die somatische Zellzahl (SCC) erfasst wurde (siehe III.2.9.2), konnte dieser Wert mit dem gemessenen MNC/PMN-Verhältnis verglichen werden. Das FL3/SSC-Punktediagramm diente zur Erkennung PJ-positiver Ereignisse.

2.11 Klinische Labordiagnostik

Das rote Blutbild, das Differentialblutbild und die serologischen Blutparameter wurden im Diagnostiklabor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München untersucht (siehe Tabelle 3).

2.11.1 Gewinnung von venösem Blut

Das Blut wurde durch Punktion der *Vena jugularis* unter antiseptischen Kautelen nach Fixierung des Tieres und manueller Stauung des Gefäßes gewonnen. Zur Blutentnahme wurde das EDTA und Serum Blutentnahmesystem Monovette® für die Gewinnung von Blutleukozyten, -plasma und -serum eingesetzt.

Den Versuchstieren wurden zunächst Serum- und EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Blutproben im Herkunftsbetrieb und unmittelbar nach der Aufstallung in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München entnommen und anschließend untersucht. Vom Zeitpunkt des Versuchsbeginns an wurde alle 12 h eine EDTA-Blutprobe entnommen und ein Blutbild angefertigt.

2.11.2 Rotes Blutbild

Das rote Blutbild wurde mittels eines Sysmex pocH100i (siehe III.1.1) angefertigt. Für das Differentialblutbild wurde ein Blutaussstrich nach Pappenheim gefärbt und mikroskopisch differenziert. Bei der Auswertung war die Zahl zirkulierender Leukozyten von besonderem Interesse, da sie ein Parameter einer systemischen Reaktion im Rahmen einer Immunantwort ist.

2.11.3 Gewinnung von Serum und Plasma

Das mit Serum- und EDTA-Monovetten® entnommene Blut ruhte bei Raumtemperatur für 10 min. Die Röhrchen wurden anschließend bei 5000 x g über 10 min bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand (Serum oder Plas-

ma) musste vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt werden. Dabei war zu beachten, dass der Blutkuchen nicht aufgeschwemmt wurde.

Die Bestimmung der chemischen Blutparameter aus dem Serum (siehe Tabelle 3) wurde mit dem Hitachi Automatic Analyzer 911 durchgeführt.

Aus dem nicht mehr benötigten Rest des EDTA-Blutes wurde das Plasma gewonnen und als Rückstellproben bei -80°C gelagert.

2.11.4 Progesteronbestimmung aus dem Serum

Begleitend zur täglichen Geburtsüberwachung per Videokamera und durch Kontrolluntersuchungen wurde ab dem dritten Tag vor dem errechneten Geburtstermin die Progesteronkonzentration im Serum mit Hilfe des semiquantitativen Progesteronschnelltests, „Hormonost[®]“ (siehe III.1.4), bestimmt. Dieser ELISA wird vor allem in der Zyklusdiagnostik angewandt. Enzym-markierte Antikörper binden das Progesteron im Serum und stehen für die Reaktion mit dem Farbstoff nicht mehr zur Verfügung. Eine niedrige Hormonkonzentration ($< 2 \text{ ng}$) bedeutet folglich eine sichtbare Färbung der Testflüssigkeit. Nach STREYL *et al.* (2011) besteht jedoch die Möglichkeit, den Schnelltest auch in der Geburtsüberwachung einzusetzen. Da in den letzten 2 bis 3 Tagen vor der Kalbung die Progesteronkonzentration im Serum auf niedrige Werte unter 2 ng sinkt, kann diese Reduktion mit dem Hormonost-Test sichtbar gemacht werden. Ließ sich eine Einfärbung der Testflüssigkeit nach blau beobachten, war mit dem Beginn der Kalbung innerhalb der darauffolgenden 24 h zu rechnen (STREYL *et al.*, 2011).

2.12 Gewinnung von Gewebeproben

Zum Zeitpunkt 24 h nach experimenteller Infektion wurden die Versuchstiere des Projektes „Induktion der Endotoxintoleranz des Euters im geburtsnahen Zeitraum“ im Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim nach Betäubung mittels Bolzenschuss unter Blutentzug getötet. Unmittelbar danach wurden Gewebeproben aus verschiedenen Lokalisationen der Zitzen und des Drüsenparenchyms gewonnen und in RNAlater sowie in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Zeit zwischen Tötung und Beendigung der Probenentnahme betrug im Durchschnitt ca. 45 min.

Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Gewebeproben nach Rückkehr in die

Klinik für Wiederkäuer der LMU München bei -80 C gelagert.

Die Analyse der Gewebeproben und Auswertung der Ergebnisse waren nicht Teil dieser Arbeit.

2.13 Statistische Verfahren

Die statistischen Analysen wurden mit Excel (2007, Microsoft), Origin (Version 8), SPSS (Version 19) und dem Softwarepaket SAS (Version 9.2) ausgewertet.

Die Parameter Zellzahlen (logarithmierte Werte, um Normalverteilung zu erhalten) und Inhaltsstoffe der Milch sowie der Verlauf der Körpertemperatur wurden mittels gemischten Modellen (Proc Mixed in SAS) mit festen und zufälligen Effekten ausgewertet. Für wiederholte Messungen wurden die Modelle angepasst. Als zufälliger Effekt ging jeweils das Tier in die Berechnungen ein. Für Untersuchungen innerhalb einer Versuchsgruppe wurde der Faktor Zeit als unabhängige Variable auf seinen Einfluss auf den jeweiligen Parameter analysiert, um den zeitlichen Verlauf abzubilden.

Daten die normal verteilt waren, wurden auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten mittels T-Test untersucht. Aufgrund der Bonferroni-Korrektur wurde für diesen Test die Signifikanzgrenze auf 0,017 angepasst. Sowohl innerhalb einer Gruppe als auch zwischen zwei Gruppen wurden die Unterschiede der gemessenen Parameter zu den einzelnen Zeitpunkten mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt mit anschließenden paarweisen Mann-Whitney-U-Tests, bei denen zusätzlich noch eine Bonferroni-Korrektur angewandt wurde.

Kategorische Daten (Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung und des Scores für Allgemein- und Eutergesundheit) wurden mittels Chi-Quadrat-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Bei der Milchleistung und dem Leukozytengehalt im Blut wurden ihre Differenzen zum jeweiligen Ausgangswert (Zeitpunkt LPS-Infusion bzw. *E. coli*-Infektion) jeweils logarithmiert berechnet und statistisch verglichen. Die Veränderungen der Milchleistung werden im Ergebnisteil zur Darstellung der Messwertverteilung in Form von Boxplots (siehe Abbildung 6) wiedergegeben. Innerhalb der

Box liegen 50 % aller gemessenen Werte. Die untere Begrenzung der Box markiert die 25 %-, die mittlere Linie die 50 %- und die obere Begrenzung die 75 %-Grenze. Das untere Ende der vertikalen Linie bezeichnet die 5 %-Grenze und das obere die 95 %-Grenze. Das arithmetische Mittel aller Messwerte ist als Quadrat dargestellt.

Als statistisches Signifikanzniveau wurde, wenn keine Bonferroni-Korrektur angewandt wurde, ein p-Wert von 0,05 festgelegt.

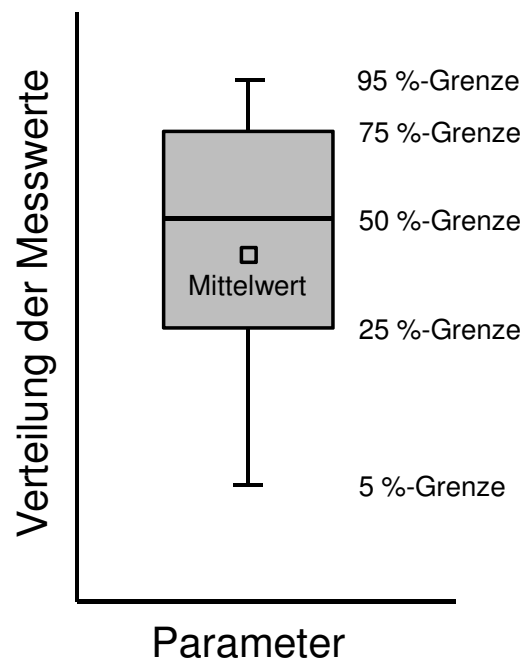


Abbildung 6: Exemplarischer Aufbau eines Boxcharts mit statistischen Kennzahlen.

IV ERGEBNISSE

1 Versuche zur Induktion der mammären

Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS

Im Rahmen des Teilprojekts „Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS“ wurde untersucht, ob eine kurzzeitige (30minütige) auf die Zitzenzisterne beschränkte Exposition mit 10 µg LPS in 1 ml steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung ausreichend ist, um eine immunmodulatorische Reaktion der Milchdrüse zu induzieren (Versuch „Cl_L“, siehe III.2.2). Mit einer nachfolgenden experimentellen Infektion mit 500 CFU *E. coli* 1303 wurde überprüft, ob sich eine Endotoxintoleranz entwickelt hatte, die das Euterviertel vor einer schweren Entzündungsreaktion schützte. Vergleichend wurden drei weitere Zitzen ebenfalls für 30 min 10 µg LPS ausgesetzt, ohne dass jedoch die Zitzen zuvor abgeklemmt wurden (Versuch „L“, siehe III.2.2). Milch der unbehandelten Viertel diente als Vergleich. Abbildung 2 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau.

Ob die Zitzenklemme selbst einen Entzündungsreiz darstellt und den SCC des Viertelgemelks beeinflusst, wurde im Versuch „Cl“ (Clamp, Klemme; n=3) überprüft. Die Auswirkungen des alleinigen Abklemmens der Zitzenzisterne auf die Zellzahl in der Milch des betroffenen Viertels wurden unmittelbar nach dem Abklemmen, sowie nach 12, 24 und 36 h aus dem Hauptgemelk bestimmt. Keines der drei Tiere zeigte eine signifikant veränderte Zellzahl (Daten nicht gezeigt).

1.1 Effekte der kurzfristigen und lokal begrenzten LPS-Exposition

In den Versuchsgruppen „Cl_L“ und „L“ („Cl_L“ = Clamp/LPS: LPS-Infusion mit aufgesetzter Zitzenklemme; „L“ = LPS: LPS-Infusion ohne aufgesetzte Klemme) erfolgte eine 30minütige LPS-Exposition im Bereich der Zitze (siehe III.2.4.3). Anschließend wurde das Euter vollständig ausgemolken.

1.1.1 Allgemeinbefinden

Verhalten, Futteraufnahme, Herzfrequenz und Pansenmotorik als Parameter für das Allgemeinbefinden wurden jeweils unmittelbar vor der LPS-Behandlung und danach in 60minütigem Abstand überwacht. Ab dem Zeitpunkt 12 h *p. infus.* wurde das Untersuchungsintervall auf 12 h erweitert. Im gesamten Versuchszeitraum über 72 h zeigte keines der „Cl_L“-Tiere ein gestörtes Allgemeinbefinden.

Bei einem Tier der Versuchsgruppe „L“ war die Herzfrequenz zum Zeitpunkt 6 h erhöht (> 90/min). Das Tier fraß nicht mehr und war lethargisch. Zehn Stunden nach LPS-Applikation war das Allgemeinbefinden wieder ungestört. Bei den beiden anderen Tieren dieser Gruppe wurde keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens beobachtet.

1.1.2 Rektale Körpertemperatur

Die Messung der rektalen Körpertemperatur fand zu denselben Zeitpunkten statt wie die Untersuchung des Allgemeinbefindens (siehe IV.1.1.1).

Die LPS-Vorbehandlung verursachte in der Gruppe „Cl_L“ keine statistisch signifikante Veränderung der Körpertemperatur. Bei keinem Tier wurde die Fiebergrenze von 39,3°C überschritten. Die Tiere der Gruppe „L“ dagegen reagierten einheitlich mit einem deutlichen und signifikanten Anstieg der rektal gemessenen Körpertemperatur ($p = 0,025$). Das Maximum wurde nach 6 h *p. infus.* erreicht und betrug im Mittel $40,1 \pm 0,83^\circ\text{C}$ (MW \pm SEM). Neun Stunden *p. infus.* waren physiologische Werte wieder erreicht (siehe Abbildung 7).

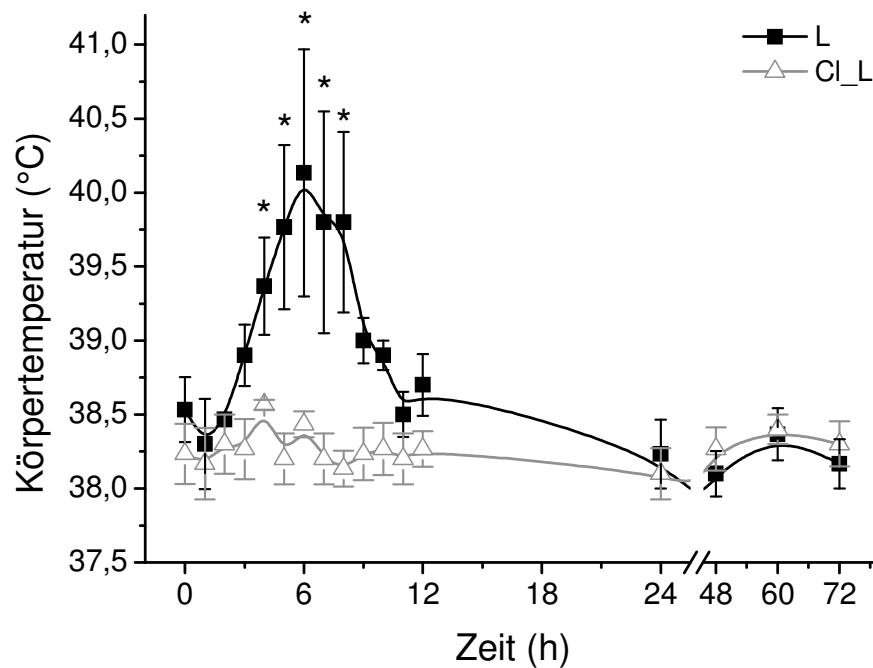


Abbildung 7: Dynamik der rektal gemessenen Körpertemperatur nach 30minütiger LPS-Exposition

Die Ergebnisse sind dargestellt als MW \pm SEM.

* = statistische Unterschiede zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 μ g LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min ($n = 3$); „Cl_L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 μ g LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne ($n = 3$).

1.1.3 Lokale Veränderungen am Euter

Die lokalen Veränderungen am Euter wurden adspektorisch und palpatorisch zu den Zeitpunkten der Körpertemperaturmessung beurteilt. Zusätzlich wurde das Drüsenparenchym unmittelbar nach dem Melken sorgfältig durchtastet. Lediglich ein Tier der Gruppe „L“ zeigte bereits 3 h *p. infus.* eine deutliche Induration, Ödematisierung und Schmerzhaftigkeit des mit LPS behandelten Viertels. Diese Veränderungen hielten bis zum Zeitpunkt 36 h *p. infus.* an. Bei allen anderen Tieren der Gruppe „L“ blieben die Viertel trotz LPS-Vorbehandlung adspektorisch und palpatorisch unverändert. In Gruppe „Cl_L“ waren die Zitzen 3 h nach LPS-Exposition geringgradig derber und wärmer sowie geringgradig schmerzempfindlicher. Die Untersuchungen des Drüsenparenchyms brachten über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg keine von der Norm abweichenden Befunde (siehe Abbildung 8).

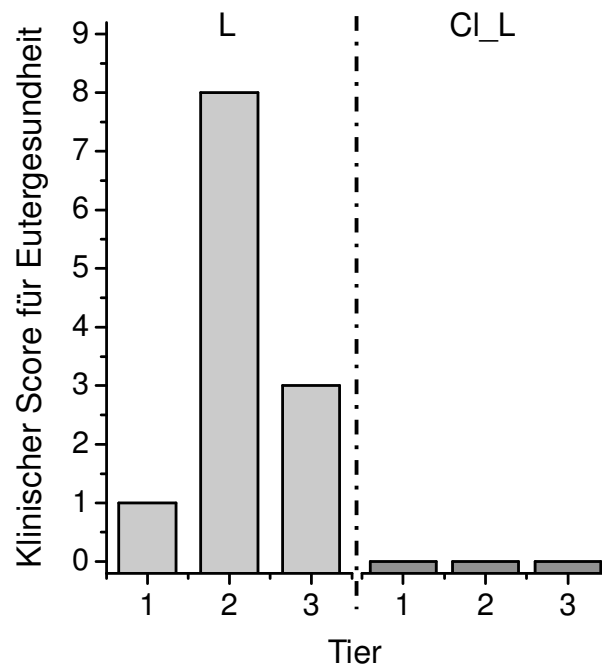


Abbildung 8: Klinische Veränderungen am Euter über 72 h nach LPS-Vorbehandlung

Dargestellt sind die im Zeitraum von 72 h nach LPS-Vorbehandlung zugeteilten maximalen Bewertungspunkte für die Parameter Sekretbeschaffenheit, Schwellung, Induration, Oberflächentemperatur, Schmerzhaftigkeit, Ödematisierung.

Abkürzungen: „L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min (n = 3); „Cl_L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne (n = 3).

1.1.4 Sekretbefund nach LPS-Infusion

Zu den Melkzeiten wurden die ersten Milchstrahlen in einer Viertelgemelkschale aufgefangen und makroskopisch beurteilt. Die Einteilung des Sekretbefundes in Kategorien erfolgte nach dem in Tabelle 5 beschriebenen Punktesystem. In der Gruppe „Cl_L“ blieb die Milchbeschaffenheit über den Zeitraum von 72 h unverändert ohne besonderen Befund.

Wie die Daten in Tabelle 6 zeigen, war das Milchsekret bei zwei Tieren der Gruppe „L“ bereits nach 12 h mittelgradig bis hochgradig verändert. Flockenbildung konnte in gering- bis mittelgradiger Ausprägung bei jedem Tier dieser Gruppe beobachtet werden.

Tabelle 6: Milchsekretbefunde nach LPS-Infusion

Zeit <i>p. infus</i> (h)	Gruppe „L“			Gruppe „Cl_L“		
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 1	Tier 2	Tier 3
0	0	0	0	0	0	0
12	0	2	3	0	0	0
24	1	2	0	0	0	0
36	0	3	1	0	0	0
48	0	2	1	0	0	0
60	0	2	0	0	0	0
72	0	2	1	0	0	0

Die Milchsekretbefunde wurden nach folgendem Score-System für Sekretveränderungen bewertet: 0 = o. b. B., keine makroskopisch erkennbaren Veränderungen; 1 = Milchcharakter erhalten, einige kleine Flocken; 2 = Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken; 3 = Milchcharakter verloren, serumartiges Sekret.

Abkürzungen: „L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min (n = 3); „Cl_L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne (n = 3); *p. infus.* = *post infusionem*.

1.1.5 Somatische Zellzahl (SCC)

Nach LPS-Inokulation wurde das Euter inklusive Residualgemelk ausgemolken. Aus dem Hauptgemelk wurde der SCC auf Viertelebene bestimmt. Der SCC lag vor LPS-Applikation bei den Versuchsvierteln in Gruppe „L“ bei 36 (25 - 58)*10³ Zellen/mL (Median, IQR) und in Gruppe „Cl_L“ bei 59 (27 - 124)*10³ Zellen/mL (Median, IQR). Die Kontrollviertel hatten eine Zellzahl von durchschnittlich 42 (36 - 110)*10³ Zellen/mL (Median, IQR) in Gruppe „L“ bzw. 56 (41 - 110)*10³ Zellen/mL (Median, IQR) in „Cl_L“ (siehe Abbildung 9).

Die Tiere der Gruppe „L“ zeigten auf die LPS-Infusion hin einen raschen Zellinflux ins infizierte Viertel, der den SCC zum Zeitpunkt 24 h *p. infus.* auf Werte von 9,99 (9,99 - 29,9) *10⁶ Zellen/mL Milch (Median, IQR) steigen ließ (siehe Abbildung 9, Bildteil A). Die darauffolgenden Messwerte zeigten eine kontinuierliche Abnahme des SCC. Zum Zeitpunkt 72 h nach LPS-Vorbehandlung lag der SCC-Wert bei durchschnittlich 680 (580 - 4032) *10³ Zellen/mL Milch (Median, IQR). In dieser Gruppe hatte die LPS-Infusion einen signifikanten Effekt auf den SCC-Verlauf: Zu den Zeitpunkten 12 h bis einschließlich 60 h *p. infus.* lag der SCC-Wert der infizierten Viertel signifikant höher ($p < 0,05$) als derjenige der

Kontrollviertel (siehe Abbildung 9, Bildteil A).

In der Gruppe „Cl_L“ war nur ein geringgradiger Anstieg der Milchzellzahl zu verzeichnen, der bereits nach 12 h seinen Höhepunkt bei einem Wert von 0,55 (0,30 - 2,63) *10⁶ Zellen/mL Milch (Median, IQR) erreichte. Zu diesem Zeitpunkt bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem behandelten und den unbehandelten Vierteln ($p < 0,05$); zu den darauffolgenden Messpunkten war dies nicht der Fall. Nach 72 h war der Ausgangswert nahezu wieder erreicht. Über den gesamten Zeitraum betrachtet war die Entwicklung der Milchzellzahl der infizierten und Kontrollviertel der Gruppe „Cl_L“ nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 9, Bildteil B).

Beim Gruppenvergleich ergab die statistische Analyse (Test: Mixed Model; siehe III.2.13) einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den SCC-Verläufen der behandelten Viertel der Gruppe „L“ und denjenigen der Gruppe „Cl_L“ (siehe Abbildung 9).

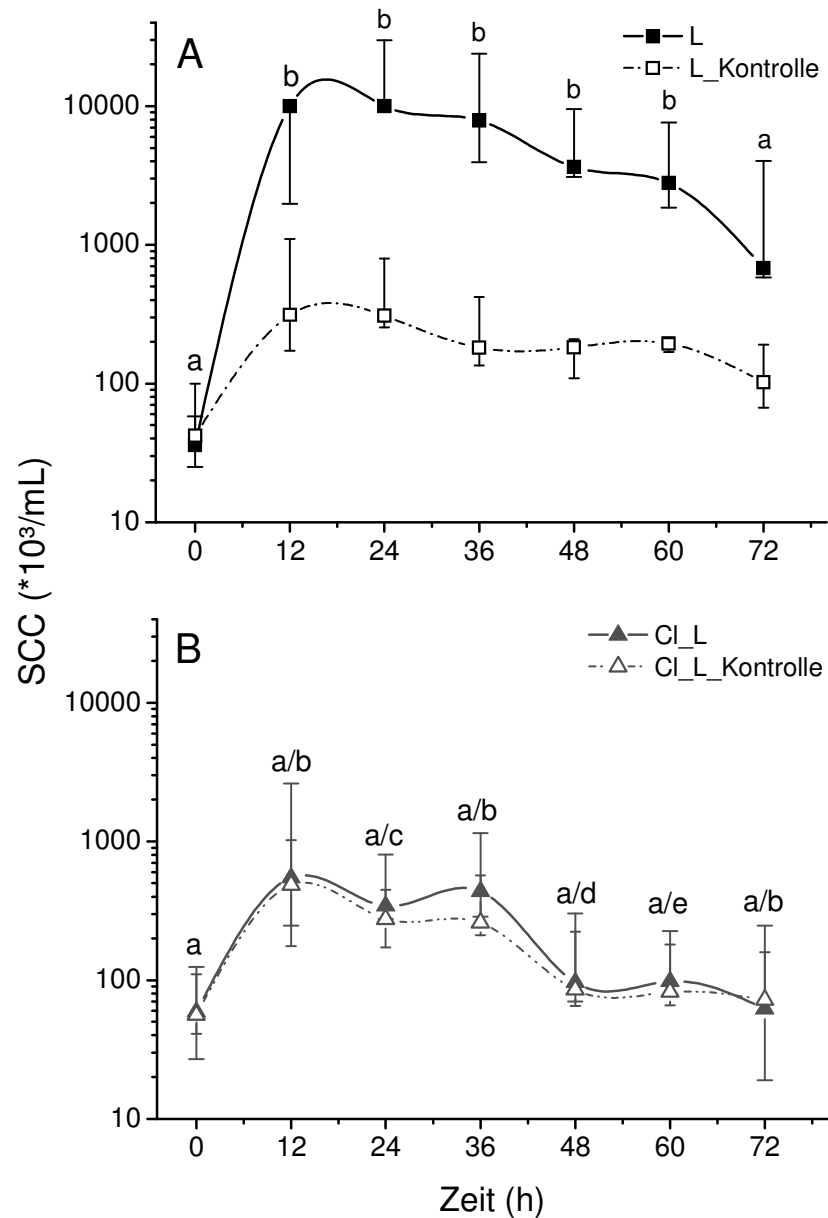


Abbildung 9: Dynamik der somatischen Zellzahl (SCC) in der Milch von LPS-exponierten Eutervierteln

Dargestellt ist der SCC-Verlauf (Median \pm IQR) in der Milch der LPS-behandelten Viertel und der Kontrollviertel in den Gruppen „L“ (Bildteil A) und „Cl_L“ (Bildteil B). Die Tieranzahl in beiden Gruppen betrug jeweils $n = 3$. Unterschiedliche Buchstaben = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$, Test: Mixed Model) zwischen den LPS-behandelten Vierteln der Gruppen „L“ und „Cl_L“.

Abkürzungen: „L“ = LPS-Vorbehandlung mit $10 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min; „Cl_L“ = LPS-Vorbehandlung mit $10 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne; „L_Kontrolle“ und „Cl_L_Kontrolle“ = Kontrollviertel der jeweiligen Gruppe.

1.2 Effekte einer kurzzeitigen intrazisternalen oder intramammären LPS-Behandlung auf eine nachfolgende experimentelle Infektion mit *E. coli*

Um zu prüfen, ob die unter III.2.4.3 beschriebene kurzzeitige intramammäre oder intrazisternale LPS-Exposition einen die Entzündung abschwächenden und schützenden Effekt gegenüber einer nachfolgenden bakteriellen Infektion hatte, wurden die mit LPS behandelten Viertel 72 h nach LPS-Vorbehandlung mit 500 CFU *E. coli* infiziert. Die lokalen und systemischen Reaktionen der Tiere wurden daraufhin für weitere 48 h überwacht.

1.2.1 Allgemeinbefinden

Die Versuchstiere wurden nach experimenteller *E. coli*-Infektion in regelmäßigen Abständen (alle 2 h) untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Verhalten, Futteraufnahme, Herzfrequenz und Pansenmotorik gelegt. In den 48 h *p. infect.* zeigte keines der Tiere der Gruppe „Cl_L“ und der Gruppe „L“ ein gestörtes Allgemeinbefinden.

1.2.2 Rektale Körpertemperatur

Die rektale Körpertemperatur wurde in den ersten 18 h nach *E. coli*-Infektion alle 2 h gemessen. Im Zeitraum 18 bis 24 h *p. infect.* wurde das Messintervall auf 3 h erweitert. Danach wurde der Temperaturverlauf alle 12 h dokumentiert (siehe Abbildung 10).

Die Tiere der Gruppe „L“ zeigten bis 24 h *p. infect.* keine Erhöhung der rektalen Körpertemperatur über die Fiebergrenze von 39,3°C hinaus. Die Messwerte lagen nach 12 h bei 38,3 (37,6 - 38,6) °C (Median, IQR). Zum Zeitpunkt 21 h war jedoch bei einem Tier die Temperatur auf 40,9°C angestiegen, die nach zwei weiteren Stunden wieder in den physiologischen Bereich abfiel (siehe Abbildung 10). Bis zum Ende des Versuches nach 48 h wurde keine weitere Temperaturerhöhung bei den Tieren beider Gruppen verzeichnet. Auch in der Gruppe „Cl_L“ hatte nur eines der drei Tiere eine Fieberphase, die 15 h *p. infect.* bei 41,0°C ihren Gipfel erreichte. Zum Zeitpunkt 18 h war die Temperatur wieder auf 38,8°C gesunken.

Die *E. coli*-Inokulation führte innerhalb der beiden Gruppen nicht zu statistisch signifikanten Veränderungen im Temperaturverlauf über den Beobachtungszeitraum von 48 h. Der Vergleich der Werte zwischen den beiden Versuchsgruppen ergab lediglich zu den Zeitpunkten 15 und 16 h *p. infect.* statistisch signifikant un-

terschiedliche Werte ($p < 0,05$) der rektalen Körpertemperatur (siehe Abbildung 10).

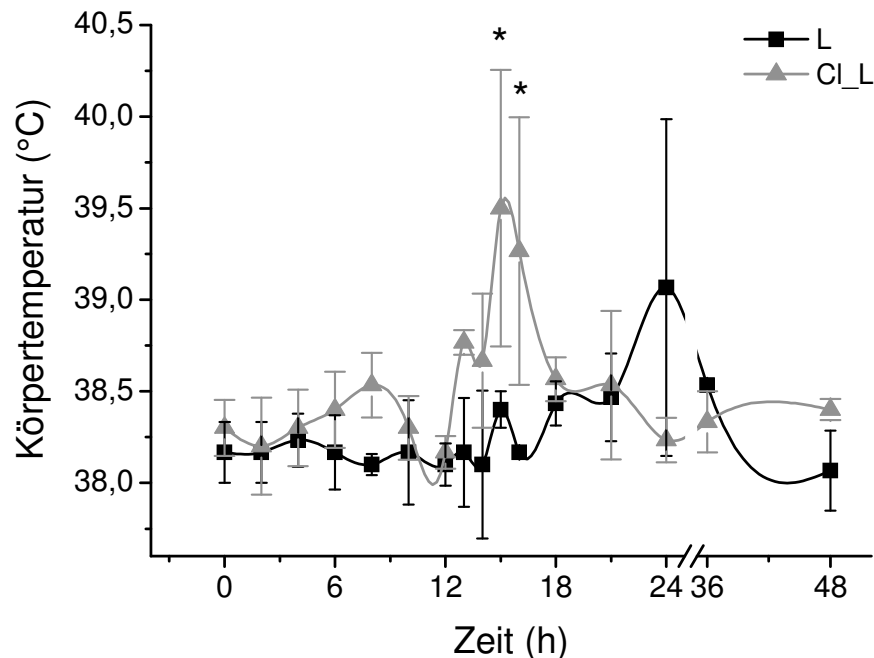


Abbildung 10: Dynamik der Körpertemperatur nach experimenteller *E. coli* Infektion in Abhängigkeit von der Art der LPS-Vorbehandlung

Dargestellt ist der Verlauf der rektal gemessenen Körpertemperatur nach *E. coli*-Infektion (Median, IQR). Den Tieren wurden 72 h vor der Infektion 10 µg LPS intrazisternal oder intramammär appliziert. Die Gruppengröße betrug jeweils $n = 3$.

* = signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p < 0,05$)

Abkürzungen: „L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min; „CI_L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne.

1.2.3 Lokale klinische Effekte

Sowohl die Tiere der Gruppe „CI_L“ als auch die der Gruppe „L“ zeigten nach *E. coli*-Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten entzündliche Veränderungen am infizierten Viertel. In Gruppe „CI_L“ waren bei einem Tier 12 h *p. infect.* deutliche lokale Entzündungssymptome festzustellen: Das Viertel war vermehrt warm, hochgradig geschwollen und das Parenchym mittelgradig induriert. Dieser Zustand hielt bis 48 h *p. infect.* an. Ein zweites Tier zeigte adspektorisch und palpatorisch keine erkennbaren Veränderungen und bei dem dritten war das Viertel 36 h *p. infect.* geringgradig fester.

Die klinischen Bilder der Tiere der Gruppe „L“ stellten sich sehr ähnlich dar. Ein

Tier zeigte nach 24 h Zeichen einer akuten Mastitis (mittelgradige Induration und mittelgradige Schwellung), während die anderen beiden kein bzw. nur ein geringgradig verändertes Viertel aufwiesen.

Einhergehend mit diesen Befunden war auch die Sekretbeschaffenheit je nach Tier und Zeitpunkt unterschiedlich. In beiden Gruppen war das Milchsekret je eines Tieres unverändert, je zwei Tiere hatten mittelgradig bis hochgradig gestörte Milchsekretion mit Flockenbildung bis zu serumartigem Sekret.

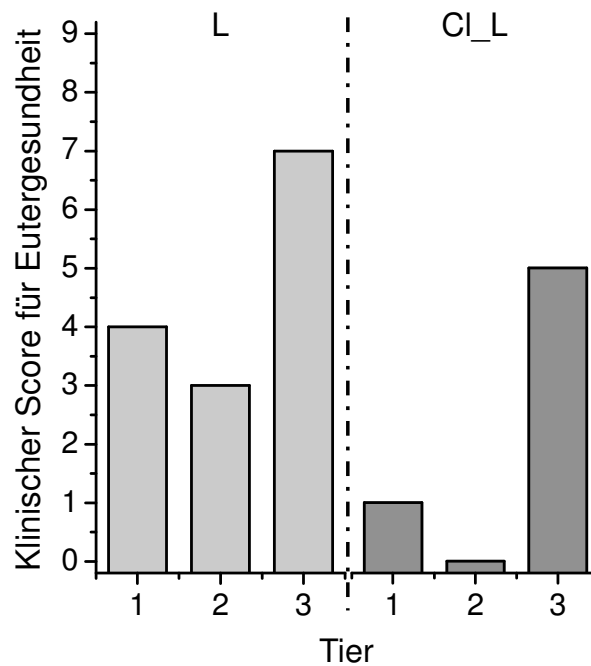


Abbildung 11: Lokale klinische Veränderungen am *E. coli*-infizierten Euterviertel nach LPS-Vorbehandlung

Dargestellt sind die im Zeitraum von 48 h nach experimenteller *E. coli*-Infektion zugeteilten Punkte nach dem Score-System für Eutergesundheit (siehe Tabelle 5).

Abkürzungen: „L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min; „Cl_L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne.

1.2.4 Somatische Zellzahl der Milch

Die Zellzahl wurde alle 12 h aus dem Hauptgemelk der einzelnen Viertel bestimmt und dokumentiert.

Die LPS-infundierten Viertel der Gruppe „L“ wiesen zum Zeitpunkt der Infektion einen höheren SCC-Ausgangswert in der Milch auf als die der Gruppe „Cl_L“. Innerhalb der Gruppen ergaben statistische Analysen keine signifikanten Veränderungen des SCC zu den jeweiligen Zeitpunkten nach *E. coli*-Infektion. Ebenso

waren die Zellzahlverläufe im Vergleich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abbildung 12).

Betrachtet man die Reaktionen der einzelnen Tiere, fällt auf, dass bei einem Tier der Gruppe „Cl_L“ die Infektion bei einem Ausgangszellgehalt von $248 \cdot 10^3$ Zellen/mL Milch stattfand, während der SCC der anderen beiden zum gleichen Zeitpunkt bei 62 und $19 \cdot 10^3$ Zellen/mL lag. Das erstgenannte Tier zeigte bei den nachfolgenden Messungen keine Veränderungen im Zellgehalt der Milch. Beim zweiten Versuchstier war der SCC bereits nach 12 h *p. infect.* auf über $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch und beim dritten nach 24 h auf $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL Milch angestiegen.

In Gruppe „L“ setzte die SCC-Erhöhung später ein: Bei zwei der drei Tiere aus Gruppe „L“ war der SCC-Wert der Milch nach 36 h bzw. nach 48 h *p. infect.* auf $10 \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch angestiegen. Beim dritten Versuchstier, das auf die LPS-Behandlung mit einer signifikanten SCC-Erhöhung reagiert hatte, wurden auf die *E. coli*-Infektion folgenden Melkzeiten sinkende Zellzahlen gemessen.

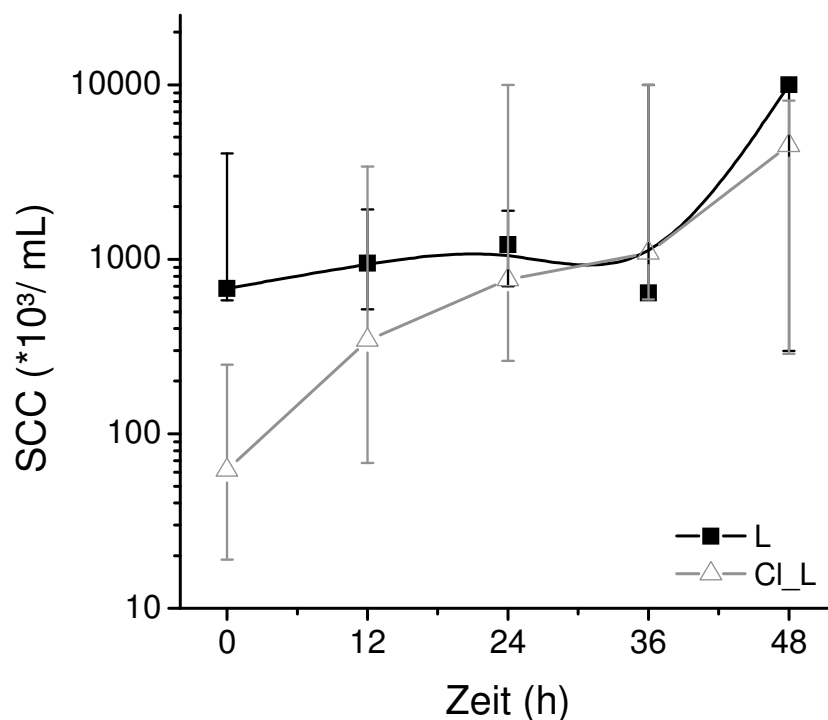


Abbildung 12: Verlauf der somatischen Zellzahl (SCC) der Milch nach experimenteller *E. coli*-Infektion in den Versuchsgruppen „Cl_L“ und „L“

In dieser Grafik ist die Dynamik der Zellzahl der mit *E. coli* infizierten Vierteln über einen Zeitraum von 48 h *p. infect.* dargestellt (Median, IQR).

Abkürzungen: „L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min; „Cl_L“ = LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne.

2 Versuche zur intramammär induzierten Endotoxintoleranz bei Kühen im puerperalen Zeitraum

Bei Kühen in der Mitte der Laktation konnte gezeigt werden, dass eine intramammäre LPS-Vorbehandlung in einer Konzentration von 1 µg LPS/Viertel in 5 mL 0,9 %ige NaCl-Lösung ausreichend ist, um die Etablierung einer nachfolgenden experimentell induzierten *E. coli*-Infektion zu verhindern (PFISTER, 2009). In den im Folgenden dargestellten Versuchen wurde überprüft, ob dieser Effekt auch bei multiparen Kühen im geburtsnahen Zeitraum reproduzierbar ist und genutzt werden kann, um den klinischen Verlauf einer experimentell induzierten *E. coli*-Mastitis zu beeinflussen.

2.1 Effekte der alleinigen LPS-Infusion

Die LPS-Vorbehandlung wurde bei den puerperalen, multiparen Tieren der Gruppe „pL72EC“ 36 h oder 48 h *p. p.* vorgenommen (zum Versuchsaufbau siehe Abbildung 3). Als Dosis wurde wie bei Pfister (2009) 1 µg LPS gelöst in 5 mL steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung pro Euterviertel gewählt. Im Folgenden sind die messbaren Auswirkungen der LPS-Vorbehandlung *in vivo* dargestellt. Die Resultate in der Gruppe „pL72EC“ werden dabei mit denen der primiparen Tiere in der Mitte der Laktation der Gruppe „L72EC“ aus der genannten vorangegangenen Studie verglichen.

2.1.1 Allgemeinbefinden

Die Beurteilung der klinischen Befunde erfolgte, wie in III.2.7 beschrieben, mit Hilfe eines klinischen Scores. Bei zwei Tieren der Gruppe „pL72EC“ (n = 5) lag die Herzfrequenz während des gesamten Zeitraums (72 h) bei über 90 Schlägen/min; bei den anderen drei Tieren dieser Gruppe dagegen wurde durchgängig eine Frequenz unter diesem Wert gemessen. Verhalten, Pansenmotorik und Futterraufnahme waren bei allen „pL72EC“-Tieren unverändert. In Gruppe „L72EC“ war das Allgemeinbefinden bezüglich aller oben genannten Parameter nach der LPS-Vorbehandlung bei allen Tieren (n = 5) unbeeinflusst.

2.1.2 Rektale Körpertemperatur

Der Verlauf der rektalen Körpertemperatur der Versuchstiere wurde vom Zeitpunkt der LPS-Infusion bis 12 h *p. infus.* stündlich und daraufhin in 12stündigem

Abstand gemessen. Die Tiere der Gruppe „L72EC“ reagierten auf die LPS-Applikation mit einer Temperaturerhöhung, die zu den Zeitpunkten 6 h und 9 h *p. infus.* signifikant ($p < 0,05$) höher war als die der Gruppe „pL72EC“ (siehe Abbildung 13). In dieser Gruppe wurde die Fiebergrenze von $39,3^{\circ}\text{C}$ bei zwei der fünf Tiere zur Stunde 3 und 6 *p. infus.* überschritten. Das durchschnittliche Temperaturmaximum lag in der Gruppe „L72EC“ bei $40,0 \pm 0,59^{\circ}\text{C}$, bei „pL72EC“ dagegen bei $38,9 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$ (MW \pm SEM). Zur Stunde 24 *p. infus.* lag die Temperatur bei allen Tieren beider Gruppen wieder im Referenzbereich und stieg nicht wieder an (siehe Abbildung 13).

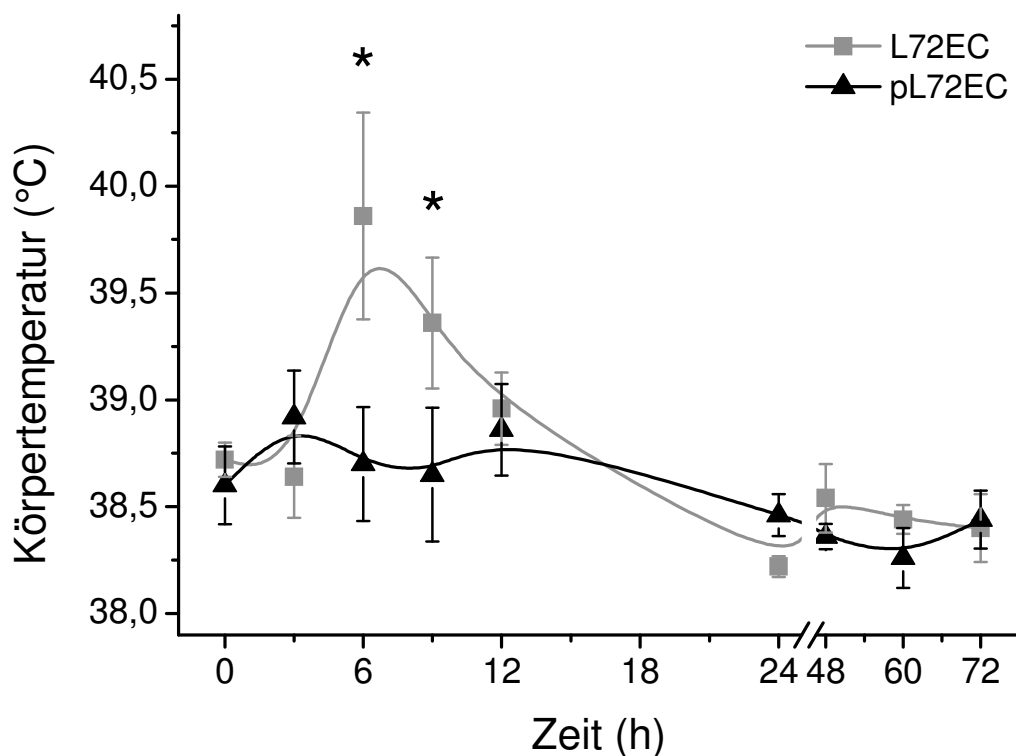


Abbildung 13: Dynamik der Körpertemperatur nach intramammärer LPS-Infusion

Der Verlauf der rektalen Körpertemperatur nach intramammärer Infusion von $1 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel zum Zeitpunkt 0 h ist dargestellt als MW \pm SEM zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

* = signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „L72EC“: mit $1 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel behandelte Erstlaktierende in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pL72EC“: multipare, mit $1 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.1.3 Blutbild

Um mögliche systemische Effekte der intramammären LPS-Infusion zu erfassen, wurde die Zahl der zirkulierenden Leukozyten im venösen Blut alle 12 h bestimmt. Da es deutliche interindividuelle Unterschiede der jedoch jeweils physio-

logischen Ausgangswerte gab, wurden die Leukozytenzahlen zum Zeitpunkt 0 h – also unmittelbar vor LPS-Vorbehandlung – als Ausgangswert ausgewählt, mit dem Differenzen (Δ) mit den darauffolgenden Ergebnissen gebildet wurden (siehe Abbildung 14). Der Verlauf des Leukozytengehalts ($\cdot 10^3/\text{mL}$) im Blut der Kühe in der Mitte der ersten Laktation veränderte sich über den Zeitraum von 72 h *p. infus.* nicht statistisch signifikant. Die Leukozytenzahl im Blut der Gruppe „pL72EC“ veränderte sich dagegen statistisch signifikant: Zu den Zeitpunkten 12, 24, 48 und 72 h nach LPS-Vorbehandlung waren die Durchschnittswerte der Zellzahlen signifikant niedriger als zum Zeitpunkt 0 h ($p < 0,008$). Der Vergleich der Leukozytengänge zwischen den beiden Gruppen ergab lediglich eine statistisch signifikante Differenz zum Zeitpunkt 72 h ($p < 0,05$; siehe Abbildung 14).

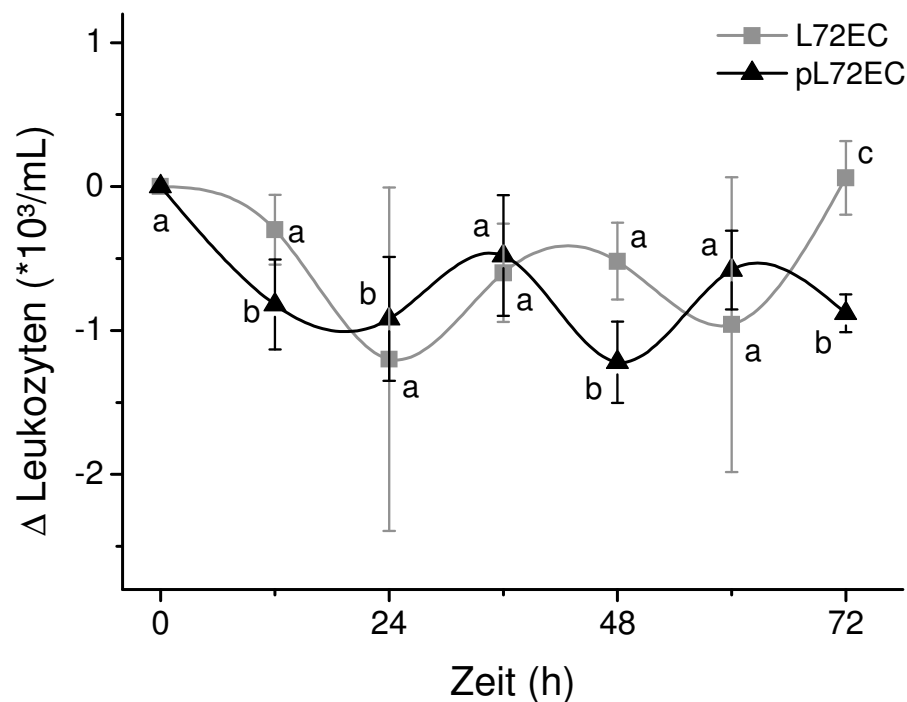


Abbildung 14: Veränderungen der Leukozytenzahl im Blut nach intramammärer LPS-Infusion

Der Ausgangswert ist die durchschnittliche Blutleukozytenzahl in der jeweiligen Gruppe zum Zeitpunkt 0 h. Die nachfolgenden Werte ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) sind als Differenzen (Δ) vom Ausgangswert dargestellt. Negative Werte bedeuten einen Abfall, positive eine Zunahme des Leukozytenganges.

Unterschiedliche Buchstaben: statistisch signifikante Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten innerhalb der Gruppen (nach Bonferroni-Korrektur: $p < 0,008$) und zwischen den Gruppen ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „L72EC“: mit $1 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel behandelte Erstlaktierende in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pL72EC“: multipare, mit $1 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.1.4 Lokale klinische Veränderungen am Euter

LPS, intramammär appliziert, induziert eine transiente lokale Entzündungsreaktion. Im Folgenden sind die lokalen Effekte der Behandlung jedes Eutervierts mit 1 µg LPS/Eutervierts gelöst in 5 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung dargestellt (siehe III.2.8).

2.1.4.1 Palpatorisch und adspektorisch erfassbare Veränderungen

In der puerperalen Gruppe „pL72EC“ waren die Eutervierts 12 h *p. infus.* 1,5fach geschwollen und induriert. Bei zwei Tieren konnte eine Ödematisierung (< 50 %) der Eutervierts festgestellt werden. Lediglich bei einem Tier dieser Gruppe war die Oberflächentemperatur erhöht. Insgesamt gesehen führte die LPS-Vorbehandlung in der Gruppe „pL72EC“ zu einer geringgradigen Entzündung.

Die Eutervierts der Tiere aus Gruppe „L72EC“ zeigten über einen Zeitraum von 36 h bis maximal 60 h *p. infus.* ebenfalls geringgradig entzündliche Veränderungen. Dabei war das Parenchym geringgradig bis mittelgradig induriert, Ödeme und lokale Temperaturerhöhungen traten jedoch nicht auf (Daten nicht gezeigt).

2.1.4.2 Somatischer Zellgehalt der Milch

Ein Parameter in der Überwachung der lokalen Entzündungsreaktion nach LPS-Infusion ist der Milchzellgehalt (SCC). Dieser wurde vor LPS-Vorbehandlung (0 h) und zu allen folgenden Melkzeiten auf Viertelebene aus dem Hauptgemelk bestimmt. Der Ausgangszellgehalt war in den beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. Während der SCC in Gruppe „pL72EC“ im Mittel 183,85 (119,5 - 475,5)*10³ Zellen/mL (Median, IQR) betrug, war er bei „L72EC“ bei 16,5 (10,5 - 31)*10³ Zellen/mL (Median, IQR). In beiden Gruppen wurde der Maximalwert zur Stunde 12 *p. infus.* gemessen. Die folgenden Messwerte zeigten einen kontinuierlichen Abfall des SCC (siehe Abbildung 15).

Der Gruppenvergleich der logarithmierten SCC-Werte zu den einzelnen Zeitpunkten ergab jeweils statistisch signifikante Unterschied zu allen Zeitpunkten, außer 12 h *p. infus.* ($p < 0,05$; siehe Abbildung 15). Die statistische Analyse (Test: Mixed Model) der Werte im Verlauf über 72 h nach LPS-Infusion zeigte keinen signifikanten Unterschied auf.

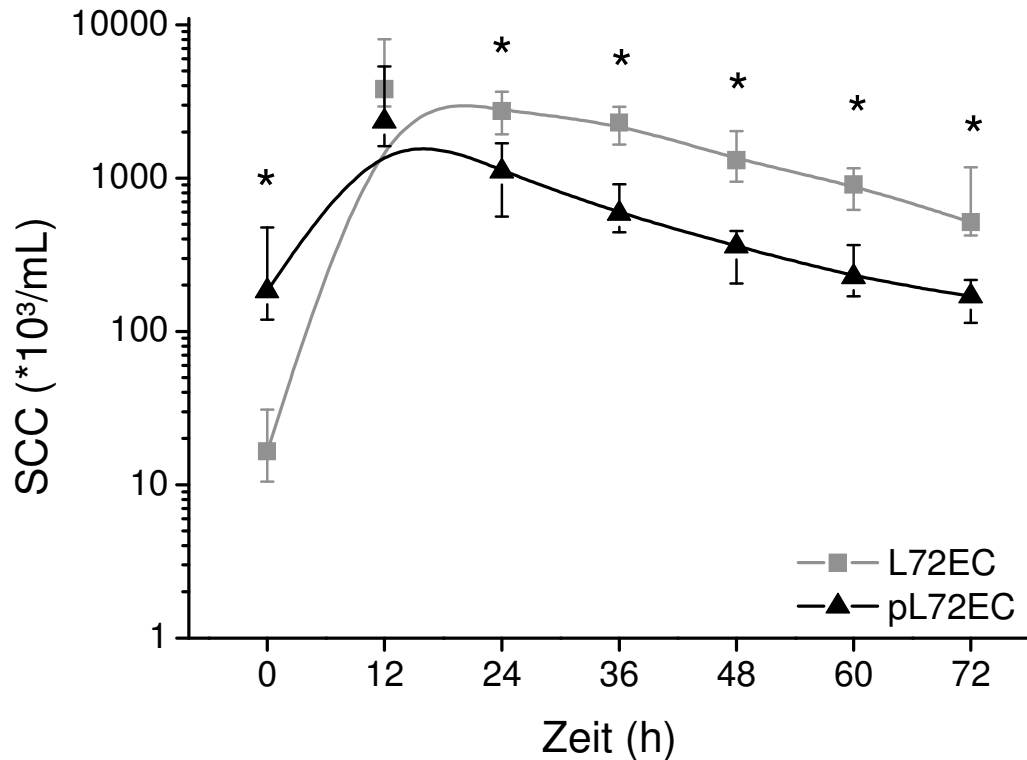


Abbildung 15: Dynamik des Milchzellgehalts nach LPS-Infusion

Der SCC wurde alle 12 h aus der Hauptgemelksfraktion auf Viertelebene bestimmt. Die LPS-Infusion erfolgte bei 0 h. Zwei Gruppen wurden verglichen: „L72EC“ und „pL72EC“. Die SCC-Werte (Median, IQR) wurden logarithmiert dargestellt. * = Statistisch signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „L72EC“: mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte Erstlaktierende in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pL72EC“: multipare, mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$); „SCC“: somatic cell count.

2.1.4.3 Milchleistung

Mit Hilfe der Vierviertelmelkmaschine konnte die Milchproduktion jedes Euterviertels bestimmt werden. Die Versuchstiere wurden alle 12 h gemolken und die ermolkene Milchmenge dokumentiert. Um den Verlauf der Milchleistung nach LPS-Vorbehandlung nachvollziehen zu können, wurde die Menge des Gemelks unmittelbar vor der LPS-Infusion als Ausgangswert verwendet. Die nachfolgenden Werte wurden als Differenz zum Ausgangswert berechnet (Δ Milchleistung in L). In der Gruppe „L72EC“ konnte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach LPS-Infusion im Vergleich zum Ausgangswert kein signifikanter Unterschied in der Milchleistung festgestellt werden. Dagegen zeigte sich in der Gruppe „pL72EC“ über den Zeitraum von 72 h *p. infus.* eine signifikante Steigerung der Milchleistung ($p < 0,05$).

Zu den Versuchszeitpunkten 48 und 72 h *p. infus.* zeigten die Tiere der Gruppe

„pL72EC“ im Mittel eine signifikant höhere Zunahme in der Milchleistung als die der Gruppe „L72EC“ ($p < 0,05$; siehe Abbildung 16).

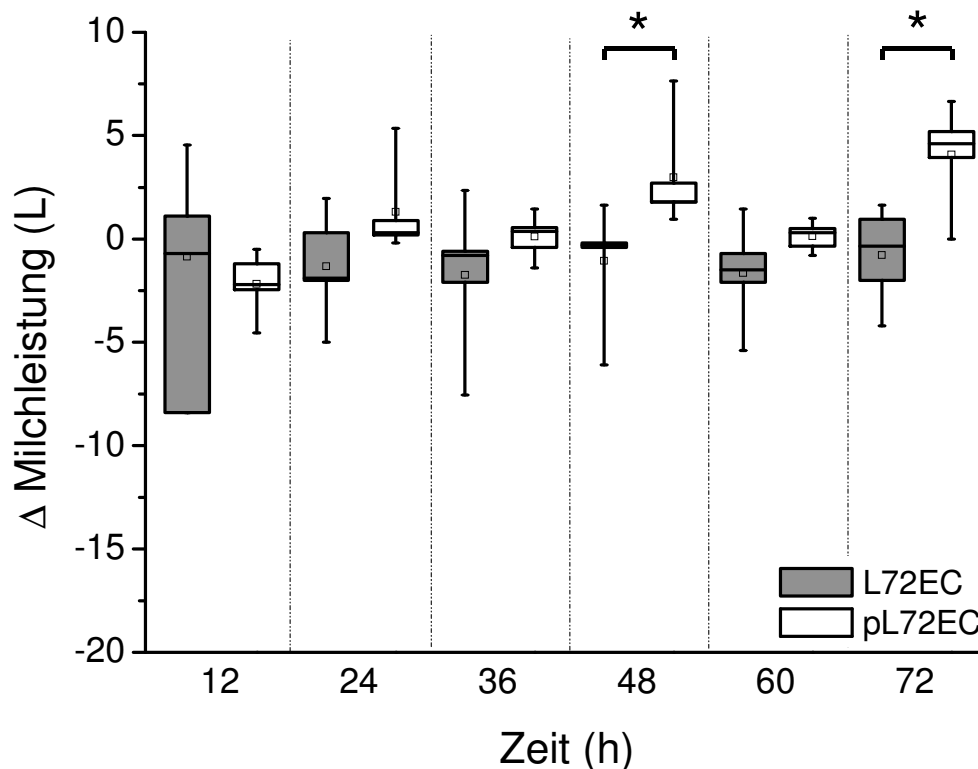


Abbildung 16: Einfluss intramammärer LPS-Infusion auf die Milchleistung

Die ermolken Menge (L) unmittelbar vor der LPS-Applikation wurde zum Ausgangswert bestimmt und gleich 0 gesetzt. Mit den darauffolgenden Werten wurde die Differenz (Δ) gebildet. Positive Werte bedeuten also eine Zunahme und negative eine Abnahme der Milchleistung im Vergleich zum Ausgangswert. Auch tageszeitabhängige Schwankungen müssen beachtet werden (0 h = morgens, 12 h = abends, usw.).

* = Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zum gleichen Zeitpunkt ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „L72EC“: mit 1 μ g LPS/Euterviertel behandelte Erstlaktierende in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pL72EC“: multipare, mit 1 μ g LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.1.4.4 Sekretveränderungen

Zu den Melkzeiten wurden die ersten ermolkenen Strahlen der Milch (Vorgemelk) in einer Vierviertelschale makroskopisch beurteilt und ihre Beschaffenheit mit Hilfe des klinischen Scores in vier Kategorien (siehe Tabelle 5) eingeteilt.

Die Sekrete aller Viertel (je $n = 20$) in beiden Gruppen waren zum Zeitpunkt unmittelbar vor LPS-Infusion (0 h) unverändert (Score 0 = o. b. B.). Die Tiere der Gruppe „L72EC“ wiesen zum Zeitpunkt 12 h *p. infus.* einige Flocken (Score 1) in 30 % ($n = 6$) der Viertelsekrete auf. Zur nächsten Melkzeit waren noch 5 % ($n = 1$) der Sekrete (Score 1) verändert. Im Gegensatz dazu sah man nach LPS-Behandlung der puerperalen Tiere („pL72EC“) lediglich zum Zeitpunkt 24 h

p. infus. in zwei Viertelgemelksproben eines Tieres (10 %) mittelgradige Veränderungen der Sekretbeschaffenheit (Score 2). Zu allen anderen Zeitpunkten war das Sekret makroskopisch unverändert (siehe Abbildung 17). Die Sekretbefunde beider Gruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich.

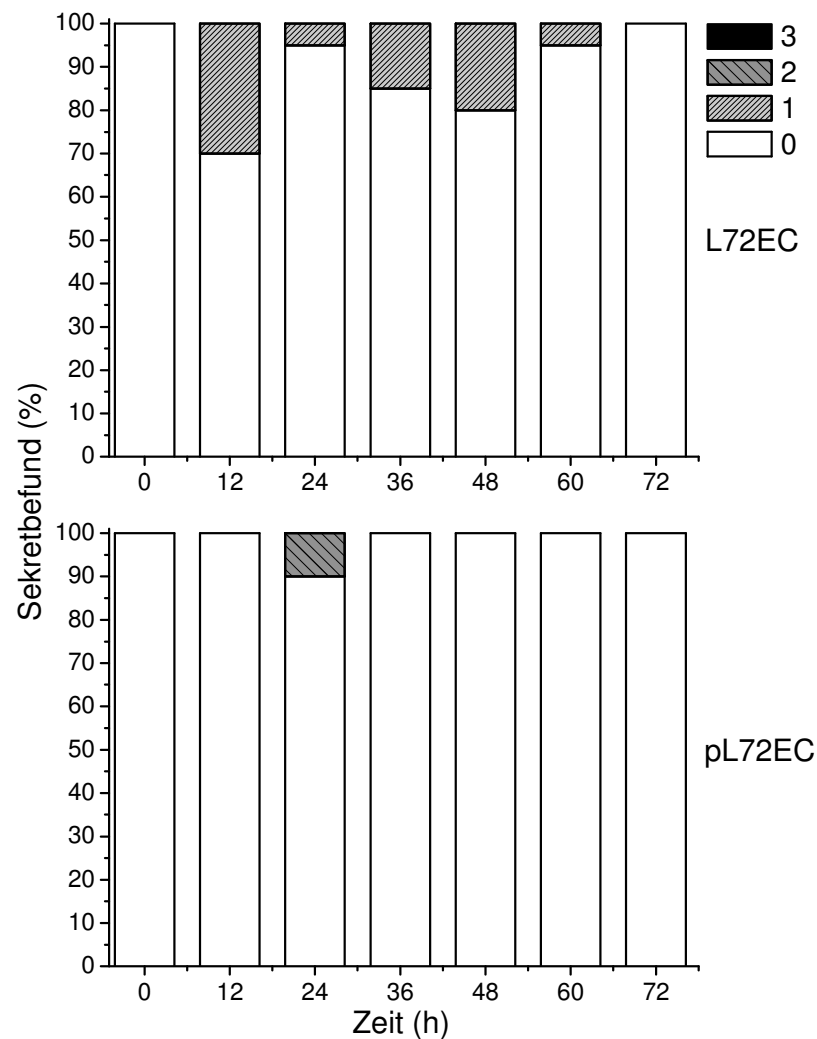


Abbildung 17: Veränderungen des Milchsekrets nach LPS-Infusion

Dargestellt ist der prozentuale Anteil makroskopisch veränderter Milchsekrete ($n = 20$ Euterviertel pro Versuchsgruppe) im Zeitraum 0-72 h nach LPS-Infusion. 0 = o. b. B., keine makroskopischen Veränderungen; 1 = Milchcharakter erhalten, einige kleine Flocken; 2 = Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken; 3 = Milchcharakter verloren, serumartiges Sekret (siehe Tabelle 5).

Abkürzungen: „L72EC“: mit $1 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel behandelte Erstlaktierende in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pL72EC“: multipare, mit $1 \mu\text{g}$ LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.1.4.5 Milchinhaltsstoffe

Für die Bestimmung der Milchinhaltsstoffe, Fett (%), Eiweiß (%), Laktose (%) und Harnstoff (mg/mL) und des pH-Werts der Milch wurden zu den Melkzeiten

(alle 12 h) Proben jedes Viertelmelks entnommen (siehe III.2.9.2). Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 72 h unterschieden sich die durchschnittlichen Fett-, Protein-, Laktose- und Harnstoffgehalte sowie die pH-Werte zwischen beiden untersuchten Versuchsgruppen signifikant ($p < 0,05$; Mixed Model). Während die beiden Parameter Harnstoff und pH-Wert über den gesamten Zeitraum in der „pL72EC“-Gruppe im Vergleich zu Gruppe „L72EC“ signifikant niedriger waren, lag der Proteingehalt bei den „pL72EC“-Tieren signifikant höher.

Die LPS-Vorbehandlung hatte auf den MilCHFettgehalt beider Gruppen keinen Einfluss. Lediglich zu den Zeitpunkten 12 h und 36 h *p. infus.* konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Der MilChharnstoffgehalt dagegen veränderte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum statistisch signifikant (für die Werte zu den Zeitpunkten 0 bis 24 h; siehe Tabelle 7). Bei den puerperalen Tieren konnten nach LPS-Infusion im Proteingehalt zu keiner Zeit signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Der Laktosegehalt in der Milch der „L72EC“-Gruppe lag zum Zeitpunkt 0 h bei 4,94 (4,8 - 5,03) % (Median, IQR) und damit signifikant höher als in Gruppe „pL72EC“ ($p < 0,05$). Die ersten Milchproben nach LPS-Infusion (12 h *p. infus.*) ergaben eine statistisch signifikante Verringerung der Laktosekonzentration in beiden Gruppen; in Gruppe „L72EC“ kam es dabei zu einem stärkeren Abfall (siehe Tabelle 7). Nach 24 h zeigte sich in beiden Gruppen wieder ein steigender Laktosegehalt, der in Gruppe „pL72EC“ stärker ausgeprägt war.

Die pH-Werte der Milchproben der Gruppe „L72EC“ waren durch die LPS-Infusion nicht beeinflusst; zu keinem Zeitpunkt gab es signifikante Veränderungen. In Gruppe „pL72EC“ war der pH-Wert 12 h *p. infus.* von 6,19 auf 6,31 angestiegen ($p < 0,05$). Dies setzte sich im ganzen Zeitraum fort, bis sich die pH-Werte beider Gruppen zum Zeitpunkt 72 h *p. infus.* auf ähnlichem Niveau befanden (pH 6,53).

In Tabelle 7 ist ein Ausschnitt der Untersuchungsergebnisse nach LPS-Infusion dargestellt (Messzeitpunkte 0, 12 und 24 h).

Tabelle 7: Effekte einer LPS-Infusion auf die Milchinhaltsstoffe

Milchinhaltsstoff	Zeit (h)	L72EC (n = 20)		pL72EC (n = 20)		<i>p</i> ¹
		Median	IQR	Median	IQR	
Fett (%)	0	3,22	1,69 - 4,02	4,40	2,87 - 4,75	0,362
	12	2,66	1,87 - 3,14	4,85	4,35 - 5,17	0,002
	24	2,77	2,55 - 3,16	4,37	3,58 - 5,07	0,053
	<i>p</i> ²	0,249		0,100		
Protein (%)	0	3,04	2,99 - 3,09	4,63	4,41 - 4,8	<0,0001
	12	3,29	3,2 - 3,39	4,44	4,36 - 4,58	<0,0001
	24	3,05	3 - 3,58	4,33	4,21 - 4,77	<0,0001
	<i>p</i> ²	<0,0001		0,199		
Laktose (%)	0	4,94	4,87 - 5,07	4,33	4,23 - 4,47	<0,0001
	12	4,56	4,45 - 4,68	4,08	4,05 - 4,16	<0,0001
	24	4,76	4,72 - 4,83	4,23	4,11 - 4,32	<0,0001
	<i>p</i> ²	<0,0001		<0,0001		
Harnstoff (mg/mL)	0	236	205,5 - 287	198	141 - 220	<0,0001
	12	327	294 - 412	212	174 - 257	<0,0001
	24	333	317 - 357	189	134 - 207	<0,0001
	<i>p</i> ²	<0,0001		0,0009		
pH	0	6,55	6,52 - 6,64	6,19	6,16 - 6,31	<0,0001
	12	6,58	6,51 - 6,59	6,31	6,26 - 6,37	<0,0001
	24	6,55	6,52 - 6,61	6,32	6,27 - 6,38	<0,0001
	<i>p</i> ²	0,075		<0,0001		

¹ Ergebnisse des statistischen Vergleichs der Gruppen „L72EC“ und „pL72EC“ zu den einzelnen Zeitpunkten.

² Ergebnisse der statistischen Analyse der Milchinhaltsstoffwerte innerhalb der jeweiligen Gruppe über den Versuchszeitraum (Mixed Model).

Abkürzungen: „L72EC“: mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (5 Tiere/n = 20 Euterviertel); „pL72EC“: multipare, mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche (5 Tiere/n = 20 Euterviertel).

2.2 Effekte einer experimentellen Infektion mit *E. coli* 72h nach LPS-Vorbehandlung

Zum Zeitpunkt 72 h nach LPS-Infusion wurden die Tiere der Gruppen „L72EC“ (n = 5) und „pL72EC“ (n = 5) intramammär mit 500 CFU *E. coli* infiziert. In der Vorbereitung wurde der SCC aller Euterviertel bestimmt. Das jeweils zellniedrigste Viertel eines Tieres wurde für die Infektion ausgewählt. Zusätzlich zu den zwei mit LPS-vorbehandelten Gruppen wurden 5 erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation („EC“) und 4 multipare Kühe im Puerperium („pEC“) infiziert, die keine LPS-Vorbehandlung erhalten hatten und damit als Kontrollgruppen dienten (zum Versuchsaufbau siehe Abbildung 3). Die Daten der Gruppen

„L72EC“ und „EC“ wurden in den Arbeiten von PFISTER (2009) und MEHNE (2010) erhoben.

2.2.1 Allgemeinbefinden

Die Parameter des Allgemeinbefindens (Futteraufnahme, Verhalten, Herzfrequenz und Pansenmotorik) der Versuchstiere nach experimenteller Infektion wurde zu den Messzeitpunkten der Körpertemperatur überwacht. Die Befunde wurden anhand des klinischen Scores (siehe Tabelle 4) mit Punkten bewertet. So konnte der Schweregrad der Störung des Allgemeinbefindens bei der experimentell induzierten *E. coli*-Mastitis beurteilt und statistisch analysiert werden (siehe Abbildung 18).

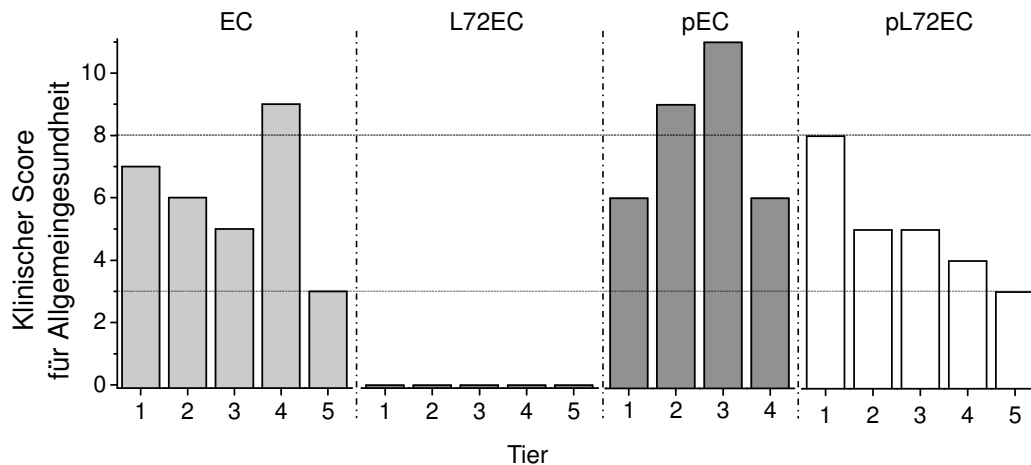


Abbildung 18: Störung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere im Zeitraum von 24 h nach *E. coli*-Infektion

Die Befunde der Untersuchungen zum Allgemeinbefinden *p. infect.* wurden anhand des Klinischen Scores (siehe Tabelle 4) mit Punkten bewertet und das Allgemeinbefinden in die drei Kategorien, nicht bis geringgradig (0-3 Punkte), mittelgradig (4-8 Punkte) oder hochgradig (9-11 Punkte) erkrankt, eingeteilt. Die Grafik zeigt die pro Tier jeder Versuchsgruppe zugeteilten maximalen Punkte über den Zeitraum von 24 h *p. infect.*

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung (n = 5); „L72EC“: mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (n = 5); „pEC“ multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung (n = 4); „pL72EC“: multipare, mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche (n = 5).

Alle erstlaktierenden Tiere (Gruppe „EC“ und „L72EC“) zeigten zum Zeitpunkt 0 h ein ungestörtes Allgemeinbefinden. In Gruppe „EC“ verschlechterte es sich innerhalb von 12 h bis zu einer mittel- bis hochgradigen Erkrankung; bis zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* hatte sich ihr Allgemeinbefinden wieder bis auf „mittel- bis geringgradig gestört“ verbessert. Die mit LPS-vorbehandelten Erstlaktierenden („L72EC“) zeigten im gesamten Zeitraum normale Futteraufnahme und physiolo-

gische Werte der untersuchten Parameter, also ungestörtes Allgemeinbefinden. In Gruppe „pEC“ war das Allgemeinbefinden bei drei der vier Tiere zum Zeitpunkt 0 h geringgradig gestört. Das Allgemeinbefinden der Tiere dieser Gruppe verschlechterte sich bis zum Zeitpunkt 12 h und war dann mittelgradig gestört. Im Zeitraum 12 bis 24 h *p. infect.* steigerte sich die Störung des Allgemeinbefindens bei zwei Tieren bis zur Kategorie „hochgradig“. In der Gruppe „pL72EC“ war bei einem Tier zum Zeitpunkt der Infektion (0 h) die Futteraufnahme reduziert. Bei allen anderen „pL72EC“-Tieren war das Allgemeinbefinden nach 12 h noch ungestört; erst im Zeitraum 12 bis 24 h *p. infect.* verschlechterte sich das Allgemeinbefinden bis zu einer mittelgradigen Störung.

Da die Höhepunkte der Störung des Allgemeinbefindens zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden, wurden die über den Zeitraum von 24 h zugeteilten maximalen Punkte im klinischen Score zur statistischen Analyse herangezogen: Während die Tiere der Gruppe „L72EC“ ein ungestörtes Allgemeinbefinden (0 Punkte) zeigten und somit auch im klinischen Score statistisch signifikant geringgradiger erkrankt waren als die drei anderen Versuchsgruppen, konnte zwischen den Versuchsgruppen „EC“, „pEC“ und „pL72EC“ kein statistisch signifikanter Unterschied in den maximal erreichten Punkten im klinischen Score festgestellt werden.

2.2.2 Rektale Körpertemperatur

Nach experimenteller Infektion eines Euterviertels wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere alle 2 h bis 18 h *p. infect.* und zu den darauf folgenden Zeitpunkten 21 und 24 h *p. infect.* rektal gemessen (siehe III.2.7). Die Körpertemperaturen der Tiere der Kontrollgruppen „EC“ und „pEC“ überschritten nach 11 bzw. 9 h *p. infect.* die Fiebergrenze von 39,3°C und erreichten ein durchschnittliches Temperaturmaximum von $41,1 \pm 0,21^\circ\text{C}$ zum Zeitpunkt 15 h („EC“) bzw. $42,05 \pm 0,06^\circ\text{C}$ (MW \pm SEM) zum Zeitpunkt 14 h („pEC“). Bei den Tieren, die im Puerperium mit LPS vorbehandelt („pL72EC“) und 72 h später mit *E. coli* infiziert wurden, lag der Fieberhöhepunkt beim Zeitpunkt 17 h mit $41,1 \pm 0,16^\circ\text{C}$ (MW \pm SEM). Im Gegensatz dazu zeigte keines der Tiere der „L72EC“-Gruppe eine Erhöhung der Körpertemperatur. Die Temperaturverläufe über 24 h *p. infect.* waren zwischen allen Gruppen signifikant unterschiedlich, sowohl zwischen den mit LPS-vorbehandelten und den jeweiligen Kontrollgruppen ohne Vorbehand-

lung, wie auch zwischen den erstlaktierenden und multiparen Kühen mit und ohne LPS-Vorbehandlung (siehe Abbildung 19). Die statistische Analyse (Test: Mann-Whitney) der maximal erreichten Körpertemperaturwerte ergab zwischen den Gruppen der erstlaktierenden Tiere statistisch signifikant höhere Temperaturmaxima in Gruppe „EC“ ($p < 0,05$). Bei den LPS-behandelten Tiergruppen („L72EC“ und „pL72EC“) wurden in Gruppe „pL72EC“ signifikant höhere rektale Körpertemperaturen gemessen ($p < 0,05$). Auch zwischen den beiden puerperalen Gruppen („pEC“ und „pL72EC“) zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied: Die Tiere der Gruppe „pEC“ erreichten mit $42,1 \pm 0,22^\circ\text{C}$ signifikant höhere Fieberwerte ($p < 0,05$) als die Tiere der Gruppe „pL72EC“ mit im Mittel $41,54 \pm 0,44^\circ\text{C}$ (MW \pm SEM). Die maximalen rektalen Körpertemperaturen der Kontrollgruppen, „EC“ und „pEC“, unterschieden sich dagegen nicht statistisch signifikant.

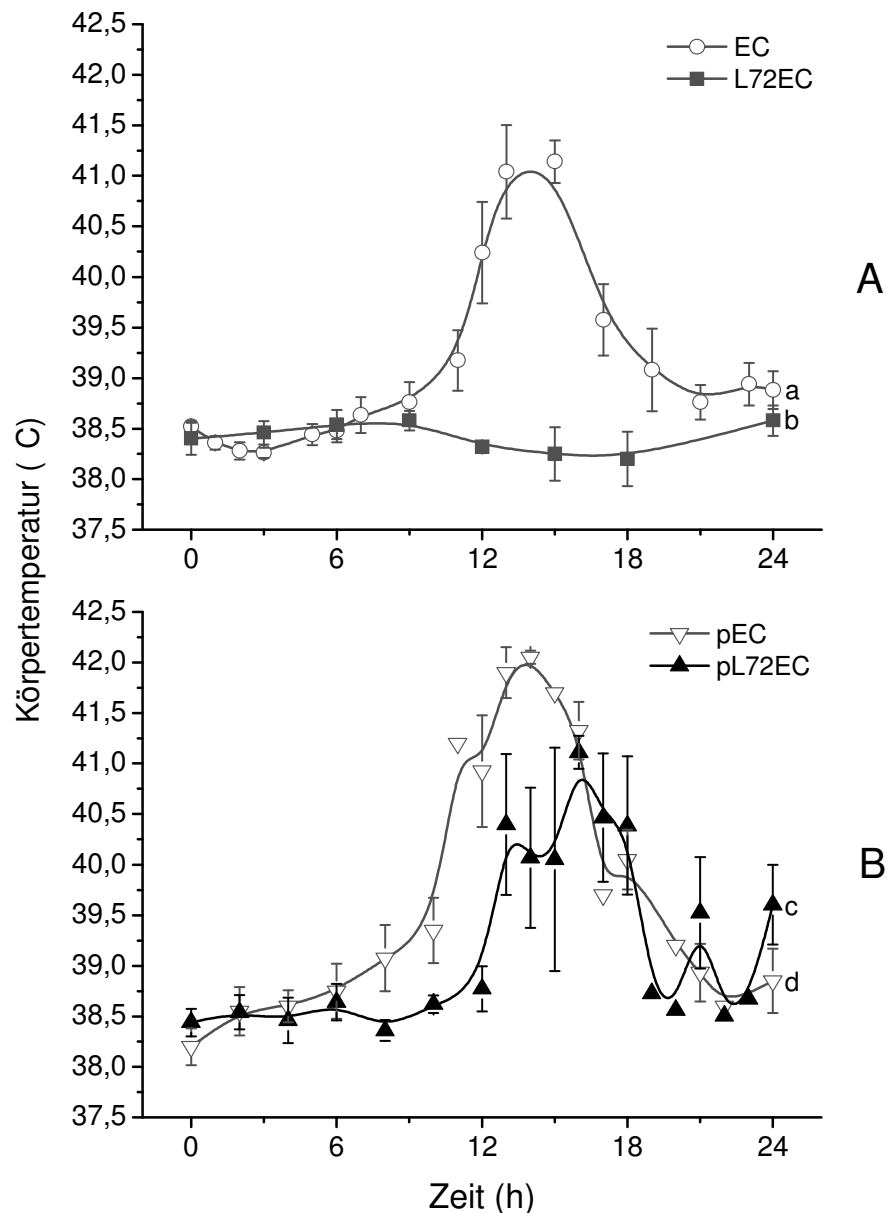


Abbildung 19: Körpertemperaturverlauf nach experimenteller intramammärer Infektion mit 500 CFU *E. coli* mit und ohne LPS-Vorbehandlung

In allen 4 Versuchsgruppen wurde in die Euterviertel mit den niedrigsten SCC 500 CFU *E. coli* appliziert. Die rektale Körpertemperatur wurde als ein Parameter der systemischen Reaktion in einem zweistündigen Intervall überwacht. Die Werte sind angegeben als MW \pm SEM. Graphen mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede im Temperaturverlauf ($p < 0,05$).

A: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 5$); „L72EC“: mit 1 μ g LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation ($n = 5$);

B: „pEC“: multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 4$); „pL72EC“: multipare, mit 1 μ g LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.2.3 Blutbild

Systemische Effekte einer *E. coli*-Infektion offenbarten sich auch bei der Bestimmung des Leukozytengehaltes des venösen Blutes. Den Tieren wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h und 24 h *p. infect.* Blut entnommen.

Die Leukozytenghalte variierten bereits zum Zeitpunkt 0 h, also unmittelbar vor der experimentellen *E. coli*-Infektion. Die Tiere der Gruppe „EC“ hatten zum Zeitpunkt 0 h mit $8,46 \pm 0,78 \cdot 10^3/\text{mL}$ (MW \pm SEM) eine statistisch signifikant höhere absolute Leukozytenzahl als die Tiere der Gruppe „L72EC“ ($6,08 \pm 0,63 \cdot 10^3/\text{mL}$), „EC“ ($4,83 \pm 0,66 \cdot 10^3/\text{mL}$) sowie „pL72EC“ ($5,68 \pm 1,10 \cdot 10^3/\text{mL}$). Um den Verlauf der Leukozytenzahl zwischen den Gruppen vergleichbar zu machen, wurden die zum Zeitpunkt 0 h gemessenen Werte als Ausgangswerte (= 0) festgelegt und die darauffolgenden Messwerte dazu ins Verhältnis gesetzt. Zu den einzelnen Zeitpunkten bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, außer zum Zeitpunkt 12 h *p. infect.* zwischen den Gruppen „EC“ und „L72EC“ (siehe Abbildung 20). Die „EC“-Tiere zeigten 12 h *p. infect.* im Vergleich zu 0 h eine statistisch signifikante Reduktion der zirkulierenden Leukozyten, die über den restlichen Versuchszeitraum anhielt. Die anderen Versuchsgruppen zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Leukozytenzahlen im Verlauf (siehe Abbildung 20).

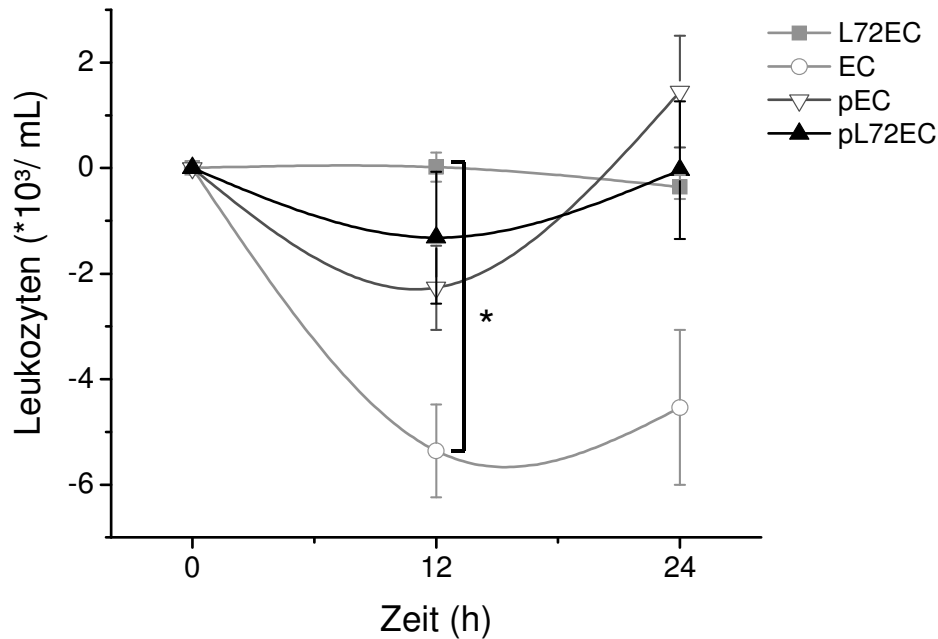


Abbildung 20: Entwicklung der Zahl der zirkulierenden Leukozyten im venösen Blut nach *E. coli*-Infektion

Diese Grafik zeigt die ab- bzw. zunehmenden Zahlen der Leukozyten dargestellt als MW \pm SEM der Differenz (Δ) der Leukozytengehalte zum Zeitpunkt 0 der *E. coli*-Infektion. Negative Werte stehen für eine Abnahme, positive dagegen für eine Zunahme der Zellzahlen. * = $p < 0,05$ zwischen den Gruppen EC und L72EC zum Zeitpunkt 12 h.

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung (n = 5); „L72EC“: mit 1 μ g LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (n = 5); „pEC“: multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung (n = 4); „pL72EC“: multipare, mit 1 μ g LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche (n = 5).

2.2.4 Lokale klinische Veränderungen am Euter

Die klinischen Veränderungen am Euter spiegelten in den vier Versuchsgruppen die jeweiligen Veränderungen des Allgemeinbefindens lokal wider. Die Bewertung erfolgte nach dem unter III.2.8 beschriebenen Punktesystem (Maximalpunktzahl 9 Punkte bei hochgradigen Entzündungserscheinungen). In die Bewertung flossen die Parameter Sekretveränderungen, veränderte Oberflächentemperatur, Ödematisierung, akute Schwellung und Induration ein. Zum Zeitpunkt 0 h waren die Euterviertel aller Versuchstiere ohne besonderen Befund. Während die beiden Kontrollgruppen („EC“ und „pEC“) bereits nach 12 h *p. infect.* mittel- bis hochgradige lokale Entzündungssymptome aufwiesen, zeigte in der puerperalen Gruppe „pL72EC“ nur ein Tier verändertes Sekret sowie geringgradige Induration und Ödematisierung des infizierten Euterviertels (siehe Abbildung 21). In den 24 h *p. infect.* konnten in Gruppe „L72EC“ keinerlei lokale Veränderungen beobachtet werden.

Der Vergleich des Ausprägungsgrades der lokalen entzündlichen Veränderungen und der über den Zeitraum von 24 h *p. infect.* maximal zugeteilten Punkten im lokalen Score ergab zwischen allen Versuchsgruppen signifikante Unterschiede (Test: Mann-Whitney, $p < 0,05$).

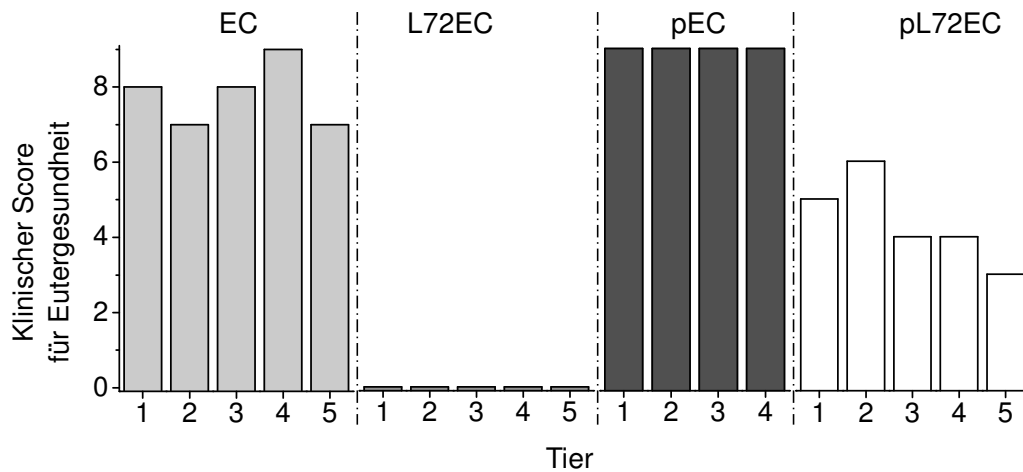


Abbildung 21: Lokale Entzündungserscheinungen am *E. coli*-infizierten Euterviertel im Zeitraum von 24 h *p. infect.*

Veränderungen am infizierten Euterviertel nach *E. coli*-Infektion wurden anhand des klinischen Scores für Eutergesundheit (siehe Tabelle 5) mit Punkten bewertet. In dieser Grafik sind die pro Tier zugeteilten maximalen Punkte im Zeitraum von 24 h *p. infect.* angegeben. o. b. B. = 0 Punkte, geringgradige Entzündung = 1 - 3 Punkte, mittelgradige Entzündung = 4 - 7 Punkte, hochgradige Entzündung = 8 - 9 Punkte.

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 5$); „L72EC“: mit 1 μg LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pEC“ multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 4$); „pL72EC“: multipare, mit 1 μg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.2.5 Somatischer Zellgehalt der Milch (SCC)

Bei der Auswertung des SCC nach *E. coli*-Infektion wurde besonderes Augenmerk auf dessen Entwicklung in den infizierten Vierteln gelegt. Tiere, die mit LPS vorbehandelt worden waren, hatten einen signifikant höheren SCC zu Beginn der *E. coli*-Infektion als die Kontrolltiere ($p < 0,05$), wobei der Ausgangswert der Gruppe „L72EC“ auch signifikant höher war als der SCC der Gruppe „pL72EC“ ($p < 0,05$, siehe Abbildung 22). Die SCC-Werte werden jeweils als Median (IQR) angegeben. Der mittlere Ausgangszellgehalt der „EC“-Gruppe betrug $28 (25 - 34) \cdot 10^3$ Zellen/mL Milch (Median, IQR). Im Zeitraum von 24 h *p. infect.* konnte eine Zunahme des SCC über $2,07 (1,19 - 2,66) \cdot 10^6$ Zellen/mL zum Zeitpunkt 12 h *p. infect.* auf Werte von $8,20 (7,02 - 9,99) \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch zur Stunde 24 *p. infect.* verzeichnet werden. Ähnlich entwickelte sich der SCC in der puer-

peralen Kontrollgruppe („pEC“): zum Zeitpunkt 0 h war der SCC bei 38,5 (27,5 - 46)*10³ Zellen/mL, nach 12 h *p. infect.* bei 2,98 (1,20 - 4,10)*10⁶ Zellen/mL und nach 24 h bei Maximalwerten von 16,57 (5,51 - 31,57)*10⁶ Zellen/mL (Median, IQR).

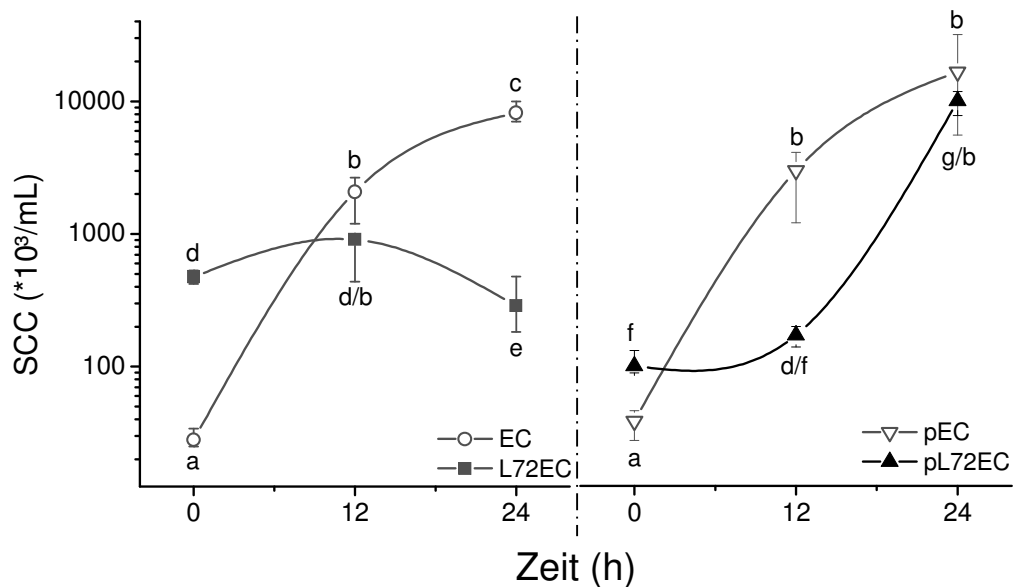


Abbildung 22: Gehalt somatischer Zellen in der Milch der mit *E. coli* infizierten Viertel

Dargestellt ist die Entwicklung des mittleren Zellgehaltes (Median, IQR) der mit *E. coli* infizierten Viertel zu den Zeitpunkten: 0 h (unmittelbar vor der Infektion), 12 h und 24 h *p. infect.* Unterschiedliche Buchstaben markieren: statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den einzelnen Zeitpunkten innerhalb und zwischen den Gruppen.

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 5$); „L72EC“: mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pEC“: multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 4$); „pL72EC“: multipare, mit 1 µg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

Der Influx der somatischen Zellen in die Milch der LPS-vorbehandelten Tiere war zur Stunde 12 h *p. infect.* nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den Kontrolltieren. In Gruppe „pL72EC“ stieg der SCC statistisch nicht signifikant von 100 (89 - 131)*10³ Zellen/mL Milch auf 171 (139 - 198) *10³ Zellen/mL Milch (Median, IQR). Auch in Gruppe „L72EC“ kam es zunächst zu einem Zelleinstrom ($p > 0,05$) von 476 (420 - 531) *10³ Zellen/mL Milch auf 909 (436 - 966)*10³ Zellen/mL Milch (Median, IQR). Nach 24 h *p. infect.* lag der SCC dieser Gruppe bereits unter dem Ausgangsniveau bei 288 (183 - 478)*10³ Zellen/mL (Median, IQR). In der „pL72EC“-Gruppe konnte eine signifikante Zunahme des SCC auf 9,99 (7,71 - 11,75)*10⁶ Zellen/mL Milch (Median, IQR) zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* verzeichnet werden.

In der statistischen Analyse wurde die SCC-Entwicklung mittels des t-Tests für unabhängige Parameter auch zwischen den Gruppen verglichen. Dabei ergab sich: Die Kontrollgruppen „EC“ und „pEC“ unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Zu den Zeitpunkten 0 und 24 h nach *E. coli*-Infektion bestanden zwischen den LPS-behandelten Gruppen signifikante Unterschiede. Dies gilt auch für die Gruppen „L72EC“ und „EC“. Die puerperalen Gruppen („pEC“ und „pL72EC“) hatten lediglich statistisch signifikant unterschiedliche Ausgangswerte, die auf die LPS-Vorbehandlung zurückzuführen sind (siehe Abbildung 22).

2.2.6 Milchleistung

Die Milchleistung wurde für jedes Viertel getrennt dokumentiert, damit die mit einer Mastitis einhergehenden Sekretionsrückgänge für das infizierte Euterviertel beurteilt werden konnten. Da die ermolzene Milchmenge interindividuell erwartungsgemäß variierte, wurde die Milchleistung zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion (0 h) als Nullwert festgesetzt und die Milchmengen zu den zwei darauffolgenden Melkzeiten als Differenz dargestellt (siehe Abbildung 23). Die Tiere der Gruppe „EC“ zeigten schon 12 h *p. infect.* Produktionseinbußen von 0,9 (0,7 - 1) L Milch und nach 24 h *p. infect.* eine weitere statistisch signifikante Abnahme auf 2 (1,9 - 3) L Milch (Median, IQR) im Vergleich zu Zeitpunkt 0 h ($p < 0,05$). Bis zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* nahm die Milchleistung der Gruppe „L72EC“ im Mittel um 0,3 (0 - 0,4) L Milch (Median, IQR) bezogen auf den Zeitpunkt 0 h zu. Bei den puerperalen Kontrolltieren ohne LPS-Behandlung („pEC“) nahm die Milchleistung bis zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* signifikant ab ($p < 0,05$). So war die durchschnittliche Milchmenge nach 12 h *p. infect.* um 0,7 (0,6 - 0,8) L und nach 24 h *p. infect.* um 2,25 (2 - 2,9) L reduziert (Median, IQR). Die puerperalen, LPS-vorbehandelten Tiere („pL72EC“) reagierten mit einer statistisch signifikanten Abnahme der Produktionsleistung: Zum Zeitpunkt 12 h *p. infect.* konnten im Schnitt 1,25 (0,9 - 1,45) L Milch, zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* dagegen 1,4 (0,7 - 2,45) L Milch weniger ($p < 0,05$) aus den infizierten Vierteln ermolken werden (Median, IQR).

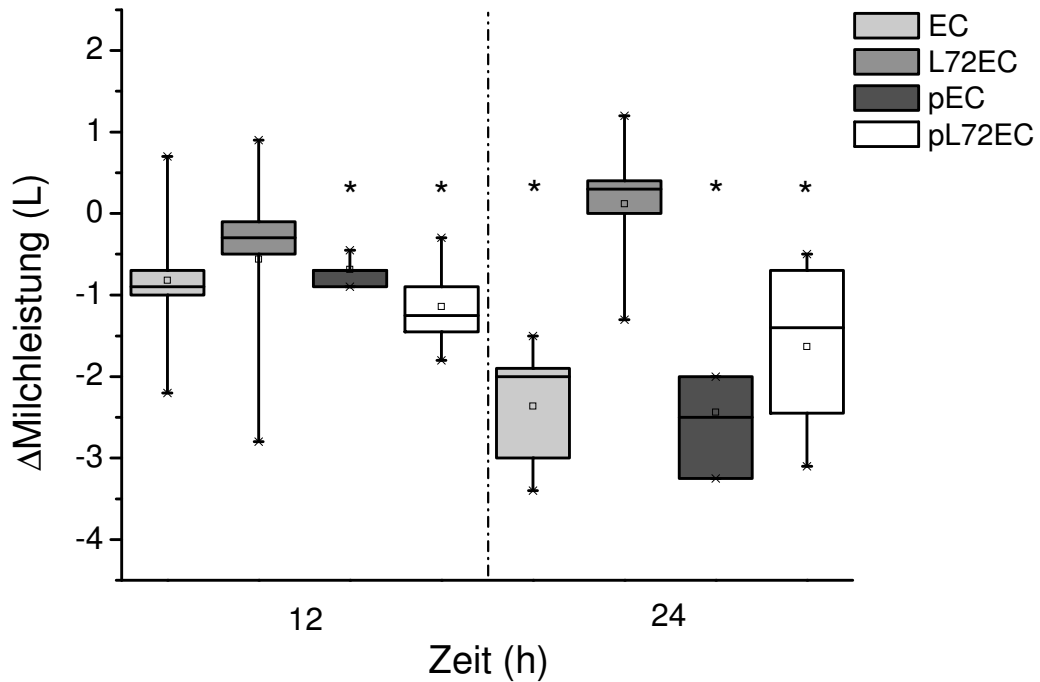


Abbildung 23: Einfluss einer experimentellen *E. coli*-Infektion auf die Milchleistung des infizierten Euterviertels

In dieser Grafik ist die Entwicklung der Milchleistung in den experimentell infizierten Eutervierteln nach 12 h und 24 h *p. infect.* dargestellt. Als Boxplots dargestellt sind die durchschnittlichen Milchleistungen der infizierten Viertel im Vergleich zur Milchmenge (Differenz Δ) unmittelbar vor der Infektion (0h, Δ Milchleistung = 0).

* = statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen den Messzeitpunkten 12 und 24 h verglichen mit Zeitpunkt 0 h *p. infect.* ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 5$); „L72EC“: mit 1 μg LPS/Euterviertel behandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pEC“: multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 4$); „pL72EC“: multipare, mit 1 μg LPS/Euterviertel behandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.2.7 Sekretveränderungen

Unmittelbar vor der experimentellen Infektion eines Euterviertels mit *E. coli* waren die Sekretproben jeder Versuchsgruppe grobsinnlich unverändert. Alle Tiere der Kontrollgruppe „EC“ zeigten bereits nach 12 h *p. infect.* geringgradig ($n = 3$) bis mittelgradig ($n = 2$) verändertes Sekret mit Flockenbildung (siehe Abbildung 24). Zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* war bei einem Großteil ($n = 4$) der „EC“-Tiere die Milch mittelgradig verändert; bei 2 Tieren war der Milchcharakter verloren gegangen. In der „L72EC“-Gruppe waren die Milchsekrete zu keiner Zeit verändert. Die Gruppen der puerperalen Kühe („pEC“ und „pL72EC“) zeigten nach 12 h *p. infect.* größtenteils keine Flockenbildung; nur jeweils ein Tier pro Gruppe hatte geringgradig verändertes Sekret. Während die Tiere der Kontrollgruppe

„pEC“ allesamt nach 24 h *p. infect.* einen Verlust des Milchcharakters und eine Veränderung der Milch zu einem serumartigen Sekret aufwiesen, waren 80 % der Sekretproben der mit LPS vorbehandelten puerperalen Kühe makroskopisch unverändert.

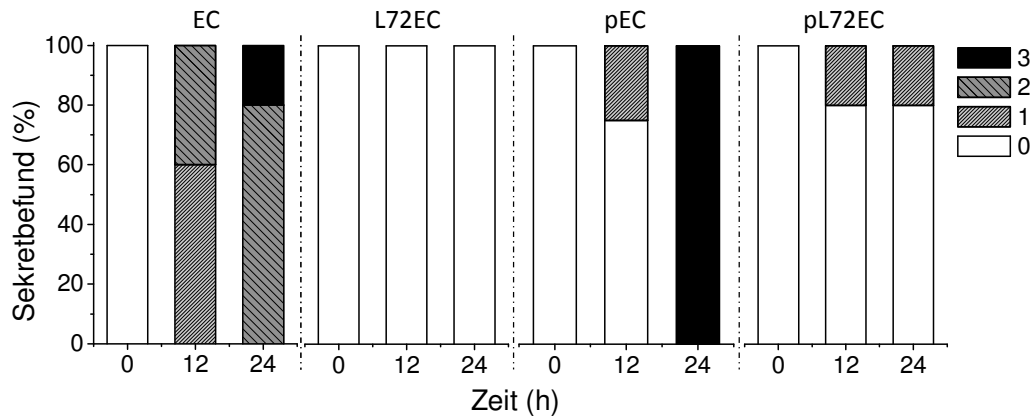


Abbildung 24: Milchsekreteigenschaften nach experimenteller *E. coli*-Infektion

Prozentualer Anteil *E. coli*-infizierter Euterviertel mit verändertem Sekretcharakter. Die Gruppen „EC“ (n = 5) und „pEC“ (n = 4) dienen als Kontrolle. „L72EC“ (n = 5) und „pL72EC“ (n = 5) wurden 72 h vor der *E. coli*-Infektion mit LPS vorbehandelt. Sekretscore: 0 = o. b. B.; 1 = einige feine Flocken; 2 = viele grobe Flocken; 3 = Milchcharakter verloren, serumartiges Sekret.

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung (n = 5); „L72EC“: mit LPS-vorbehandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (n = 5); „pEC“ multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung (n = 4); „pL72EC“: multipare, mit LPS-vorbehandelte Kühe in der ersten Laktationswoche (n = 5).

2.2.8 Milchinhaltsstoffe

Nach experimenteller *E. coli*-Infektion wurden auch die Milchinhaltsstoffe auf Viertelebene bestimmt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Veränderungen der infizierten Viertel gelegt. Tabelle 8 ermöglicht einen Überblick über die gesammelten Ergebnisse.

In allen Gruppen konnte 12 h nach *E. coli*-Infektion eine Abnahme des MilCHFettgehaltes verzeichnet werden. Allein die puerperalen mit LPS-vorbehandelten Tiere („pL72EC“) zeigten 24 h *p. infect.* einen weiteren Abfall des MilCHFettanteils. In den anderen Gruppen stieg der Gehalt wieder an. Die Veränderungen waren in keiner Gruppe statistisch signifikant.

Der prozentuale Anteil des Milchproteins blieb über den Zeitraum von 24 h *p. infect.* in den Milchproben der LPS-vorbehandelten Gruppen („L72EC“ und „pL72EC“) nahezu unverändert, während der Proteinanteil in beiden Kontrollgruppen („EC“ und „pEC“) zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* signifikant zunahm. Ins-

gesamt gesehen war die Proteinkonzentration in der Gruppe „EC“ signifikant niedriger als in der Gruppe „pEC“.

Der Verlauf der Laktosekonzentration war zwischen den beiden erstlaktierenden Gruppen signifikant unterschiedlich: In der Gruppe „EC“ kam es hierbei zu einem statistisch signifikanten Abfall des Laktosegehalts zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenentnahme, während in Gruppe „L72EC“ keine Unterschiede feststellbar waren. In beiden puerperalen Gruppen nahm die Laktosekonzentration über den Beobachtungszeitraum statistisch signifikant ab (siehe Tabelle 8). Dabei waren die Veränderungen in Gruppe „pEC“ im Vergleich zu Gruppe „pL72EC“ stärker ausgeprägt ($p < 0,05$).

Der Milchharnstoffgehalt blieb in Gruppe „L72EC“ nach *E. coli*-Infektion unverändert. Im Gegensatz dazu wurde in Gruppe „EC“ zum Zeitpunkt 12 h *p. infect.* eine transient niedrigere Harnstoffkonzentration im Viertelgemelk gemessen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen „EC“ und „L72EC“ waren statistisch nicht signifikant. Das gleiche Ergebnis ergab der Vergleich der puerperalen Gruppen: Zum Zeitpunkt 12 h hatten sich die Harnstoffkonzentrationen der Milch beider puerperalen Gruppen erhöht, nach 24 h jedoch waren sie wieder abgesunken. Die Veränderungen in Gruppe „pL72EC“ waren dabei statistisch signifikant (siehe Tabelle 8)

Der pH-Wert der Viertelgemelksproben war bei den LPS-vorbehandelten Tieren („L72EC“ und „pL72EC“) niedriger als der bei den jeweiligen Kontrolltieren. Über den Zeitraum von 24 h zeigte sich eine Erniedrigung des pH-Wertes in den Milchproben der Gruppen „EC“, „pEC“ und „pL72EC“. Nur in Gruppe „EC“ war diese Veränderung statistisch signifikant. Der pH-Wert der Milch in der „L72EC“-Gruppe blieb nahezu unverändert.

Tabelle 8: Übersicht über die Milchinhaltsstoffe nach experimenteller *E. coli*-Infektion

Milchinhaltsstoff	Zeit (h)	EC (n=20 Euterviertel)			L72EC (n=20 Euterviertel)			pEC (n=16 Euterviertel)			pL72EC (n=20 Euterviertel)		
		Median	IQR		Median	IQR		Median	IQR		Median	IQR	
Fett (%)	0	3,9	3,65	- 4,27	3,25	1,7	- 7,16	5,15	4,4	- 5,75	4,6	4,02	- 5,38
	12	2,58	0,97	- 2,86	2,64	2,61	- 3,29	3,84	3,1	- 5,36	3,67	3,63	- 4,88
	24	2,94	2,42	- 3,85	3,19	3,15	- 3,74	5,47	2,3	- 6,93	2,37	1,89	- 3,06
	$p^I =$	0,251			0,432			0,872			0,28		
Protein (%)	0	3,27	3,13	- 3,44	3,13	3,02	- 3,15	4,05	3,7	- 4,19	3,82	3,81	- 4,44
	12	3,31	3,18	- 3,5	3,33	3,24	- 3,46	4,11	3,9	- 4,3	4,3	3,87	- 4,3
	24	4,35	3,43	- 4,64	3,24	3,17	- 3,33	5,08	4,8	- 6	4,08	3,96	- 4,37
	$p^I =$	0,003			0,079			0,02			0,674		
Laktose (%)	0	4,9	4,88	- 4,96	4,95	4,83	- 4,98	4,66	4,5	- 4,85	4,63	4,58	- 4,77
	12	4,7	4,5	- 4,77	4,91	4,89	- 4,94	4,31	4,2	- 4,39	4,57	4,54	- 4,6
	24	3,41	2,65	- 4,36	4,91	4,83	- 4,92	2,77	2,1	- 3,54	4,04	3,39	- 4,16
	$p^I =$	0,039			0,724			0,004			0,013		
Harnstoff (mg/mL)	0	321	277	- 355	306	302	- 311	192	156	- 240	200	192	- 251
	12	299	283	- 309	320	289	- 372	276	245	- 333	262	216	- 291
	24	298	298	- 353	311	300	- 340	241	125	- 351	221	77	- 251
	$p^I =$	0,499			0,975			0,463			0,01		
pH	0	6,59	6,56	- 6,59	6,51	6,46	- 6,53	6,43	6,3	- 6,61	6,5	6,48	- 6,54
	12	6,59	6,53	- 6,59	6,61	6,59	- 6,65	6,57	6,4	- 6,66	6,57	6,54	- 6,57
	24	6,25	6,13	- 6,52	6,6	6,6	- 6,64	6,22	6,1	- 6,36	6,45	6,43	- 6,6
	$p^I =$	0,027			0,102			0,071			0,422		

^I Angegeben sind die p-Werte der statistischen Analyse der Konzentrationen des jeweiligen Milchinhaltsstoffes und des pH-Wertes über den Zeitraum von 24 h *p. infect.* innerhalb einer Gruppe.

Der Vergleich zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten ergab zu den mit gleichen Symbolen gekennzeichneten Zeitpunkten („EC-L72EC“♦, „EC-pEC“*, „L72EC-pL72EC“○ und „pEC-pL72EC“#) eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung (5 Tiere/n = 20 Euterviertel); „L72EC“: mit LPS-vorbehandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation (5 Tiere/n = 20 Euterviertel); „pEC“ multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung (4 Tiere/n = 16 Euterviertel); „pL72EC“: multipare, mit LPS-vorbehandelte Kühe in der ersten Laktationswoche (5 Tiere/n = 20 Euterviertel).

2.2.9 Bakteriologische Befunde

Der Erfolg der experimentellen Infektion ebenso wie der Verlauf der Pathogen-Elimination wurden durch bakteriologische Untersuchungen überprüft (siehe III.2.9.1). Zum Zeitpunkt unmittelbar vor *E. coli*-Infektion waren alle Euterviertel bakteriologisch negativ.

In den Gruppen ohne LPS-Vorbehandlung („EC“ und „pEC“) war die Keimbelastung im Milchsekret höher als bei LPS-vorbehandelten Kühen (siehe Abbildung 25). Sowohl in der Mitte der Laktation als auch im Puerperium bewirkte die LPS-Vorbehandlung eine Keimreduktion. Die Sekretproben der infizierten Viertel innerhalb der Gruppe „pEC“ enthielten zu 100 % über 2000 CFU/mL, in Gruppe „EC“ dagegen wurden bei 80 % der untersuchten Sekrete zwischen 500 und 2000 CFU/mL nachgewiesen. Im Milchsekret eines „EC“-Tieres (20%) lag die Bakterienzahl zu diesem Zeitpunkt bereits bei über 2000 CFU/mL. In der „pL72EC“-Gruppe wurden bei 80 % der Tiere über 2000 CFU/mL *E. coli* nachgewiesen, die Keimbelastung des Milchsekrets eines Tieres dieser Gruppe lag in der Kategorie < 500 CFU/mL. In der erstlaktierenden, LPS-behandelten Gruppe konnten über den gesamten Zeitraum von 24 h *p. infect.* lediglich in der Milchprobe eines Tieres zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* Bakterien (<500 CFU/mL) nachgewiesen werden.

Der Anteil der „EC“-Tiere mit einem Keimgehalt von über 2000 CFU/mL im Milchsekret stieg bis zum Zeitpunkt 24 h *p. infect.* auf 40 % ($p > 0,05$). Alle infizierten Viertel der „pEC“-Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt eine Belastung mit weiterhin über 2000 CFU/mL *E. coli*. Bei den „pL72EC“-Kühen dagegen konnten zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu Gruppe „pEC“ weniger Bakterien reisoliert werden ($p < 0,05$): bei zwei Tieren (40 %) wurden unter 500 CFU/mL, bei zwei weiteren zwischen 500 und 2000 CFU/mL und bei einem Tier über 2000 CFU/mL *E. coli* gezählt (siehe Abbildung 25).

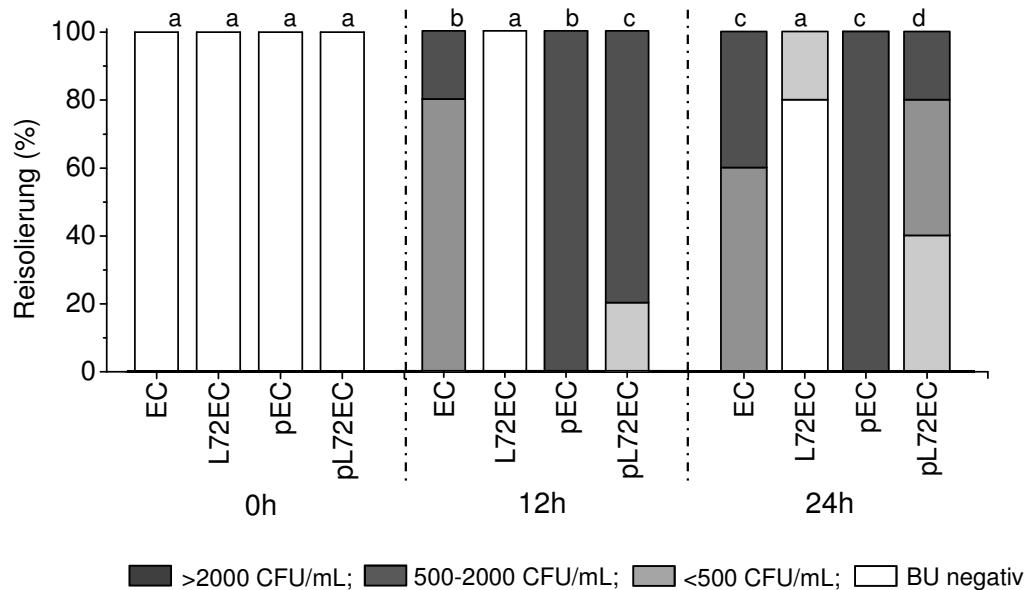


Abbildung 25: Kulturelle Reisolierung von *E. coli* nach experimenteller Infektion

Dargestellt sind die bakteriologischen Befunde der infizierten Viertel der 4 Versuchsgruppen 12 und 24 h nach experimenteller Infektion in Prozent. Unmittelbar vor der Infektion mit 500 CFU *E. coli* (zum Zeitpunkt 0 h) war die Milch aller Euterviertel bakteriologisch negativ.

Unterschiedliche Buchstaben: statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen und zwischen den Zeitpunkten innerhalb der Versuchsgruppen.

Abkürzungen: „EC“: Erstlaktierende Kühe, in der Mitte der Laktation ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 5$); „L72EC“: mit LPS-vorbehandelte erstlaktierende Kühe in der Mitte der Laktation ($n = 5$); „pEC“: multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 4$); „pL72EC“: multipare, mit LPS-vorbehandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$).

2.3 Milchzelldifferenzierung bei puerperalen Kühen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Eine intramammäre Infektion führt zu einem rapiden Einstrom von Immunzellen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können diese Zellen morphologisch analysiert werden. So wurden in der vorliegenden Arbeit die Veränderungen des Verhältnisses der Leukozytenpopulationen offengelegt und anhand des bekannten Milchzellgehalts die Absolutzahlen der Zellfraktionen berechnet.

Die Milchzellen wurden für dieses Verfahren wie unter III.2.10.1 beschrieben aufgereinigt, mit Acridin-Orange und Propidiumjodid angefärbt und anschließend im Durchflusszytometer differenziert.

2.3.1 Veränderungen der Leukozytenfraktionen in den ersten 36 h *post partum*

In den ersten Tagen *p. p.* veränderten sich die Anteile der Zellfraktionen der Milch. Während das Verhältnis mononukleärer zu neutrophilen Granulozyten

(MNC/PMN) im Kolostrum bei durchschnittlich $0,36 \pm 0,05$ MNC/PMN (MW \pm SEM) lag, änderte es sich über einen Zeitraum von 36 h zu einem Verhältnis von $0,54 \pm 0,08$ MNC/PMN (siehe Abbildung 26). Die statistische Analyse ergab jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der SCC sank im gleichen Zeitraum statistisch signifikant ($p < 0,05$) von $3320 \pm 860 \cdot 10^3$ Zellen/mL Milch auf $0,94 \pm 0,38 \cdot 10^3$ Zellen/mL Milch (MW \pm SEM).

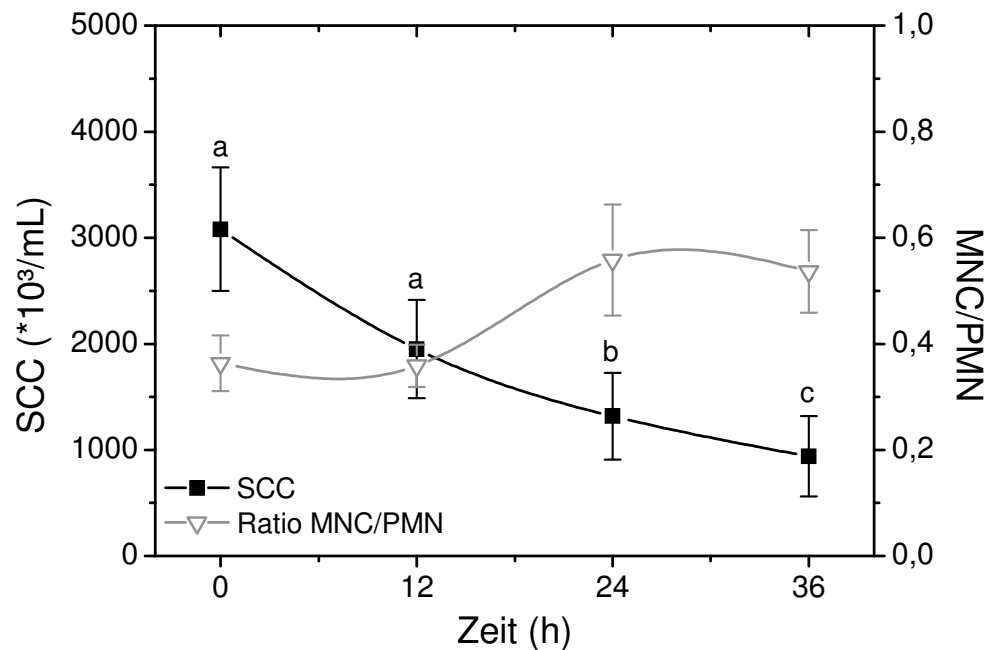


Abbildung 26: Vergleich des SCC-Verlaufs und des Verhältnisses MNC/PMN in den ersten 36 h nach der Kalbung

Vergleichend dargestellt ist der Verlauf des SCC zu den ersten 4 Melkzeiten *p. p.* und des durch durchflusszytometrische Analysen bestimmte Verhältnis mononukleärer Zellen zu PMN in der Milch (MW \pm SEM). In beiden Fällen betrug die Anzahl der untersuchten Milchproben $n = 36$. Untersucht wurden Milchproben aller Euterviertel der 9 puerperalen, klinisch gesunden Kühen der Gruppen „pEC“ und „pL72EC“. Unterschiedliche Buchstaben stellen einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Zeitpunkten dar ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „SCC“: Somatic Cell Count, „MNC“: Mononuclear Leukocytes, „PMN“: Polymorphonuclear Leukocytes.

2.3.2 Effekte der LPS-Infusion auf das Differentialzellbild der Milch puerperaler Kühe

Im Differentialzellbild zeigte sich nach intramammärer LPS-Infusion eine Veränderung des MNC/PMN-Verhältnisses zugunsten der PMN ($p < 0,05$). Während es zum Zeitpunkt 0 h (entspricht 36 bis 48 h *p. p.*) durchschnittlich $0,42 \pm 0,05$ (MW \pm SEM) MNC/PMN betrug, nahm der Anteil der PMN zur 12 h *p. infus.* enorm zu, so dass sich das Verhältnis zu diesem Zeitpunkt zu einem Wert

von $0,08 \pm 0,01$ (MW \pm SEM) verschob. Gleichzeitig nahm die Zellzahl in der Milch von $0,38 \pm 0,12 \cdot 10^6$ auf $3,81 \pm 0,64 \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch (MW \pm SEM) zu (siehe auch IV.2.1.4.2)

Zum Zeitpunkt 24 h *p. infus.* war die Zellzahl bereits wieder auf durchschnittliche Werte von $1,33 \pm 0,21 \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch (MW \pm SEM) gesunken. Dieser Rückgang des SCC setzte sich kontinuierlich fort und lag nach 72 h unter den Ausgangswerten bei $1,93 \pm 0,03 \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch (MW \pm SEM).

Parallel zur Reduktion des SCC nahm auch der Anteil der PMN in der Milch ab und das Verhältnis MNC/PMN änderte sich statistisch signifikant ($p < 0,05$) zugunsten der MNC und lag zum Zeitpunkt 72 h *p. infus.* wieder bei $0,45 \pm 0,05$ (MW \pm SEM). Das Ausgangsverhältnis war somit wieder erreicht (siehe Abbildung 27).

Zwischen den Mittelwerten der SCC-Werte und den Mittelwerten des MNC/PMN-Verhältnisses besteht eine signifikante negative Korrelation ($r = -0,63$).

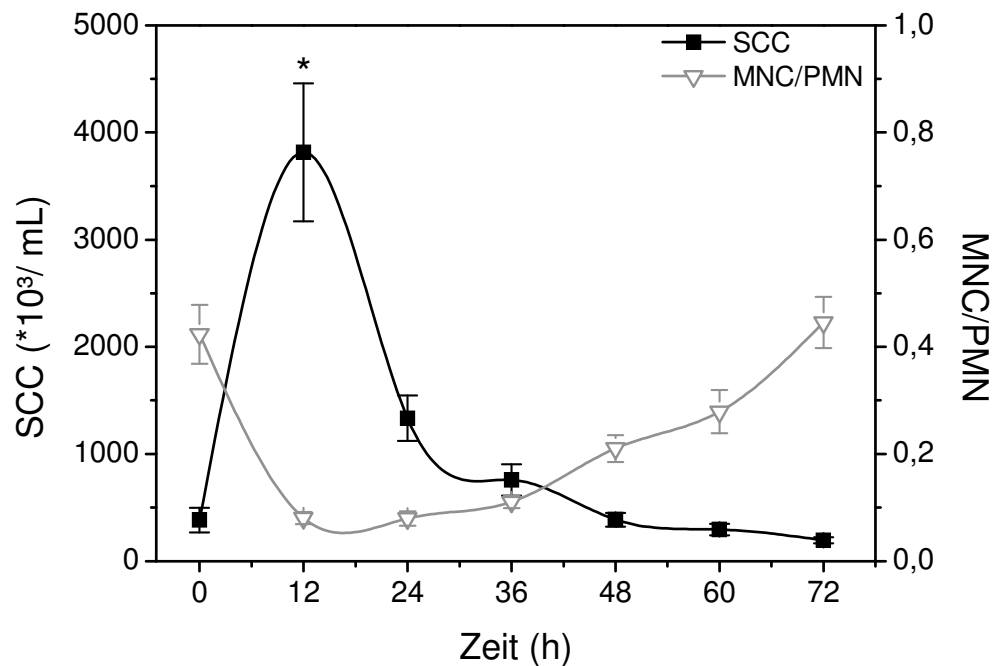


Abbildung 27: Verlauf des Milchzellgehaltes (SCC) und des MNC/PMN-Verhältnisses nach LPS-Infusion

Vergleichend dargestellt sind der SCC-Verlauf und das Verhältnis mononukleärer Zellen zu neutrophilen Granulozyten (MNC/PMN) der Milch. Zum Zeitpunkt 0 h wurden 20 Euterviertel von 5 Tieren jeweils 1 µg LPS infundiert (Versuchsgruppe „pL72EC“: multipare, mit LPS-vorbehandelte Kühe in der ersten Laktationswoche, n = 5). SCC: Median, IQR; MNC/PMN: MW ± SEM; * = signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt 0 h (p < 0,05).

Abkürzungen: „SCC“: Somatic Cell Count, „MNC“: Mononuclear Leukocytes, „PMN“: Polymorphonuclear Leukocytes.

2.3.3 Effekte einer experimentellen Infektion mit *E. coli* auf das Differenzialzellbild der Milch puerperaler Kühe mit und ohne LPS-Vorbehandlung

Die Veränderungen im Verhältnis der Milchzellfraktionen wurden nach experimenteller *E. coli*-Infektion über einen Zeitraum von 24 h überwacht (siehe Abbildung 28). In der Gruppe „pEC“, der nicht mit LPS vorbehandelten Gruppe, änderte sich das Verhältnis von MNC zu PMN statistisch signifikant (p < 0,05, Mixed Model). Das Ausgangszellbild der Milch war geprägt von einem hohen Anteil mononukleärer Zellen (MNC/PMN: $2,4 \pm 1,04$; MW ± SEM); der mittlere Zellgehalt betrug dabei $36,75 \pm 5,66 \cdot 10^3$ Zellen/mL (MW ± SEM). Zwölf Stunden *p. infect.* hatte der SCC deutlich zugenommen und lag nun im Mittel bei $2,65 \pm 0,93 \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch (MW ± SEM). Dementsprechend verlagerte sich das MNC/PMN-Verhältnis auf die Seite der PMN ($0,09 \pm 0,04$; MW ± SEM).

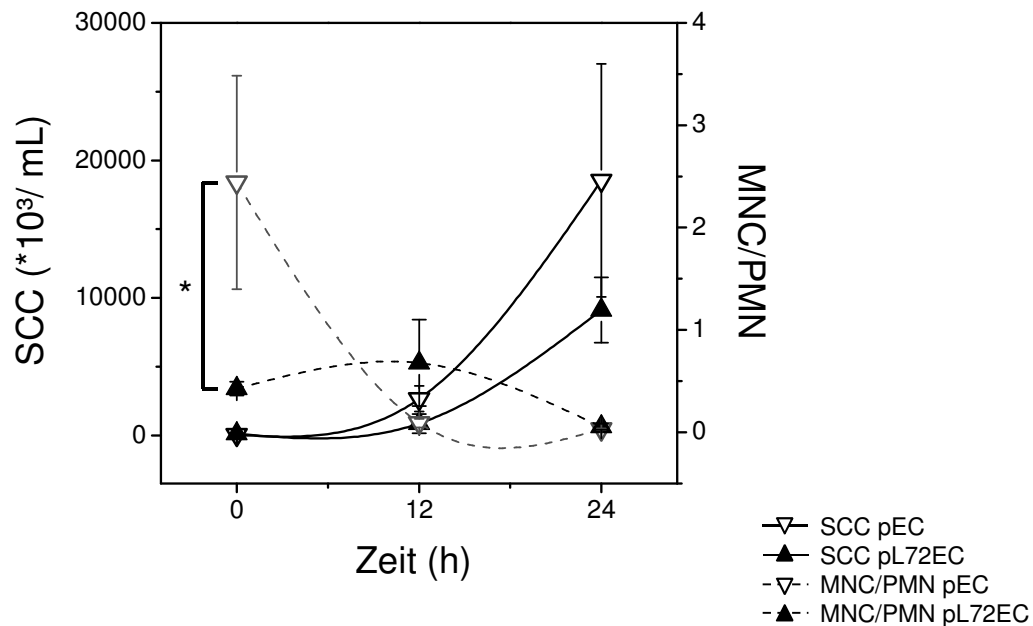


Abbildung 28: Vergleich des SCC-Verlaufs und des Verhältnisses MNC/PMN in Eutervierteln nach experimenteller *E. coli*-Infektion mit und ohne LPS-Vorbehandlung

Vergleichend dargestellt sind der SCC-Verlauf und das MNC/PMN-Verhältnis nach experimenteller *E. coli*-Infektion im Milchsekret der puerperalen Tiere. SCC: Median, IQR; MNC/PMN: MW \pm SEM. * = signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zum Zeitpunkt 0 h ($p < 0,05$).

Abkürzungen: „pEC“: multipare Kühe in der ersten Laktationswoche ohne LPS-Vorbehandlung ($n = 4$); „pL72EC“: multipare, mit LPS-vorbehandelte Kühe in der ersten Laktationswoche ($n = 5$). „SCC“: Somatic Cell Count, „MNC“: Mononuclear Leukocytes, „PMN“: Polymorphonuclear Leukocytes.

Im Gegensatz zur Gruppe „pEC“ dominierten PMN das Milchzellbild der „pL72EC“-Gruppe ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion: Das Verhältnis verschob 12 h *p. infect.* sich bei den LPS-vorbehandelten Vierteln ausgehend von $0,40 \pm 0,06$ (MW \pm SEM) zum Zeitpunkt 0 h sogar noch leicht in Richtung MNC ($0,71 \pm 0,41$). Zum Zeitpunkt 24 h nach *E. coli*-Infektion war aber auch in dieser Gruppe ein starker PMN-Influx resultierend in einem MNC/PMN-Verhältnis von $0,05 \pm 0,03$ (MW \pm SEM) und einem starken SCC-Anstieg auf Werte von $9,11 \pm 2,37 \cdot 10^6$ Zellen/mL Milch (MW \pm SEM) zu verzeichnen. Die statistische Analyse (Mixed Model) ergab keine statistisch zu sichernden im Verlauf des MNC/PMN-Verhältnisses über 24 h in der Gruppe „pL72EC“.

V DISKUSSION

Hochleistende Milchrinder sind im peripartalen Zeitraum einem besonders hohen Mastitisrisiko ausgesetzt. Gerade in dieser Phase können sich intramammäre Infektionen mit dem fakultativ pathogenen Bakterium *E. coli* etablieren und als akute, klinische Euterentzündungen mit hochgradigen Störungen des Allgemeinzustands manifestieren. Eine Therapie bleibt in solchen Fällen häufig ohne durchschlagenden Erfolg: die Tiere können sterben, müssen euthanasiert werden oder ihre Rekonvaleszenz wird zu einem langwierigen, zeit- und kostenintensiven Prozess. Eine rasche Pathogenerkennung durch den Wirt und das schnelle Rekrutieren der PMN, den Haupteffektorzellen des Immunsystems, sind ausschlaggebend für die Entwicklung und den Verlauf einer Mastitis.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die Rolle der Zitze als „Einstrittsporte“ und Ort der ersten Wirt-Pathogen-Interaktion untersucht werden. Zum anderen sollte geklärt werden, ob sich bei der puerperalen Kuh eine intramammäre Endotoxintoleranz induzieren lässt, und ob sich diese protektiv gegenüber einer experimentellen Infektion mit *E. coli* auswirkt.

1 Konzeptionelle Überlegungen

1.1 LPS und der Modellkeim *E. coli* 1303

Seit vielen Jahren wird LPS zur Erforschung der koliformen Mastitis eingesetzt, wie beispielsweise in Studien von PAAPE *et al.* (1974), OSTENSSON (1993) und DIEZ-FRAILE *et al.* (2003). Es gilt als Schlüsselmolekül, da es die Wirt-Pathogen-Interaktionen und pathogenetischen Prozesse während einer Infektion mit gramnegativen Bakterien auslöst und die Immunreaktion des Wirtsorganismus initiiert (HOEBEN *et al.*, 2000). Über Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren auf Zellen des unspezifischen Immunsystems, aber auch auf mammären Epithelzellen (STRANDBERG *et al.*, 2005), wird LPS erkannt und eine Signalkaskade aktiviert. Die Folge davon ist die Produktion zahlreicher pro- aber auch anti-inflammatorischer (regulatorischer) Mediatoren, die die systemische Reaktion (Fieber, Tachykardie, Diarrhö) auslösen, aber auch zu ihrer Begrenzung beitragen (ANDERSON, 2000).

Vorteile dieses Moleküls liegen darin, dass es als extrahierter Zellwandbestandteil im Gegensatz zu einem vollständigen, vitalen Keim nicht vermehrungsfähig ist und somit einen einzelnen zeitlich beschränkten Reiz für eine Entzündungsreaktion darstellt. Da es zudem exakt dosiert werden kann, ist es möglich, die Immunreaktion akkurat zu evaluieren (PRIN-MATHIEU *et al.*, 2002) und interindividuell zu vergleichen.

Neben diesem Immunabwehr-initiierenden Effekt hat LPS auch die Eigenschaft, modulierend auf das Immunsystem zu wirken: Eine LPS-Exposition macht den Wirt refraktär gegenüber einer zweiten Stimulation mit entsprechenden pathogenen Bestandteilen oder gegenüber einer bakteriellen Infektion (BROAD *et al.*, 2006; MURPHEY *et al.*, 2007). Diese sogenannte „Endotoxintoleranz“ steigert darüber hinaus die Fähigkeit des Wirts zur Pathogenelimination. Bei endotoxintoleranten Mäusen wurde eine verbesserte Phagozytoseleistung, bakterizide Aktivität sowie eine höhere Überlebensrate beobachtet (LEHNER *et al.*, 2001b). LOHUIS *et al.* (1990a) induzierten bei Milchkühen mit unterschiedlichen Laktationszahlen eine Mastitis durch intramammäre LPS-Applikation (100 µg) und untersuchten dann *in vitro* das Wachstum von *E. coli* in Milchproben der infizierten Viertel 18 h nach LPS-Infusion. In nahezu allen Sekreten war das *E. coli*-Wachstum gehemmt, ja sogar die Absterberate des Keims erhöht. Eine Applikation von 10^4 CFU *E. coli* führte zu keiner Etablierung einer Mastitis. Dieser Effekt einer LPS-Vorbehandlung wurde zum ersten Mal erfolgreich im Sinne einer Mastitis-Prophylaxe von PFISTER (2009) bei Holstein-Friesian-Kühen (hier: Gruppe „L72EC“) in der Mitte ihrer ersten Laktation eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft werden, ob die Endotoxintoleranz und ihre immunmodulierenden Effekte auch bei multiparen Milchkühen induzierbar ist, die sich im besagten kritischen Zeitraum des Frühpuerperiums befanden.

Da man davon ausgehen muss, dass die biologische Aktivität von LPS vom Bakterienstamm und der Präparationsweise abhängig ist (FREUDENBERG & GALANOS, 1990), wurde für die Versuche dieser Arbeit das LPS des Modellkeims *E. coli* 1303 verwendet. Dieser Bakterienstamm wurde aus dem Sekret einer Kuh, die an Mastitis erkrankt war, isoliert, kultiviert und in verschiedenen dieser Arbeit vorausgehenden Projekten erfolgreich eingesetzt (PETZL *et al.*, 2008; PFISTER, 2009; MEHNE, 2010; MITTERHUEMER *et al.*, 2010). Somit ist eine Vergleichbarkeit der eigenen Resultate mit den genannten Vorläufer-

studien der eigenen Arbeitsgruppe gewährleistet.

1.2 Messparameter

Wichtigster Messparameter zur Beschreibung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Versuchskühe war die Körpertemperatur. Ihre Erhöhung ist ein Hinweis auf eine systemische Reaktion des Versuchstieres auf die intramammäre LPS- und *E. coli*-Applikation (CECILIANI *et al.*, 2002). Um den Verlauf und die Spitzenwerte der Körpertemperatur gerade in den ersten Stunden nach LPS- und *E. coli*-Infusion möglichst exakt überwachen zu können, wurde ein enges Messintervall festgelegt. Neben der Körpertemperatur wurden auch das Allgemeinbefinden mit Hilfe eines klinischen Scores und die Leukozytenzahl als Parameter einer systemischen Reaktion überprüft.

Die Melkzeiten gaben dagegen den Rhythmus der Beurteilung der entzündlichen Veränderungen in der Milch vor. So wurden die grobsinnliche Sekretbeschaffenheit, der SCC, das Differentialzellbild, die Milchinhaltsstoffe sowie die Milchleistung alle 12 h überprüft.

Die Zellzahl der Milch ist ein hervorragender Parameter zur Überwachung des aktuellen Gesundheitsstatus des Euters und der einzelnen Euterviertel. Während einer intramammären Infektion reflektiert der SCC-Wert die lokale Immunreaktion (SCHUKKEN *et al.*, 2003): Im Blut zirkulierende PMN werden aktiviert, strömen in das betroffene Euterviertel ein und lassen den SCC um ein Vielfaches ansteigen. Des Weiteren hat sich die Analyse des Differentialzellbildes der Milch als sehr nützlich erwiesen, um die frühe Phase der Mastitiden zu untersuchen, wenn der SCC noch in niedrigen Bereichen liegt, die PMN-Immigration jedoch schon eingesetzt hat (KOESS & HAMANN, 2008). Das leukozytäre Zellbild wandelt sich von dem einer gesunden Milchdrüse mit MNC als dominierende Fraktion in das eines entzündeten Euterviertels mit einem von eingewanderten PMN beherrschten Bild (MEHNE *et al.*, 2010).

Während der Parameter Milchleistung bei den erstlaktierenden Tieren einen Indikator für ein Krankheitsgeschehen, sei es systemisch oder lokaler Ursache, darstellt, muss bei puerperalen Tieren beachtet werden, dass sich die Milchproduktion zu Laktationsbeginn physiologischerweise steigert und so auch Einbußen beispielsweise durch Mastitiden kompensiert werden könnten.

Auch die Milchinhaltsstoffe (Fett, Protein, Laktose und Harnstoff) wurden zu jeder Melkzeit auf Viertelebene bestimmt. Während einer intramammären Infektion beeinflussen Entzündungsmediatoren wie Histamin oder Zytokine aber auch bakterielle Toxine die Enzymaktivität im Euter und wirken so auf die Konzentrationen der Milchinhaltsstoffe ein. Von den untersuchten Parametern gelten vor allem die Laktosekonzentration und der pH-Wert als wertvolle Indikatoren des mammären Gesundheitsstatus, wenngleich letzterer ein sehr instabiler, durch äußere Einflüsse leicht veränderbarer Wert ist (BRANDT *et al.*, 2010).

2 Induktion der mammären Endotoxintoleranz durch Exposition der Zitze mit LPS

Entscheidend für die Etablierung und den Verlauf einer intramammären *E. coli*-Infektion ist, wie schnell das Pathogen durch den Wirt erkannt wird und die Reaktion des Immunsystems einsetzt (KORNALIJNSLIJPER *et al.*, 2004). Da die Pathogeninvasion in der Regel über den Strichkanal erfolgt, ist die Zitze der Ort des ersten Erregerkontakts. Ihr wird daher eine wichtige Rolle in der Erregererkennung und -abwehr zugesprochen (NICKERSON & PANKEY, 1984). RINALDI *et al.* (2010) wiesen ihr eine Wächterfunktion zu; SORDILLO *et al.* (1997) sprachen von der „first line of defense“. Histologische Untersuchungen bakteriologisch positiver Euterviertel zeigten leukozytäre Infiltrationen des Zitzengewebes (NGATIA *et al.*, 1991). Einem initialen Entzündungsreiz durch LPS in chirurgisch vom Euter abgetrennten Zitzenzysternen folgte innerhalb einer Stunde die PMN-Rekrutierung in das Zitzengewebe (PERSSON *et al.*, 1992). Auch Transkriptomanalysen verschiedener Lokalisationen der Zitze zeigten 12 h nach experimenteller *E. coli*-Infektion eine Steigerung der Expression chemotaktischer und leukozytenaktivierender Proteine (RINALDI *et al.*, 2010).

PERSSON *et al.* (1988) beschränkten sich in ihren Versuchen auf trockenstehende Milchdrüsen, bei denen die Zitzenzysterne durch einen chirurgischen Eingriff proximal am Übergang zur Drüsenzisterne verschlossen war. So war gewährleistet, dass während der Versuche die LPS-Lösung ausschließlich mit dem Gewebe der Zitzenzysterne in Kontakt kam. Es konnte jedoch nur die Reaktion der Zitze untersucht werden. Ob eine Kommunikation zwischen Zitze und Drüsenparenchym besteht und die Zitze in ihrer Wächterfunktion bei bakterieller Invasion

„Alarm schlägt“, konnte so nicht überprüft werden. Aus diesem Grund sollte die Zitzenzisterne im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur temporär von den proximalen Anteilen des Euterviertels abgetrennt sein. Es wurde so überprüft, ob eine kurzzeitige und auf die Zitzenzisterne begrenzte LPS-Exposition ausreicht, um im gesamten korrespondierenden und laktierenden Euterviertel eine Immunreaktion zu initiieren. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine solche LPS-Applikation eine Endotoxintoleranz im Drüsenparenchym induzieren kann, die wie bei PFISTER (2009) protektiv gegenüber einer experimentellen *E. coli*-Inokulation wirkt.

In Vorversuchen wurde ein Ballonkatheter über den Strichkanal eingeführt, der das Zisternenlumen ausfüllen und abdichten sollte (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Schwierigkeiten dieser Prozedur lagen jedoch darin, dass Katheter mit ausreichend großem Ballon aber kleinem Katheterdurchmesser kaum auf dem Markt zu finden waren. Außerdem war die Fixation des Ballons in der Zitzenzisterne aufgrund der sehr gleitfähigen Oberfläche des Zisternenepithels unmöglich. Aus diesen Gründen wurde im Weiteren eine Zitzenklemme eingesetzt, die in der Zitzenchirurgie routinemäßig Verwendung findet. Das Zisternenlumen kann somit dicht verschlossen werden (zur Zitzenendoskopie wird Luft in die Zitze eingebracht). So wird während einer Endoskopie die Klemme für mehrere Stunden auf die Zitze gesetzt ohne andauernde Druckstellen oder jegliche Schäden am Gewebe zu hinterlassen. Außerdem zeigten die Tiere, bei denen die Klemme angesetzt wurde, keinerlei Unbehagen oder Schmerzreaktionen. SCC-Werte der Milch aus so exponierten Eutervierteln blieben unverändert (siehe IV.1.1).

Zweifelsohne ist die Blutzufuhr in die Zitze während des Abklemmens eingeschränkt. Inwieweit dies die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems und die Wirkung der Chemokine mit ihrer kurzen Halbwertszeit beeinflusst, müsste noch geklärt werden. Dopplersonografische Untersuchungen der Zitze mit aufgesetzter Klemme waren erfolglos, da der Kontakt zwischen Schallkopf und Zitze aufgrund der Zitzenklemme nicht ausreichend gut herzustellen war (Ergebnisse nicht gezeigt).

Das LPS sollte direkt mit der Zitzenzisternenschleimhaut interagieren können, weshalb die Zisternenmilch entfernt und das Zisternenlumen mehrmals mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült wurde. Gleichzeitig konnte durch den

Spülvorgang die Dichtigkeit des temporären Verschlusses überprüft werden, da die wiedergewonnene Flüssigkeit visuell auf Milchkontamination untersucht wurde. Die LPS-Inokulationsdosis wurde in einer höheren Konzentration (10 µg) als in der vorausgegangenen Studie von PFISTER (2009) gewählt, um trotz kurzer Expositionszeit eine intensive Interaktion zwischen LPS und seinen Rezeptoren zu ermöglichen. Außerdem wurde das LPS in einem kleinen Volumen unter möglichst geringem Druck appliziert, damit die LPS-Lösung durch den Druck nicht durch das abgeklemmte Areal hindurchgedrückt werden konnte. Das Euter wurde erst nach LPS-Exposition ausgemolken, zum einen, damit der Milchdruck die Schleimhaut an der Zitzenklemme nach unten drückt, zum anderen jedoch auch, um eventuelle LPS-Reste auszuspülen und um die Zitzendurchblutung durch den Melkvorgang zu fördern.

Vergleichend zu der auf die Zitze beschränkten LPS-Exposition wurde eine zweite Versuchsreihe (Versuchsgruppe „L“, siehe III.2.2, Abbildung 2) durchgeführt: Die Versuchsmodalitäten waren identisch mit den „Cl_L“-Versuchen; in dieser Gruppe wurde jedoch keine Zitzenklemme angesetzt. Dadurch konnte die Entzündungsreaktion auf die kurzzeitige intramammäre LPS-Exposition untersucht werden. Ob sich in der kurzen Expositionszeit auch eine Endotoxintoleranz mit ihren protektiven Eigenschaften induzieren ließ, wurde durch eine nachfolgende *E. coli*-Inokulation überprüft.

2.1 Nur wenige lokale Entzündungssymptome infolge einer 30minütigen intrazisternalen LPS-Behandlung

In-vitro-Versuche mit Explants der Zitzenzisterne und der Fürstenberg'schen Rosette (LIND, 2011) zeigten, dass das distale Kompartiment des Euterviertels zur Erregererkennung und Leukozytenaktivierung befähigt ist. Die Annahme, dass ein durch LPS gesetzter, lokaler Reiz in der Zitzenzisterne in das Parenchym des korrespondierenden Euterviertels geleitet wird und ausreichend ist, um eine das Viertel übergreifende Immunantwort auszulösen, hat sich in den *in-vivo*-Versuchen dieser Arbeit nicht bestätigt. Eine 30minütige Exposition des gesamten Euterviertels dagegen initiiert eine starke lokale und auch systemische Immunreaktion des Organismus.

Die LPS-Exposition, die sich in Gruppe „Cl_L“ (LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min lokal begrenzt auf die Zitzenzisterne; n = 3) lediglich auf die Zitzenzisterne beschränkte, führte in dieser Gruppe zu keinen systemischen und nur wenigen, kurz andauernden lokalen Reaktionen. In Gruppe „L“ (LPS-Vorbehandlung mit 10 µg LPS/Euterviertel in 1 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung für 30 min; n = 3) dagegen wurden eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur, ein vorübergehend gestörtes Allgemeinbefinden und ein erhöhter SCC beobachtet (siehe IV.1.1). Diese klinischen Befunde wurden auch in anderen Studien beobachtet, in denen eine Mastitis ebenfalls mit Hilfe von LPS induziert worden war (ZIV *et al.*, 1976; SHUSTER *et al.*, 1991; MEHRZAD *et al.*, 2001; LEHTOLAINEN *et al.*, 2003).

Ein Grund für das Ausbleiben der systemischen entzündlichen Reaktion und für die wenigen lokalen Symptome könnte sein, dass die Zitzenklemme den Blutstrom nach proximal eingeschränkt und die Weiterleitung von Entzündungsmediatoren in den Blutkreislauf verhindert hat. PERSSON *et al.* (1992) machten allerdings in ihrer Studie ähnliche Beobachtungen: Zitzenzysternen wurden hierbei durch einen chirurgischen Eingriff von den proximalen Milchdrüsenkompartimenten getrennt. Nach Abheilung (3 - 4 Wochen *post operationem*) folgte die intrazisternale Applikation von 20 µg LPS des Keims *Salmonella typhimurium*. Hier also war die Kommunikation über die Blutgefäße der Zisternenwand nicht eingeschränkt und trotzdem löste die LPS-Exposition weder eine Störung des Allgemeinbefindens noch eine Temperaturerhöhung aus. Lediglich 2 - 5 h *p. infus.* war die Zitze geschwollen und zum Teil geringgradig schmerzhaft. Dies war auch bei den „Cl_L“-Tieren während der eigenen Experimente der Fall. Zu dem massiven Zellinflux in die Zitzenzisterne, den PERSSON *et al.* (1992) beobachteten, kam es im Rahmen der vorliegenden Studie in dem Ausmaß allerdings nicht. Dies liegt vermutlich daran, dass sie Spülproben der Zitzenzisterne 60 min nach LPS-Applikation untersuchten, während in der vorliegenden Arbeit der SCC 30 min *p. infus.* aus dem Hauptgemelk bestimmt wurde. Zum einen war also die Expositionszeit des LPS in der Zitzenzisterne halb so lang. Zum anderen haben sich die in die Zisterne eingewanderten PMN mit der im Parenchym gebildeten Milch vermischt. Die absolute PMN-Zahl wurde somit in ihrer Konzentration „verdünnt“. Allerdings könnte es auch sein, dass in Gruppe „Cl_L“ grundsätzlich weniger PMN in das Lumen der Zitzenzisterne rekrutiert wurden. Es sei aber nochmals betont, dass

in der Studie von PERSSON *et al.* (1992) einerseits LPS von *Salmonella typhimurium* und nicht *E. coli* und andererseits in der doppelten Dosierung verwendet wurde. Auf die unterschiedlichen Eigenschaften von LPS wurde bereits in V.1.1 hingewiesen.

Um einen möglichen protektiven Effekt durch die LPS-Vorbehandlung zu überprüfen, wurde den Tieren in Gruppe „L“ und „Cl_L“ 72 h nach der LPS-Infusion 500 CFU *E. coli* intramammär appliziert. Dieses Modell der *E. coli*-Mastitis (etabliert mit *E. coli* 1303 durch PETZL, 2005) führte in der Vergangenheit immer zu einer akuten lokalen und systemischen Entzündung. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im folgenden Kapitel diskutiert.

2.2 Effekte einer mammären *E. coli*-Inokulation nach intrazisternaler LPS-Behandlung

Die Ergebnisse der untersuchten Parameter nach experimenteller *E. coli*-Infektion machten deutlich, dass eine 30minütige LPS-Exposition des gesamten Euterviertels den protektiven Effekt der Endotoxintoleranz induzieren kann. Beschränkt sich die Endotoxin-Vorbehandlung auf die Zitzenzisterne ist dies zumindest teilweise der Fall.

Die Tiere der „L“-Gruppe zeigten bis 36 h nach bakterieller Infusion keine Erhöhung des SCC und auch die bakteriologischen Untersuchungen der Milch fielen negativ aus. Dies wäre als protektiver Effekt zu werten und stimmt mit Beobachtungen anderer Studien überein (LOHUIS *et al.*, 1990a; PFISTER, 2009). Allerdings muss erwähnt sein, dass ein Tier der „L“-Gruppe 24 h *p. infect.* und ein weiteres 36 h *p. infect.* doch noch mit einer SCC-Erhöhung reagierten und auch klinische Symptome einer Mastitis zeigten (siehe IV.1.2). Auch *E. coli* konnten zu diesem Zeitpunkt wieder aus dem Sekret isoliert werden.

Ein Tier der Gruppe „Cl_L“ (n = 3) zeigte lokale Symptome einer akuten klinischen Mastitis mit ersten Symptomen 12 h *p. infect.* (siehe IV.1.2.3). Eine Erhöhung der rektalen Körpertemperatur wurde ebenfalls beobachtet. Das Allgemeinbefinden dieses Tieres war aber nicht gestört. *E. coli* konnte in großer Zahl reisoliert werden. Die beiden anderen Tiere dieser Gruppe zeigten nur geringe (SCC-Anstieg, ggr. lokale Veränderungen) bzw. keine Symptome. Die bakteriologische Untersuchung fiel bei diesen beiden negativ aus. Die Ursache für die

unterschiedlichen Reaktionsweisen der Kühe der „Cl_L“-Gruppe könnte darin bestehen, dass bei einem der Tiere, der temporäre Verschluss mittels Zitzenklemme nicht ausreichend dicht war und das LPS auch in proximale Kompartimente des Drüsenviertels diffundieren konnte. Da der Verschluss der Zitzenzisterne bei allen drei Tieren sowohl vor als auch nach der LPS-Applikation mittels Spülen der Zisterne und makroskopischen Beurteilung der Spülflüssigkeit überprüft wurde und jeweils nur die farblose, klare Flüssigkeit wiedergewonnen werden konnte, ist die Vermutung der nicht ausreichenden Dichtigkeit bei allen Tieren nahezu auszuschließen. Eine andere Möglichkeit könnte dagegen sein, dass die LPS-Exposition in der Zitzenzisterne der beiden Kühe, die keine oder nur eine geringgradige Mastitis entwickelten, im Gegensatz zu der des dritten Tieres, für eine Endotoxintoleranz ausreichte und das Euter vor einer Etablierung einer Mastitis in zumindest eingeschränktem Maße schützte, ähnlich wie es von PFISTER (2009) beobachtet werden konnte. Um wirklich eine definitive Aussage darüber zu treffen, ob die lokal begrenzte LPS-Exposition der Zitzenzisterne zu einem schützenden Effekt vor einer nachfolgenden Infektion führt, müsste eine größere Anzahl Tiere beprobt werden. Zudem sollten kürzere Untersuchungsintervalle für den SCC angewandt werden, und der Zelleinstrom sollte, wenn möglich, kompartmentabhängig gemessen werden, um schnelle, transiente oder sogar lokalisationspezifische Veränderungen nicht zu verpassen.

3 Intramammäre Induktion einer Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh

Die Endotoxintoleranz kann einen positiven Effekt auf die Leistungsfähigkeit des Immunsystems haben. Wie beispielsweise LEHNER *et al.* (2001b) beschrieben, ist die Elimination von Bakterien durch das Immunsystem endotoxintoleranter Mäuse im Vergleich zu nicht toleranten erhöht. Dadurch wurden die Überlebenschancen für diese Tiere deutlich besser. LOHUIS *et al.* (1990a) zeigten, dass das *E. coli*-Wachstum in Milch von Eutervierteln, die mit LPS vorbehandelt worden waren, gehemmt war und dass eine 18 h später erfolgende Infusion des Keims in das Euter zu keiner Mastitis führte. Diesen Effekt nutzte PFISTER (2009) zum ersten Mal, um die Schwere des klinischen Verlaufs einer *E. coli*-Mastitis bis zu zehn Tagen nach LPS-Vorbehandlung signifikant abzuschwächen.

In der vorliegenden Arbeit sollte dieser schützende Effekt bei multiparen, puerperalen Kühen geprüft werden, da die Tiere in dieser Phase dem höchsten Risiko ausgesetzt sind, an einer *E. coli*-Mastitis ernstlich zu erkranken.

3.1 Überlegungen zum Tiermodell

Die dieser vorliegenden Arbeit vorausgegangenen Studien von PFISTER (2009) und MEHNE (2010) bildeten die methodische Basis und ihre Ergebnisse konnten als Kontroll- und Vergleichsdaten verwendet werden. Die im Teilprojekt „Intramammäre Induktion der Endotoxintoleranz bei der puerperalen Kuh“ genutzten Tiere hatten folgenden Kriterien zu entsprechen: es mussten multipare, hochleistende Milchrinder der Rasse Holstein-Friesian unmittelbar nach der Abkalbung sein. Die adspektorisch und palpatorisch erfassbaren Befunde am Euter sowie ein gründlicher Vorbericht mit besonderer Gewichtung auf die Eutergesundheit wurden herangezogen, um ein Tier als „eutergesund“ einstufen zu können. Die Zellzahl als Auswahlkriterium, wie bei den erstlaktierenden Kühen in der Mitte der Laktation, kam hier nicht in Frage, da die Tiere zum Zeitpunkt der Ankaufsuntersuchungen zu einem großen Teil bereits trocken standen und der SCC im Kolostrum unmittelbar nach der Kalbung physiologischerweise erhöht war (siehe IV.2.3.1).

3.2 LPS-vermittelte Effekte

Die in dieser Studie eingesetzte LPS-Dosis wurde so gewählt, dass zum einen keine Störung des Allgemeinbefindens und nur eine geringgradige lokale Entzündung hervorgerufen wurden. Zum anderen sollten die Resultate mit den Ergebnissen aus der Studie von PFISTER (2009) verglichen werden. Dafür mussten die gleichen Bedingungen im Versuchsablauf entsprechend gegeben sein.

Auf die intramammäre LPS-Applikation reagierte die Gruppe „L72EC“ mit milder und lokal beschränkter Entzündung (siehe IV.2.1.2) und somit in ähnlicher Weise wie es beispielsweise MEHRZAD *et al.* (2001), PERKINS *et al.* (2002) und LEHTOLAINEN *et al.* (2003) beschrieben haben.

Bei den puerperalen Tieren („pL72EC“) dagegen blieb die Reaktion auf die LPS-Applikation lediglich auf einen erhöhten Zellgehalt und somit auch auf das Differentialzellbild der Milch beschränkt. Bemerkenswert ist, dass die Maximalwerte des SCC in der Milch der puerperalen Tiere niedriger lagen als die der

„L72EC“-Tiere.

Ein Grund für die nur sehr geringe Antwort der „pL72EC“-Tiere auf die LPS-Exposition könnte der unterschiedliche Ausgangszellgehalt der Milch vor der LPS-Infusion sein, der in der puerperalen Gruppe signifikant höher war als bei den erstlaktierenden. Wie NICKERSON *et al.* (1991) beobachteten, geht ein initial höherer SCC mit einer schwächeren Ausprägung klinischer Mastitiden einher. Des Weiteren könnte die reduzierte Reaktion der puerperalen Versuchstiere auf LPS auch mit den unterschiedlichen Eigenschaften der Milch in der Kolostralperiode, die bis Tag 5 *p. p.* andauert (GÜRTLER & SCHWEIGERT, 2005), im Vergleich zu reifer Milch sein. Kolostrum ist reich an Immunglobulinen und enthält im Gegensatz zu normaler Milch höhere Konzentrationen (2-5 mg/mL) Laktoferrin (RAINARD & RIOLLET, 2006). IgG und vor allem Laktoferrin können LPS detoxifizieren (SEIFERT *et al.*, 2002). Laktoferrin bindet die Phosphatgruppe des Lipid A-Anteils vom LPS (PUDDU *et al.*, 2010) und verhindert somit, dass LPS mit TLR4 an den Zelloberflächen interagiert und die intrazelluläre Signalkaskade initiiert (LEGRAND *et al.*, 2006). Versuche an Darmepithelzellen *in vitro* zeigten zudem, dass bovines Kolostrum selbst auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt (AN *et al.*, 2009), da es den NFκB-Signalweg direkt hemmt. NFκB ist ein zentraler Transkriptionsfaktor der LPS-TLR4-Signalkaskade: Im Zytoplasma liegt es als Komplex mit IκBα vor. Die Bindung von LPS an TLR4 führt über mehrere Zwischenschritte zur Phosphorylierung und Degradierung dieses Komplexes. NFκB wird frei und in den Zellkern überführt, wo es an die DNA bindet und die Expression proinflammatorischer Zytokine (TNFα, IL-6, IL-8 und Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 [ICAM-1]) steigert. Nach AN *et al.* (2009) verhindert Kolostrum ebendiesen Schritt der Komplexdegradation. Interessanterweise ist dieser Mechanismus auch während einer Endotoxintoleranz gehemmt (vgl. dazu: FAN & COOK, 2004). Eine LPS-Stimulation peripherer Blut-MNC, die zuvor mit bovinem Kolostrum inkubiert worden waren, führte zu einer Hemmung der Freisetzung von TNFα, IL-6 und IL-4 (SHING *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dokumentierten Befunden beobachtete LEHTOLAINEN *et al.* (2003) bei Tieren, die erst 6 - 15 d laktierend waren, eine deutlich stärkere lokale und systemische Reaktion auf eine Endotoxinbehandlung als bei Tieren in der späten Laktation. Das mag jedoch zum einen daran liegen, dass die kolostrale Phase bei diesen puerperalen Kühen vorüber und der Aus-

gangszellgehalt ihrer Milch deutlich niedriger war ($37 \cdot 10^3$ Zellen/mL). Dagegen war der SCC-Wert der „pL72EC“-Kühe zum Zeitpunkt der LPS-Infusion 10mal so hoch (durchschnittlich $383 \cdot 10^3$ Zellen/mL). Desweiteren wurde bei LEHTOLAINEN *et al.* (2003) auch eine 100fach höhere LPS-Dosis von 100 µg pro infundiertes Euterviertel verwendet.

3.3 Auswirkungen der experimentellen intramammären Infektion mit *E. coli* 1303 bei LPS-vorbehandelten primiparen und multiparen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren

Wie PIFSTER (2009) berichtete, konnte sich bei primiparen Kühen in der Mitte der Laktation („L72EC“) 72 h nach LPS-Vorbehandlung keine intramammäre *E. coli*-Infektion etablieren. Die Tiere reagierten nur transient mit einer Erhöhung des SCC, der zum Ende des Versuchszeitraumes (24 h *p. infect.*) nahezu wieder beim Ausgangswert lag (siehe IV.2.2.5). Keinerlei systemische und lokale klinische Veränderungen im Sinne einer entzündlichen Reaktion wurden beobachtet: Das Milchsekret blieb makroskopisch ohne Befund und auch am Euterviertel konnten adspektorisch und palpatorisch keine Entzündungssymptome festgestellt werden. Dagegen entwickelte sich bei primiparen Tieren, die keine LPS-Vorbehandlung erfahren hatten (Gruppe „EC“), aber mit *E. coli* 1303 auf einem Euterviertel infiziert wurden, stets eine akute klinische Mastitis mit einer mittel- bis hochgradigen Störung des Allgemeinbefindens und für *E. coli*-Mastitis typischen lokalen Symptomen (MEHNE 2010).

Die protektive Wirkung gegenüber einer experimentellen *E. coli*-Mastitis nach einer intramammären Vorbehandlung mit 1 µg LPS sah PFISTER (2009) hierin bestätigt.

Diese Erfahrungen ließen hoffen, dass der als ursächlich angesehene Schutzmechanismus durch eine LPS-induzierte Endotoxintoleranz auch bei der sogenannten „Risikogruppe“, den multiparen und puerperalen Kühen, greift. Im Laufe der Studie zeigte sich jedoch, dass die Tiere der Gruppe „pL72EC“ trotz LPS-Vorbehandlung eine Mastitis entwickelten, die jedoch im Vergleich zu den LPS-unbehandelten puerperalen und primiparen Kontrolltieren („pEC“ und „EC“) später auftrat und sich in einem milderen klinischen Bild präsentierte. Im Besonderen zeigte sich dies im Verlauf der rektal gemessenen Körpertemperaturen und der lokalen und systemischen Symptome. Die Körpertemperaturerhöhung der

„pL72EC“-Tiere setzte später ein (zwischen 1 - 4 h) und war auch signifikant schwächer ausgeprägt als in Gruppe „pEC“. Zeitgleich zum Anstieg der Körpertemperatur veränderten sich die Parameter des Allgemeinbefindens – Herzfrequenz, Pansenmotorik, Futteraufnahme und Verhalten. Der Vergleich mit den Kontrolltieren ergab zwar keine statistisch signifikant unterschiedlichen Maximalwerte in der Punkteverteilung anhand des systemischen Scores zur Allgemeingesundheit (siehe IV.2.2.1), und doch zeigte sich, dass sich die allgemeinen klinischen Symptome der „pL72EC“-Tiere durch die LPS-Vorbehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren später und in einer geringeren Ausprägung veränderten.

3.3.1 LPS-behandelte und -unbehandelte Tiere reagieren mit einer unterschiedlichen PMN-Dynamik auf eine *E. coli*-Exposition

Die Gehalte der zirkulierenden Leukozyten im Blut sind ein Spiegelbild der systemischen Entzündungsreaktion. In den ersten 24 - 48 h einer akuten Inflammation kommt es zu einer signifikanten Neutropenie, da die PMN an den Ort des Entzündungsgeschehens auswandern (WEISS *et al.*, 2011). Im Blutbild der Gruppe „EC“ war dies deutlich zu sehen: 12 h nach *E. coli*-Infektion fiel die Gesamtleukozytenzahl statistisch signifikant ab. VANGROENWEGHE (2004) machte bei primiparen Kühen in der Mitte der Laktation, die er zu den Tieren mit mittelgradig ausgeprägter Mastitis zählte, die gleiche Beobachtung: bei diesen Tieren nahm die Leukozytenzahl innerhalb der ersten Stunden *p. infect.* im Vergleich zu denjenigen, die er als hochgradig betroffene Tiere einstufte, signifikant ab. In beiden puerperalen Versuchsgruppen („pEC“ und „pL72EC“) der vorliegenden Arbeit konnten diese Veränderung in dem Ausmaß jedoch nicht beobachtet werden. Eine Ursache dafür könnte in der beeinträchtigten transendothelialen Migration der PMN in die Milchdrüse im puerperalen Zeitraum liegen, die nach MONFARDINI *et al.* (2002) durch verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den PMN verursacht sein könnte. Dieser Hypothese widersprechen jedoch die Ergebnisse der eigenen Experimente: der SCC und das Differentialzellbild der Milch der „pEC“-Tiere veränderten sich drastisch hin zu dem typischen Bild einer akuten Mastitis. In der durchflusszytometrischen Analyse stellte sich 12 h *p. infect.* nicht nur in der „EC“-Gruppe, sondern auch bei den puerperalen Tieren der Gruppe „pEC“ ein von PMN-dominiertes Milchzellbild dar. Der SCC war zu diesem Zeitpunkt um ein Vielfaches erhöht und, wie bei

SHUSTER *et al.* (1996), bei den Frühlaktierenden im Vergleich zu Spätlaktierenden sogar noch höher. Die puerperalen, multiparen Tiere entwickeln also trotz vergleichbarer PMN-Dynamik eine gravierender ausgeprägte *E. coli*-Mastitis als die primiparen Kühe in der Mitte der Laktation. Dies könnte vor allem mit den Funktionsstörungen der PMN im Geburtszeitraum zusammenhängen (siehe II.1.4). Hierbei sind vor allem die verminderte Fähigkeit zur Phagozytose und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu nennen (CAI *et al.*, 1994) – ein Resultat der bei hochleistenden Milchkühen regelmäßig postpartal auftretenden negativen Energiebilanz (ZERBE *et al.*, 2000). Ein Hinweis auf eine Funktionsstörung und eine verzögerte Immunabwehr könnten die makroskopisch erkennbaren Veränderungen im Milchsekret der infizierten Viertel sein: in der „EC“-Gruppe waren die Vorgemelke zum Zeitpunkt 12 h *p. infect.* bereits hochgradig verändert, während die „pEC“-Tiere noch unauffälliges Sekret zeigten und erst 24 h *p. infect.* einen Verlust des Milchcharakters hin zu serösem Sekret mit purulenter Flockenbildung aufwiesen. HILL *et al.* (1979) machten ähnliche Beobachtungen: das Milchsekret der Kühe, die in einer frühen Phase der Laktation experimentell mit *E. coli* infiziert wurden und schwer erkrankten, war erst nach 24 h makroskopisch verändert und nahm serösen Charakter an. Dasjenige von Tieren, die in der Mitte der Laktation waren, wies dagegen deutlich früher Flockenbildung auf.

Für die Gruppe „pL72EC“ hingegen, bei denen ebenfalls nur eine leichte Reduktion der Zahl zirkulierender Leukozyten zusammen mit dem erst nach 24 h *p. infect.* angestiegenen SCC und dem veränderten Differentialzellbild verzeichnet werden konnte, könnte es ein Hinweis darauf sein, dass die LPS-Vorbehandlung – zumindest in einem gewissen Maße – erfolgreich war. Denn PFISTER (2009) sah im Ausbleiben der Leukopenie den protektiven Effekt der LPS-Behandlung durch ein Eingrenzen der systemischen Auswirkungen und Verhinderung des toxischen Schocksyndroms ein weiteres Mal bestätigt. Ein signifikanter Anstieg des SCC konnte in der Milch der Gruppe „pL72EC“ erst nach 24 h gemessen werden (siehe IV.2.2.5). Zum Zeitpunkt der *E. coli*-Infektion war das Differentialzellbild durch die LPS-Vorbehandlung trotz niedriger Milchezellzahl noch von PMN dominiert. Zum Zeitpunkt 12 h *p. infect.* nahm der MNC-Anteil sogar zunächst wieder zu (siehe IV.2.3.3). Erst 24 h *p. infect.* verschob sich das MNC/PMN-Verhältnis zugunsten der PMN. Das Milchsekret blieb in seiner makroskopischen Beschaffenheit über den gesamten Versuchszeitraum ohne jede Veränderung. Dieser Be-

fund bekräftigt die Annahme, dass auch bei den puerperalen Kühen durch die LPS-Vorbehandlung eine Endotoxintoleranz hervorgerufen werden konnte, die die Lebensdauer und antibakterielle Leistungsfähigkeit der PMN gesteigert hat, wie es FETEROWSKI *et al.* (2001) bei PMN endotoxintoleranter Mäuse mit septischer Peritonitis zeigen konnten.

3.3.2 Verbesserte bakterielle Elimination durch LPS-Vorbehandlung

Die Kontrolle der Milch auf den Bakteriengehalt machte einmal mehr deutlich, dass die Abwehrbereitschaft bei den puerperalen, multiparen Tieren im Vergleich zu den primiparen Tieren in der Mitte der Laktation eingeschränkt ist. Die LPS-Vorbehandlung dagegen konnte dem entgegenwirken. Während in den betroffenen Vierteln der „pEC“-Tiere keine Bakterienelimination stattfand und durchweg eine hohe Bakterienzahl über 2000 CFU/mL reisoliert werden konnte, wurde in Gruppe „EC“ 12 h *p. infect.* lediglich bei einem Tier und nach 24 h bei zwei Tieren über 2000 CFU *E. coli*/mL Milch nachgewiesen. Die LPS-Vorbehandlung bewirkte bei den multiparen, puerperalen Kühen dagegen, dass das intramammäre Bakterienwachstum verringert und die Anzahl der Bakterien zunehmend reduziert wurde (siehe IV.2.2.9). Dies deckt sich mit Beobachtungen aus der Literatur, wonach das Bakterienwachstum in Milch nach Endotoxin-Exposition signifikant gehemmt war (LOHUIS *et al.* 1990a). Eine weitere mögliche Erklärung für ein gebremstes Bakterienwachstum könnte die initial erhöhte Zellzahl in der Milch LPS-vorbehandelter Kühe sein (siehe Gruppen „L72EC“ und „pL72EC“ in Abbildung 25). Diese Vermutung wird zum einen durch Beobachtungen aus *In-vitro*-Studien gestützt, in denen gezeigt wurde, dass das Wachstum von *E. coli* in Milch durch sehr hohe Zellzahlen gebremst wird (KORNALIJNSLIJPER *et al.*, 2003). Zum anderen konnte KALIVODA (2010) zeigen, dass nur hochzellige Vollmilch, die 24 h nach intramammärer LPS-Infusion ermilken wurde, die Vermehrung von *E. coli* 1303 hemmte. Für hochzellige Milch (SCC > 600 *10³/ml), die 72 h nach LPS Infusion gewonnen wurde blieb dieser Effekt aus. Die Vermutung, dass lösliche, antimikrobielle Faktoren in der Milch das bakterielle Wachstum im Rahmen der LPS-induzierten Toleranz hemmen, konnte in dieser Studie *in vitro* nicht bestätigt werden.

3.3.3 Die Zusammensetzung der Milch spiegelt den Grad der Entzündung wider

Die durch die experimentelle Infektion ausgelöste entzündliche Reaktion ließ sich auch in den Veränderungen der Milchinhaltsstoffe nachverfolgen, da die Syntheseleistung der Euterepithelzellen einerseits aufgrund von Zellschäden, andererseits durch Reprogrammierung auf immunologische Funktionen eingeschränkt ist (VANSELOW *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2007). Weiterhin ist die Integrität der Blut-Euterschranke gestört.

In diesem Zusammenhang sei besonders auf den Laktosegehalt der Milch hingewiesen. Er gilt als ein wichtiger Indikator der Eutergesundheit, da MEC die Hauptproduzenten dieses Zuckers sind und Zellschäden sich in einer niedrigeren Laktosekonzentration äußern (PYÖRÄLÄ, 2003). Außerdem ist *E. coli* in der Lage, Laktose zu fermentieren (HUGH & LEIFSON, 1953) und trägt so zur Konzentrationsabnahme bei (HARDING, 1995). Ist während einer Mastitis die Integrität der Blut-Milch-Schranke gestört, geht Laktose desweiteren ins Blut über und wird letztendlich über den Harn ausgeschieden (SCHULZ *et al.*, 1998).

Ein weiteres Anzeichen einer Öffnung der Blut-Euter-Schranke ist der Einstrom von Bovinem Serum Albumin in das entzündete Euterviertel (BANNERMAN *et al.*, 2004). Messbar ist dies im Proteingehalt der Milch, der dadurch deutlich ansteigt (MEHNE, 2010) und in einer Angleichung des Milch-pH-Wertes von 6,6 - 6,8 an den des Blutes von 7,4 (TÖPEL, 2007; BRANDT *et al.*, 2010). Die Untersuchungen der Milchproben der unbehandelten Versuchstiere in den Gruppen „EC“ und „pEC“ ergaben eben diese für eine Mastitis typischen Veränderungen: einen statistisch signifikant erniedrigten Laktose- und Fettgehalt, eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration. Der pH-Wert war allerdings entgegen der Erwartungen erniedrigt. Dies ist durch die organischen Säuren, wie beispielsweise Laktat, Azetat oder Sukzinat, die bei der Laktosefermentation durch *E. coli* entstehen (KEATING & RODRÍGUEZ, 1999), zu erklären. Im Gegensatz dazu führte die *E. coli*-Infektion bei keinem der Tiere der Gruppe „L72EC“ zu einer Abweichung von physiologischen Werten bei den Milchinhaltsstoffen (siehe IV.2.2.8). Es zeigte sich auch bei diesen Parametern, dass durch eine LPS-Behandlung eine *E. coli*-Mastitis verhindert werden konnte. Bei den puerperalen, LPS-vorbehandelten Kühen („pL72EC“) hingegen traten Veränderungen der Milchinhaltsstoffe auf. Diese blieben jedoch deutlich hinter denen der beiden

Kontrollgruppen zurück. Die Entzündung war demnach nicht so gravierend ausgeprägt, als dass die Blut-Euter-Schranke gestört gewesen wäre.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass durch eine intramammäre Applikation mit LPS bei Tieren im Frühpuerperium kein vollständiger protektiver Effekt gegen eine Vermehrung von *E. coli* und eine Etablierung der Mastitis induziert werden konnte. Der Verlauf der Euterentzündung konnte jedoch positiv beeinflusst werden: er wurde zeitlich verzögert und das klinische Bild abgemildert.

4 Schlussbetrachtungen und Ausblick

Die vorliegende Dissertation ist Teil eines Forschungsgesamtkonzeptes zur intramammären Immunmodulation und zu frühen Pathogen-Wirt-Interaktionen bei der *E. coli*-Mastitis. Die Induktion einer Immunreaktion in der Zitzenzisterne und die Beobachtungen der Reizweiterleitung in das korrespondierende Drüsenparenchym war ein Ziel dieser Arbeit. Im Laufe der Studie zeigte sich, dass LPS, wenn es lokal begrenzt mit der Zitzenzisterne und der Fürstenberg'schen Rosette interagiert, in der eingesetzten Dosierung und Expositionszeit keine mit den in dieser Arbeit genutzten Untersuchungsparametern messbare Entzündungsreaktion im Euterparenchym initiierte. Konnte LPS dagegen auch mit proximaler gelegenen Arealen (Drüsenzisterne, Drüsenparenchym) in Kontakt treten, wurde eine ausgeprägte Immunantwort im Parenchym induziert. Selbst die Etablierung einer intramammären *E. coli*-Infektion konnte somit verhindert werden. War die LPS-Exposition alleine auf die distalen Anteile beschränkt, war dies nur sehr eingeschränkt der Fall und es kam zu einer klinischen Mastitis.

Innerhalb des Forschungsverbundes konnte jedoch *in vitro* nachgewiesen werden, dass das Gewebe der Zitzenzisterne und der Fürstenberg'schen Rosette auf einen Reiz mit LPS mit einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine reagiert (LIND, 2011). RINALDI *et al.* (2010) beobachteten nach intramammärer Infektion mit *E. coli* eine früher einsetzende gesteigerte Expression immunologisch wichtiger Gene in den distalen Milchdrüsenregionen als in den proximalen. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser beiden Studien und der hier vorliegenden Arbeit kann man schlussfolgern, dass die distalen Milchdrüsenkompartimente pathogene Bestandteile in der initialen Phase einer intramammären Infektion erkennen und eine Entzündungsreaktion einleiten. Die Immunantwort

blieb jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen – mit einer Blockade des milchleitenden Systems – auf die Zitze beschränkt. Pathogenbestandteile und proximale Milchdrüsenanteile müssen also ebenfalls interagieren können, damit die Entzündungskaskade im gesamten Euterviertel initiiert wird. Der durch PFISTER (2009) herausgearbeitete Mastitis-protective Endotoxintoleranz-Effekt konnte durch reine Zitzenexposition mit LPS ebenfalls nicht zuverlässig hervorgerufen werden. Für zukünftige Studien, die sich ebenfalls mit den lokalisationspezifischen Pathogen-Wirt-Interaktionen beschäftigen, gilt es einen Weg zu finden, zeitlich und räumlich begrenzte Proben zu untersuchen, um ein noch genaueres Bild der kompartmentabhängigen Vorgänge zu bekommen.

Die bei PFISTER (2009) und PETZL *et al.* (2011) beschriebenen Resultate zur Endotoxintoleranz im Euter waren der Ausgangspunkt für die Zielsetzung des zweiten Teilprojektes dieser Studie. Bei primiparen Milchkühen, die sich in der Mitte ihrer Laktation befanden, wurde durch intramammäre LPS-Vorbehandlung eine Endotoxintoleranz induziert, die die Tiere vor einer *E. coli*-Mastitis schützte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte dieser Effekt nun auch bei der multiparen und puerperalen Kuh im Sinne einer präventiven Maßnahme genutzt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass auch bei der puerperalen Kuh eine Reaktion auf LPS, wenn auch in geringerem Maße, induzierbar war. Die darauffolgende Endotoxintoleranz hatte nicht die gleiche schützende Wirkung wie bei Kühen in der Mitte ihrer ersten Laktation. Die experimentell induzierte *E. coli*-Mastitis konnte nicht verhindert werden. Ihr Verlauf jedoch konnte positiv beeinflusst: Die Euterentzündung wurde zeitverzögert klinisch apparent und die Symptome fielen durch die LPS-Vorbehandlung milder aus. Dies ist als Teilerfolg und als Entwicklungsschritt auf dem Weg zur Entwicklung neuer Konzepte zur Mastitisprophylaxe zu werten.

In nachfolgenden Forschungsvorhaben bleibt deshalb zu untersuchen, ob ein früherer Behandlungszeitpunkt, beispielsweise während der Trockenstehphase, ein verbessertes Ergebnis mit sich bringt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass LPS in der Art, wie es in dieser Arbeit eingesetzt wurde, nur einen zeitlich begrenzten, transienten Effekt hat. Für den Einsatz in der Trockenstehphase müsste die Applikationsform optimiert werden. Verabreichung des Wirkstoffs in Depotform, wiederholte Applikation oder Formulierungen, die den Wirkstoff permanent freisetzen, sind zu prüfende Lösungsansätze. Desweiteren sollte geprüft werden, ob eine

erhöhte Applikationsdosis die gewünschte Endotoxintoleranz und damit den Schutz vor einer klinischen Erkrankung auslösen kann. Dabei müsste sorgsam das Auftreten stärkerer Nebenwirkungen beobachtet werden. Gegenmaßnahmen wären beispielsweise die Beschränkung auf den LPS-Bestandteil Lipid A als Wirkstoff oder die Verwendung synthetischer TLR-Agonisten, die bei gleicher Wirkung weniger toxisch sind.

Abschließend ist festzustellen, dass die Ergebnisse dieser Dissertation auch deutlich machen, in welcher komplexen Immunsituation sich die puerperale Kuh befindet. Zum besseren Verständnis bedarf es noch weiterer intensiver Forschung. Die Erkenntnisse dieser Arbeit haben einen gewissen Teilerfolg im Hinblick auf die Prävention der akuten *E. coli*-Mastitis erbracht. Künftige Untersuchungen der eigenen Forschungsgruppe sollen daran anknüpfen, um die frühen Wirt-Pathogen-Interaktionen während einer intramammären Infektion mit *E. coli* zu verstehen und innovative und erfolgreiche Prophylaxekonzepte zu entwickeln.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Katharina Waldmüller:

Induktion einer mammären Endotoxintoleranz zur Mastitis-Prophylaxe bei der puerperalen Kuh

Milchkühe im geburtsnahen Zeitraum können in Folge einer intramammären Infektion mit *Escherichia coli* (*E. coli*) schwer erkranken. Nicht selten kommt es in einem solchen Fall zum septischen Schockgeschehen und letztendlich zum Tod des Tieres. Bis zum heutigen Tag existieren keine befriedigenden Prophylaxe- und Therapiekonzepte.

Ausschlaggebend bei der Pathogenese der *E. coli*-Mastitis ist die zunächst ungehinderte und schnelle Bakterienvermehrung. Der dabei freigesetzte Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) wird von Pathogenerkennungsrezeptoren des unspezifischen Immunsystems erkannt und löst über eine Signalkaskade eine streng regulierte Entzündungsreaktion aus. Ist diese Erkennungsreaktion verzögert, kommt es zu ungehemmtem bakteriellen Wachstum und zu einer überschießenden Immunantwort, die sich in einer schweren Entzündungsreaktion mit hochgradiger Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens manifestiert.

Ein neuer Ansatz für ein Behandlungskonzept der *E. coli*-Mastitis beruht auf dem Prinzip der Endotoxintoleranz. Wird ein Organismus wiederholt einem Erreger oder einem seiner Bestandteile ausgesetzt, kann die Entzündungsreaktion in geringerem Maße oder sogar ganz ausfallen. Die antibakterielle Aktivität des Immunsystems bleibt währenddessen jedoch erhalten; sie kann sogar gesteigert sein. In einer dieser Arbeit vorausgegangenen Studie (PFISTER, 2009) konnte im Tiermodell mit erstlaktierenden Kühen (3.-5. Monat der Laktation, <50.000 Zellen/mL Milch, allgemein gesund) gezeigt werden, dass eine durch intramammäre Gabe von 1 µg LPS induzierte Endotoxintoleranz das behandelte Tier vor der Etablierung einer nachfolgenden experimentellen Infektion mit *E. coli* schützt.

Der Zitze als Ort des ersten Erregerkontaktes mit dem Immunsystem des Wirts wird eine wichtige Rolle in der frühen Pathogenerkennung und Stimulierung der Abwehr zugesprochen. Inwiefern diese frühe Interaktion zu einer „Alarmierung“ des gesamten Euterviertels führt, sollte in dieser Arbeit im Rahmen eines Teilprojektes untersucht werden. Hierzu wurden drei laktierende Milchkühe der Rasse

Holstein-Friesian intrazisternal mit 10 µg LPS vorbehandelt. Um die Wirt-Pathogen-Interaktion auf die Zitzenzisterne zu beschränken, wurde die Verbindung zwischen Zitzen- und Drüsenzisterne mit Hilfe einer Zitzenklemme blockiert. Die LPS-Exposition wurde auf 30 min beschränkt, die Zitze dann mehrfach gespült und das Euter anschließend vollständig ausgemolken. Die Tiere zeigten innerhalb der ersten 3 h nach LPS-Exposition palpatorisch geringgradig derbere Zitzen. Die Körpertemperatur stieg nicht an. Auch die Zellzahl der Milch erhöhte sich nicht signifikant (von 59 [27 - 124]*10³ Zellen/mL Milch auf 549 [301 -2627]*10³ Zellen/mL Milch, Median ± IQR). Zur Kontrolle, ob diese kurzzeitige LPS-Exposition mit 10 µg LPS überhaupt eine Entzündungsreaktion auslösen kann, wurden je ein Viertel dreier Kühe für 30 min 10 µg LPS exponiert, ohne dabei jedoch die Verbindung zwischen Zitzen- und Drüsenzisterne zu blockieren. Diese Tiere reagierten systemisch mit kurzzeitigem Fieber (durchschnittliche Höchsttemperatur: 40,1 ± 0,83°C, MW ± SEM) und lokal vor allem mit einem Zellanzug in der Milch auf maximal 9,99 (9,99 - 29,9)*10⁶ Zellen/mL Milch (Median ± IQR). Eine 72 h später erfolgende experimentelle intramammäre Inokulation von 500 CFU *E. coli* führte bei 2 der 3 Tiere mit lokal-begrenzter LPS-Exposition zu einer Etablierung der Infektion und Entwicklung einer Mastitis. Dagegen blieb eine Reaktion in den Eutervierteln aus, die nur kurzzeitig aber nicht räumlich beschränkt dem LPS ausgesetzt waren. Hier konnte sich eine Euterentzündung in den ersten 36 h *post infectionem* (*p. infect.*) nicht etablieren. Damit wurde gezeigt, dass sich der beschriebene protektive Einfluss der Vorbehandlung mit LPS nach alleiniger Exposition der Zitze nur in eingeschränktem Maße einstellte. Es wurde jedoch zum ersten Mal gezeigt, dass eine nur 30minütige LPS-Exposition eines Euterviertels diesen gewünschten Effekt hervorrief.

Ziel der Studie war es ferner, zu überprüfen, ob die LPS-induzierte Immuntoleranz auch bei multiparen, puerperalen Kühen reproduzierbar ist. Ausgewählt wurden 9 multipare Kühe der Rasse Holstein-Friesian, die klinisch allgemein- und eutergesund waren. Fünf der Tiere wurde 36 - 48 h *p. p.* intramammär mit 1 µg LPS vorbehandelt. Nach Ablauf von weiteren 72 h erfolgte eine Inokulation mit 500 CFU (Colony Forming Units) *E. coli* in das Euterviertel mit dem niedrigsten Milchzellgehalt. Die anderen 4 Tiere erhielten keine Vorbehandlung, wurden aber in einem Zeitraum von 72 - 156 h nach der Kalbung entsprechend mit *E. coli*

infiziert. Daten aus vorausgegangenen Studien (PFISTER, 2009 und MEHNE, 2010) an erstlaktierenden Milchkühen in der Mitte ihrer Laktation wurden zum Vergleich herangezogen. Es zeigte sich, dass die 5 puerperalen, mit LPS-vorbehandelten Tiere im Gegensatz zu den erstlaktierenden, mit LPS-vorbehandelten Tieren schwächer auf die alleinige LPS-Behandlung reagierten. Neben dem Ausbleiben einer Temperaturerhöhung beschränkten sich lokale Entzündungsanzeichen auf eine transiente und leichte Erhöhung des SCC (Somatic Cell Count; von $183,5 [119,5 \pm 475,5] \cdot 10^3$ Zellen/mL Milch auf durchschnittlich maximal $2338,5 [1613 \pm 5360] \cdot 10^3$ Zellen/mL Milch).

Bei der nachfolgenden *E. coli*-Infektion wurde deutlich, dass der protektive Effekt, wie er bei erstlaktierenden Kühen in der Mitte der Laktation beobachtet werden konnte, bei den puerperalen multiparen Tieren nicht im gleichen Maße induziert werden konnte. So waren die Kühe nicht vollkommen vor der Etablierung einer Mastitis geschützt werden. Allerdings konnte im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Kontrolltieren – sowohl zu den erstlaktierenden als auch den multiparen puerperalen – ein abmildernder Effekt auf den zeitlichen Verlauf und die klinische Symptomatik der Mastitis dokumentiert werden. Die Erhöhung der rektalen Körpertemperatur, die Störung des Allgemeinbefindens und die lokalen klinischen Symptome am Euter (Erhöhung des SCC) traten später im Durchschnitt 3 h später auf und waren weniger stark ausgeprägt.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass eine intramammäre LPS-Vorbehandlung puerperaler, multiparer Kühe die klinische Ausprägung einer *E. coli*-Mastitis abmildernd beeinflusst. Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede zu primiparen Milchkühen in der Mitte der Laktation sollten Anlass geben, die grundlegenden Mechanismen für diese unterschiedliche Reaktionsweise molekularbiologisch aufzuklären. Bei den aktuellen Bestrebungen zur Entwicklung von Immunmodulatoren zur Prophylaxe und Therapie von Mastitiden muss dem Laktationsstadium und der Parität eine starke Beachtung geschenkt werden.

Gefördert durch die Firma Pfizer Animal Health Europe.

VII SUMMARY

Katharina Waldmüller:

Induction of a Mammary Endotoxin Tolerance as Mastitis-Prophylaxis in the Puerperal Cow

Post partum dairy cows are prone to develop a severe clinical mastitis caused by an intramammary infection with *Escherichia coli* (*E. coli*). The cases of acute disease can be associated with septic shock syndrome and sometime cause death. Despite of great impact in research for mastitis-prophylaxis and therapy, results fall short of expectations.

Upon replication and death the *E. coli* cell wall component, Lipopolysaccharide (LPS), is dissolved and interacts with specialized pattern recognition receptors of the host's innate immune system. This reaction initiates a highly regulated inflammatory cascade. Any delay in the host-pathogen-interaction is followed by unimpeded bacterial growth. The host's immune system reacts with severe inflammation manifested by a highly disturbed general condition of the affected cow. Hence, the most important limiting factors for the outcome of the infection are rapid pathogen recognition and immediate immune response.

A new approach to prophylaxis and therapy of *E. coli*-Mastitis takes advantage of the phenomenon of endotoxin tolerance: after repeated exposure to pathogens or one of their components the host's immune system responds with a reduced inflammatory reaction; moreover its bactericidal capacity is enhanced. PFISTER (2009) was able to show that intramammary induction of endotoxin tolerance can protect primiparous, midlactating cows from acute clinical *E. coli*-Mastitis.

After passing the teat canal orifice the first host-pathogen-interaction takes place in the distal parts of the bovine teat. Thus, the teat is supposed to play an important role in pathogen identification and activation of the immune response. The first aim of the current study was to examine the teat's function in initiating the inflammatory cascade. The question raised was whether restricted inflammatory stimulus to the teat cistern is sufficient to influence the immune response in the corresponding udder quarter. Three midlactating primiparous Holstein-Friesian-cows were treated intracisternally for 30 min with 10 µg LPS. The LPS-host-interaction was restricted to the teat cistern by blocking the

transition from teat cistern to gland cistern using a teat clamp (commonly applied in teat surgery). Only a few signs of an inflammatory reaction appeared: a temporarily firmer teat tissue; and an increase of the somatic cell count (SCC) in the milk (statistically not significant: starting with 59 [27-124] $\times 10^3$ cells/mL milk to 549 [301-2627] $\times 10^3$ cells/mL milk, Median \pm IQR). Furthermore, the body temperature remained at subfebrile levels throughout the whole observation period. In addition, in one of each of the three cows' udder quarters no teat clamp was applied so that the LPS could diffuse in the more proximal regions of the udder quarter in the same period of time. These cows showed remarkable signs of an immune response: the rectal body temperature ($40,1 \pm 0,83^\circ\text{C}$, Mean \pm SEM) and the quarter's milk SCC were significantly increased (9,99 [9,99-29,9] $\times 10^6$ cells/mL milk, Median \pm IQR). The inoculation of 500 CFU (Colony Forming Units) *E. coli* 72 h later did not result in any establishment of an *E. coli*-mastitis. Whereas in the group where the LPS-infusion was limited to the teat cistern, two of the three cows developed acute clinical mastitis.

In conclusion, this study showed that a short term, but not locally restricted LPS-stimulus is sufficient to initiate the inflammatory cascade in the udder quarter followed by the induction of endotoxin tolerance. This tolerance is potent enough to act protectively against an intramammary *E. coli*-infection.

The second aim of the study was to test for the efficacy of endotoxin tolerance in multiparous, puerperal cows as an *E. coli*-mastitis-prophylaxis. Nine clinically healthy multiparous cows had been selected for this trial. They all had no history of mastitis. Each udder quarter of five cows was treated intramammarily with 1 μg LPS at 36 to 48 h after calving. After another 72 h the quarter with the lowest SCC was selected for *E. coli*-challenge. The other 4 cows received no LPS-pretreatment. They served as control animals and therefore were also challenged with 500 CFU *E. coli* in the udder quarter with the lowest SCC. In addition, data from results of previous studies on LPS-pretreatment and *E. coli*-challenge of primiparous midlactating cows (MEHNE 2010 and PFISTER 2009) were used for comparison. The multiparous, puerperal cows showed a milder inflammatory reaction to the LPS pretreatment than midlactating heifers. The single sign of immune response was a slight increase in the milk's SCC (starting from 183,5 [119,5 \pm 475,5] $\times 10^3$ cells/mL milk to 2338,5 [1613 \pm 5360] $\times 10^3$ cells/mL milk). With the following *E. coli*-challenge it became clear, that the LPS-pretreatment of

the puerperal cows did not have the same protective effect as seen in midlactating heifers. They all developed an acute clinical mastitis. Although, it must be mentioned, that the mastitis symptoms of those pretreated puerperal cows appeared later (on average 3 h) and in a lower extent.

In conclusion, this study showed that the clinical appearance of acute *E. coli*-mastitis in puerperal cows can be positively influenced by LPS treatment. The differences to midlactating heifers seen throughout this study give cause to investigate the basic mechanisms lying beneath those different reactions on the molecular level. Furthermore the state of lactation and parity should be taken into account when developing immune-modulators for mastitis therapy and prophylactic strategies.

Supported by Pfizer Animal Health Europe.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS EW, RICKARD CG. The antistreptococcic activity of bovine teat canal keratin. *Am J Vet Res* 1963; 24: 122-35.

AN MJ, CHEON JH, KIM SW, PARK JJ, MOON CM, HAN SY, KIM ES, KIM TI, KIM WH. Bovine colostrum inhibits nuclear factor kappaB-mediated proinflammatory cytokine expression in intestinal epithelial cells. *Nutr Res* 2009; 29: 275-80.

ANDERSON KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-9.

BANNERMAN DD, PAAPE MJ, HARE WR, SOHN EJ. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3128-37.

BEESON PB. Tolerance to Bacterial Pyrogens: I. Factors Influencing Its Development. *J Exp Med* 1947; 86: 29-38.

BISWAS SK, LOPEZ-COLLAZO E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 2009; 30: 475-87.

BRADLEY A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 2002; 164: 116-28.

BRANDT M, HAEUSSERMANN A, HARTUNG E. Invited review: Technical solutions for analysis of milk constituents and abnormal milk. *J Dairy Sci* 2010; 93: 427-36.

BROAD A, JONES DE, KIRBY JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2487-502.

BRUCKMAIER RM. Gene expression of factors related to the immune reaction in response to intramammary *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Res* 2005; 72 Spec No: 120-4.

BURKHARDT F (1992) Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart: Thieme Verlag.

BURTON JL, KEHRLI ME, JR., KAPIL S, HORST RL. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 317-25.

BURTON JL, MADSEN SA, YAO J, SIPKOVSKY SS, COUSSENS PM. An immunogenomics approach to understanding periparturient immunosuppression and mastitis susceptibility in dairy cows. *Acta Vet Scand* 2001; 42: 407-24.

BURTON JL, ERSKINE RJ. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003; 19: 1-45, v.

BURTON JL, MADSEN SA, CHANG LC, WEBER PS, BUCKHAM KR, VAN DORP R, HICKEY MC, EARLEY B. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105: 197-219.

BURVENICH C, VAN MERRIS V, MEHRZAD J, DIEZ-FRAILE A, DUCHATEAU L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003; 34: 521-64.

BURVENICH C, BANNERMAN DD, LIPPOLIS JD, PEELMAN L, NONNECKE BJ, KEHRLI ME, JR., PAAPE MJ. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J Dairy Sci* 2007; 90 Suppl 1: E39-54.

CAI TQ, WESTON PG, LUND LA, BRODIE B, MCKENNA DJ, WAGNER WC. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res* 1994; 55: 934-43.

CAROFF M, KARIBIAN D, CAVAILLON JM, HAEFFNER-CAVAILLON N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002; 4: 915-26.

CARROLL EJ, SCHALM OW, LASMANIS J. Experimental coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis: bacteria and host factors in virulence and resistance. *Am J Vet Res* 1969; 30: 1795-804.

CAVAILLON JM, ADIB-CONQUY M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006; 10: 233.

CECILIANI F, GIORDANO A, SPAGNOLO V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett* 2002; 9: 211-23.

COLLINS RA, PARSONS KR, BLAND AP. Antibody-containing cells and specialised epithelial cells in the bovine teat. *Res Vet Sci* 1986; 41: 50-5.

CROSS AS. Endotoxin tolerance-current concepts in historical perspective. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 83-98.

WEISS E. 2007. Milchdrüse. In: DAHME E, WEISS E (Hrsg). Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 6. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 227-31.

DEGRAVES FJ, FETROW J. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993; 9: 421-34.

DEL FRESNO C, GARCIA-RIO F, GOMEZ-PINA V, SOARES-SCHANOSKI A, FERNANDEZ-RUIZ I, JURADO T, KAJIJI T, SHU C, MARIN E, GUTIERREZ DEL ARROYO A, PRADOS C, ARNALICH F, FUENTES-PRIOR P, BISWAS SK, LOPEZ-COLLAZO E. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol* 2009; 182: 6494-507.

DIEZ-FRAILE A, MEYER E, DUCHATEAU L, BURVENICH C. L-selectin and beta2-integrin expression on circulating bovine polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2334-42.

DÖPFER D, NEDERBRAGT H, ALMEIDA RA, GAASTRA W. Studies about the mechanism of internalization by mammary epithelial cells of *Escherichia coli* isolated from persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol* 2001; 80: 285-96.

- DOSOGNE H, CAPUCO AV, PAAPE MJ, ROETS E, BURVENICH C, FENWICK B. Reduction of acyloxyacyl hydrolase activity in circulating neutrophils from cows after parturition. *J Dairy Sci* 1998; 81: 672-7.
- DUDA KA, LINDNER B, BRADE H, LEIMBACH A, BRZUSZKIEWICZ E, DOBRINDT U, HOLST O. The lipopolysaccharide of the mastitis isolate *Escherichia coli* strain 1303 comprises a novel O-antigen and the rare K-12 core type. *Microbiology* 2011;
- FAN H, COOK JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 71-84.
- FERREIRA ME, COELHO MM, PELA IR. Role of the hepatic function in the development of the pyrogenic tolerance to muramyl dipeptide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R162-9.
- FETEROWSKI C, WEIGHARDT H, EMMANUILIDIS K, HARTUNG T, HOLZMANN B. Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1268-77.
- FOSTER SL, MEDZHITOV R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology* 2009; 130: 7-15.
- FREUDENBERG MA, GALANOS C. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int Rev Immunol* 1990; 6: 207-21.
- GOFF JP, HORST RL. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1260-8.
- GÜNTHER J, KOCZAN D, YANG W, NÜRNBERG G, REPSILBER D, SCHUBERTH HJ, PARK Z, MAQBOOL N, MOLENAAR A, SEYFERT HM. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res* 2009; 40: 31.
- GÜRTLER H, SCHWEIGERT FJ. 2005. Physiologie der Laktation. In: ENGELHARDT W, BREVES G (Hrsg.). Physiologie der Haustiere. 3.Aufl. Stuttgart: Enke, 552-73.
- JAINUDEEN MR, HAFEZ ESE. 2000. Gestation, Prenatal Physiology and Parturition. In: HAFEZ B, HAFEZ ESE. Reproduction in farm animals. 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 149-52.
- HARDING F. 1995. Milk quality. 1. ed. New York: Blackie Academic & Professional
- HIBBITT KG, COLE CB, REITER B. Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *J Gen Microbiol* 1969; 56: 365-71.
- HIBBITT KG, BENIANS M. Some effects in vivo of the teat canal and effects in vitro of cationic proteins on *Staphylococci*. *J Gen Microbiol* 1971; 68: 123-8.
- HILL AW, SHEARS AL, HIBBITT KG. The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in newly calved dairy cows. *Res Vet Sci* 1979; 26: 97-101.

HIRSCHFELD M, MA Y, WEIS JH, VOGEL SN, WEIS JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 2000; 165: 618-22.

HOBLET KH, SCHNITKEY GD, ARBAUGH D, HOGAN JS, SMITH KL, SCHOENBERGER PS, TODHUNTER DA, HUESTON WD, PRITCHARD DE, BOWMAN GL, *et al.* Costs associated with selected preventive practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 190-6.

HOEBEN D, HEYNEMAN R, BURVENICH C. Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 58: 165-70.

HOEBEN D, BURVENICH C, TREVISI E, BERTONI G, HAMANN J, BRUCKMAIER RM, BLUM JW. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J Dairy Res* 2000; 67: 503-14.

HOGAN J, SMITH KL. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 507-19.

HOGAN JS, SMITH KL, HOBLET KH, SCHOENBERGER PS, TODHUNTER DA, HUESTON WD, PRITCHARD DE, BOWMAN GL, HEIDER LE, BROCKETT BL, *et al.* Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J Dairy Sci* 1989; 72: 1547-56.

HOGVEEN HO, ØSTERÅS O. 2005. Mastitis management in an economic framework. In: Mastitis in dairy production - Current knowledge and future solutions. Wageningen: *Wageningen Academic Publishers*, 41-52.

HUGH R, LEIFSON E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J Bacteriol* 1953; 66: 24-6.

HUIJPS K, LAM TJ, HOGVEEN H. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res* 2008; 75: 113-20.

HUSZENICZA G, JANOSI S, GASPARDY A, KULCSAR M. Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 389-400.

IBEAGHA-AWEMU EM, LEE JW, IBEAGHA AE, BANNERMAN DD, PAAPE MJ, ZHAO X. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet Res* 2008; 39: 11.

JOHNSON JR, STELL AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181: 261-72.

KALIVODA EM. 2010. Funktionelle Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes. [Dissertation]. München: *Ludwig-Maximilians-Universität*.

KEATING PF, RODRÍGUEZ HG (1999) Introducción a la lactología. Mexico: *Limusa*.

KOESS C, HAMANN J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J Dairy Res* 2008; 75: 225-32.

KORNALIJNSLIJPER JE, VAN WERVEN T, DAEMEN AJ, VAN DEN BROEK J, NIEWOLD TA, RUTTEN VP, NOORDHUIZEN-STASSEN EN. In vitro growth of mastitis-inducing *Escherichia coli* in milk and milk fractions of dairy cows. *Vet Microbiol* 2003; 91: 125-34.

KORNALIJNSLIJPER JE, DAEMEN AJ, VAN WERVEN T, NIEWOLD TA, RUTTEN VP, NOORDHUIZEN-STASSEN EN. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol* 2004; 101: 177-86.

LAMOTE I, MEYER E, DUCHATEAU L, BURVENICH C. Influence of 17 β -estradiol, progesterone, and dexamethasone on diapedesis and viability of bovine blood polymorphonuclear leukocytes. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3340-9.

LAMOTE I, MEYER E, DE KETELAERE A, DUCHATEAU L, BURVENICH C. Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 2006; 65: 1082-98.

LEGRAND D, ELASS E, CARPENTIER M, MAZURIER J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 282-90.

LEHNER MD, MORATH S, MICHELSEN KS, SCHUMANN RR, HARTUNG T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001a; 166: 5161-7.

LEHNER MD, ITTNER J, BUNDSCHUH DS, VAN ROOIJEN N, WENDEL A, HARTUNG T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun* 2001b; 69: 463-71.

LEHTOLAINEN T, SUOMINEN S, KUTILA T, PYÖRÄLÄ S. Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2327-33.

LIND M. 2011. Etablierung und Anwendung einer Explantkultur zur Analyse initialer Vorgänge bei der Mastitis des Rindes. [Dissertation]. München: *Ludwig-Maximilians-Universität*.

LOHUIS JA, KREMER W, SCHUKKEN YH, SMIT JA, VERHEIJDEN JH, BRAND A, VAN MIERT AS. Growth of *Escherichia coli* in milk from endotoxin-induced mastitic quarters and the course of subsequent experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J Dairy Sci* 1990a; 73: 1508-14.

LOHUIS JA, SCHUKKEN YH, HENRICKS PA, HEYNEMAN R, BURVENICH C, VERHEIJDEN JH, VAN MIERT AS, BRAND A. Preinfection functions of blood polymorphonuclear leukocytes and the outcome of experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J Dairy Sci* 1990b; 73: 342-50.

LU M, VARLEY AW, OHTA S, HARDWICK J, MUNFORD RS. Host inactivation of bacterial lipopolysaccharide prevents prolonged tolerance following gram-negative bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2008a; 4: 293-302.

- LU YC, YEH WC, OHASHI PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008b; 42: 145-51.
- MADSEN SA, WEBER PS, BURTON JL. Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 86: 159-75.
- MALLARD BA, DEKKERS JC, IRELAND MJ, LESLIE KE, SHARIF S, VANKAMPEN CL, WAGTER L, WILKIE BN. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci* 1998; 81: 585-95.
- MEHNE D, DREES S, SCHUBERTH H-J, SAUTER-LOUIS C, ZERBE H, PETZL W. Accurate and rapid flow cytometric leukocyte differentiation in low and high somatic cell count milk. *Milchwissenschaft* 2010; 65: 3.
- MEHNE D. 2010. Modellhafte Untersuchungen zur Frühphase der Mastitis beim Rind. [Dissertation]. München: *Ludwig-Maximilians-Universität*
- MEHRZAD J, DOSOGNE H, MEYER E, BURVENICH C. Local and systemic effects of endotoxin mastitis on the chemiluminescence of milk and blood neutrophils in dairy cows. *Vet Res* 2001; 32: 131-44.
- MEHRZAD J, PAAPE M, BURVENICH C. Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows. *IJVR* 2010; 11: 102-18.
- MELO ES, BARBEIRO HV, ARIGA S, GOLOUBKOVA T, CURI R, VELASCO IT, VASCONCELOS D, SORIANO FG. Immune cells and oxidative stress in the endotoxin tolerance mouse model. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 57-67.
- MITTERHUEMER S, PETZL W, KREBS S, MEHNE D, KLANNER A, WOLF E, ZERBE H, BLUM H. Escherichia coli infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 2010; 11: 138.
- MONFARDINI E, PAAPE MJ, WANG Y, CAPUCO AV, HUSHEEM M, WOOD L, BURVENICH C. Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition. *Vet Res* 2002; 33: 271-81.
- MORATH S, GEYER A, HARTUNG T. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus. *J Exp Med* 2001; 193: 393-7.
- MOSIMANN W, KOHLER T, ABOU-ELMAGD A. 1990. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Berlin: *Parey Verlag*.
- MÜLLER D, GREUNE L, HEUSIPP G, KARCH H, FRUTH A, TSCHAPE H, SCHMIDT MA. Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3380-90.
- MURPHEY ED, FANG G, VARMA TK, SHERWOOD ER. Improved bacterial clearance and decreased mortality can be induced by LPS tolerance and is not dependent upon IFN-gamma. *Shock* 2007; 27: 289-95.

NGATIA TA, JENSEN NE, BERG BB. Microscopic changes in infected bovine teats. *Br Vet J* 1991; 147: 133-9.

NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E. 2004. Die Milchdrüse des Rindes. In: HABERMEHL K-H, VOLLMERHAUS B, WILKENS H, WAIBL H (Hrsg.). Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band III Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane. 4. Auflage. Stuttgart: Parey Verlag.

NICKERSON SC, PANKEY JW. Cytologic observations of the bovine teat end. *Am J Vet Res* 1983; 44: 1433-41.

NICKERSON SC, PANKEY JW. Neutrophil migration through teat end tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci* 1984; 67: 826-34.

NICKERSON SC, PANKEY JW. Electron microscopic study of leucocytic infiltration of the mammary teat duct during infection with *Staphylococcus aureus*. *Res Vet Sci* 1985; 38: 167-73.

NICKERSON SC. Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191: 1484-8.

NICKERSON SC, WASHBURN PJ, BODDIE NT. Histological response of the bovine mammary gland to intramammary devices. *J Dairy Sci* 1991; 74: 3383-95.

NIKOLIC JA, KULCSAR M, KATAI L, NEDIC O, JANOSI S, HUSZENICZA G. Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50: 22-9.

OPDEBEECK JP, FROST AJ, O'BOYLE D. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet Microbiol* 1988; 16: 77-86.

OSTENSSON K. Total and differential leukocyte counts, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity, and serum albumin content in foremilk and residual milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am J Vet Res* 1993; 54: 231-8.

OVIEDO-BOYSO J, VALDEZ-ALARCON JJ, CAJERO-JUAREZ M, OCHOA-ZARZOSA A, LOPEZ-MEZA JE, BRAVO-PATINO A, BAIZABAL-AGUIRRE VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 2007; 54: 399-409.

PAAPE MJ, MEHRZAD J, ZHAO X, DETILLEUX J, BURVENICH C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 109-21.

PAAPE MJ, CARROLL DW, KRAL AJ, MILLER RH, DESJARDINS C. Corticosteroids, circulating leukocytes, and erythrocytes in cattle: diurnal changes and effects of bacteriologic status, stage of lactation, and milk yield on response to adrenocorticotropin. *Am J Vet Res* 1974; 35: 355-62.

PAAPE MJ, GUIDRY AJ, KIRK ST, BOLT DJ. Measurement of phagocytosis of ³²P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *Am J Vet Res* 1975; 36: 1737-43.

PAAPE MJ, CAPUCO AV, GUIDRY AJ, BURVENICH C. Morphology, Function, and Adaptation of Mammary Cells in Normal and Disease States. *J Anim Sci* 1995; 73(Suppl. 2): 1-17.

- PAAPE MJ, BANNERMAN DD, ZHAO X, LEE JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003; 34: 597-627.
- PALM NW, MEDZHITOV R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 221-33.
- PAREEK R, WELLNITZ O, VAN DORP R, BURTON J, KERR D. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 2005; 46: 171-7.
- PARK YK, KOO HC, KIM SH, HWANG SY, JUNG WK, KIM JM, SHIN S, KIM RT, PARK YH. The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. *J Dairy Sci* 2007; 90: 5405-14.
- PARKER LC, JONES EC, PRINCE LR, DOWER SK, WHYTE MK, SABROE I. Endotoxin tolerance induces selective alterations in neutrophil function. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1301-5.
- PERSSON K, HOLMBERG O, ASTRÖM G. Studies of defence mechanisms and inflammatory reactions in the bovine teat using a new experimental method. *Acta Vet Scand* 1988; 29: 519-20.
- PERSSON K, SANDGREN CH. A study of the development of endotoxin-induced inflammation in the bovine teat. *Acta Vet Scand* 1992; 33: 283-95.
- PERSSON K, SANDGREN CH, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. *Am J Vet Res* 1992; 53: 2235-40.
- PETZL W. 2005. Untersuchungen zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen bei der Mastitis des Rindes. [Dissertation]. München, Hannover: *Ludwig-Maximilians-Universität, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*.
- PETZL W, ZERBE H, GÜNTHER J, YANG W, SEYFERT HM, NÜRNBERG G, SCHUBERTH HJ. Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 2008; 39: 18.
- PETZL W, GÜNTHER J, PFISTER T, SAUTER-LOUIS C, GOETZE L, VON AULOCK S, HAFNER-MARX A, SCHUBERTH HJ, SEYFERT HM, ZERBE H. Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental Escherichia coli mastitis. *Innate Immunity* 2011 (in press).
- PFISTER T. 2009. Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der akuten Mastitis des Rindes. [Dissertation] München: *Ludwig-Maximilians-Universität*.
- POUNDEN WD, GROSSMAN JD. Wall structure and closing mechanisms of the bovine teat. *Am J Vet Res* 1950; 11: 349-54.
- PRIN-MATHIEU C, LE ROUX Y, FAURE GC, LAURENT F, BENE MC, MOUSSAOUI F. Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 812-7.
- PUDDU P, LATORRE D, VALENTI P, GESSANI S. Immunoregulatory role of lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. *Biometals* 2010; 23: 387-97.

PYÖRÄLÄ S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 565-78.

RADOSTITS OM, GAY CC, HINCHCLIFF KW, CONSTABLE PD 2007. Diseases of the mammary gland - Mastitis of cattle associated with common environmental pathogens. In: RADOSTITS OM. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 10th edn. New York: Elsevier.

RAINARD P, RIOLLET C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* 2006; 37: 369-400.

RIETSCHEL ET, KIRIKAE T, SCHADE FU, MAMAT U, SCHMIDT G, LOPPNOW H, ULMER AJ, ZHRINGER U, SEYDEL U, DI PADOVA F, *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; 8: 217-25.

RINALDI M, LI RW, BANNERMAN DD, DANIELS KM, EVOCK-CLOVER C, SILVA MV, PAAPE MJ, VAN RYSSSEN B, BURVENICH C, CAPUCO AV. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics* 2010; 10: 21-38.

ROLLE M, MAYR A. 2007. Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. Lehrbuch für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. Stuttgart: Enke, 427-37.

ROSENBERGER G. 1990. Die Klinische Untersuchung des Rindes. Berlin, Hamburg: Parey.

ROTH JA, KAEBERLE ML, HSU WH. Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers. *Infect Immun* 1982; 35: 997-1002.

ROTHER G. 2009. Technical Background and Methodological Principles of Flow Cytometry. In: SACK U, TÁRNOK A, ROTHER G (Hrsg.). Cellular Diagnostics. Basics, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Basel: Karger, 53-88.

SAAD AM, ASTRÖM G. Effects of exogenous estrogen administration to ovariectomized cows on the blood and milk-leukocyte counts and -neutrophil phagocytosis measured by flow cytometry. *Zentralbl Veterinärmed B* 1988; 35: 654-63.

SCHEIBL P, ZERBE H. [Effect of progesterone on the immune system in consideration of bovine placental retention]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2000; 107: 221-7.

SCHUKKEN YH, WILSON DJ, WELCOME F, GARRISON-TIKOFFSKY L, GONZALEZ RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res* 2003; 34: 579-96.

SCHULZ J, MICHEL G, SEFFNER W. Zur Abwehrfunktion der Zitze des Rindes. *Mh Vet Med* 1974; 29: 662-67.

SCHULZ J, HANISCH T, DUMKE S, SPRINGER S, BECK K. Abfall der Laktosekonzentration in der Kuhmilch als Ausdruck erhöhter Permeabilität der Schranken zwischen Hohlraumssystem des Euters und Blut. *Praktischer Tierarzt* 1998; 79: 657-65.

SEIFERT J, MOLKEWEHRUM M, OESSER S, NEBERMANN L, SCHULZE C. Endotoxin inactivation by enterally applied colostrum of different composition. *Eur Surg Res* 2002; 34: 68-72.

SHING CM, PEAKE JM, SUZUKI K, JENKINS DG, COOMBES JS. Bovine colostrum modulates cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated with lipopolysaccharide and phytohemagglutinin. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29: 37-44.

SHUSTER DE, HARMON RJ, JACKSON JA, HEMKEN RW. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J Dairy Sci* 1991; 74: 3763-74.

SHUSTER DE, LEE EK, KEHRLI ME, Jr. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am J Vet Res* 1996; 57: 1569-75.

SLADEK Z, RYSANEK D. Neutrophil apoptosis during the resolution of bovine mammary gland injury. *Res Vet Sci* 2001; 70: 41-6.

SMITS E, BURVENICH C, GUIDRY AJ, HEYNEMAN R, MASSART-LEEN A. Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 68: 169-76.

SORDILLO LM, NICKERSON SC, AKERS RM, OLIVER SP. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int J Biochem* 1987; 19: 1165-72.

SORDILLO LM, SHAFER-WEAVER K, DEROSA D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1851-65.

STRANDBERG Y, GRAY C, VUOCOLO T, DONALDSON L, BROADWAY M, TELLAM R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 2005; 31: 72-86.

STREYL D, SAUTER-LOUIS C, BRAUNERT A, LANGE D, WEBER F, ZERBE H. Establishment of a standard operating procedure for predicting the time of calving in cattle. *J Vet Sci* 2011; 12: 177-85.

SUOJALA L, ORRO T, JARVINEN H, SAATSI J, PYORALA S. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet Scand* 2008; 50: 18.

SURIYASATHAPORN W, DAEMEN AJ, NOORDHUIZEN-STASSEN EN, DIELEMAN SJ, NIELEN M, SCHUKKEN YH. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 68: 177-86.

SURIYASATHAPORN W, HEUER C, NOORDHUIZEN-STASSEN EN, SCHUKKEN YH. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet Res* 2000; 31: 397-412.

THOMSON RG, MCGAVIN MD, CARLTON W, ZACHARY JF (2001) Thomson's special veterinary pathology. St. Louis: Mosby.

TÖPEL A (2007) Chemie und Physik der Milch. Hamburg: Behr's Verlag.

VAN AMERSFOORT ES, VAN BERKEL TJ, KUIPER J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 379-414.

VANSELOW J, YANG W, HERRMANN J, ZERBE H, SCHUBERTH HJ, PETZL W, TOMÉK W, SEYFERT HM. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 463-77.

WEISS DJ, WARDROP KJ (Hrsg.). 2011. SCHALM OW (2010) Schalm's veterinary hematology. Hoboken: *Wiley-Blackwell*.

WENZ JR, BARRINGTON GM, GARRY FB, DINSMORE RP, CALLAN RJ. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 567-72.

WEST MA, HEAGY W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 2002; 30: S64-S73.

WHEELER DS, LAHNI PM, DENENBERG AG, POYNTER SE, WONG HR, COOK JA, ZINGARELLI B. Induction of endotoxin tolerance enhances bacterial clearance and survival in murine polymicrobial sepsis. *Shock* 2008; 30: 267-73.

YANG W, ZERBE H, PETZL W, BRUNNER RM, GÜNTHER J, DRAING C, VON AULOCK S, SCHUBERTH HJ, SEYFERT HM. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 2008; 45: 1385-97.

ZERBE H, SCHNEIDER N, OSSADNIK C, WENSING T, KRUIP T, GRUNERT E, LEIBOLD W. Eigenschaften neutrophiler Granulozyten aus Blut und Uterus peripartaler Kühe. *Wien Tierärztl Mschr* 1998; 85: 304-09.

ZERBE H, SCHNEIDER N, LEIBOLD W, WENSING T, KRUIP TA, SCHUBERTH HJ. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 2000; 54: 771-86.

ZIV G, HARTMAN I, BOGIN E, ABIDAR J, SARAN A. Endotoxin in Blood and Milk and Enzymes in the Milk of Cows During Experimental *Escherichia coli* Endotoxin Mastitis. *Theriogenology* 1976; 6: 343-52.

IX DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und seine hervorragende Betreuung. Sein persönliches Engagement und seine stets prompte Hilfeleistung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Wolfram Petzl für die hervorragende Betreuung und die herzliche Arbeitsatmosphäre. Für wirklich jede Frage hatte er ein offenes Ohr und stand auch zu unmenschlichen Zeiten stets mit Rat und Tat bereit.

Der Firma Pfizer Animal Health danke ich für die Finanzierung des Projekts und die Stellenförderung. So war es mir möglich meine volle Konzentration auf die Arbeit zu richten. Insbesondere danke ich Dr. Isabelle Dieuzy-Labaye und Dr. Leopold Götze für die fachliche Beratung und konstruktiven Diskussionen.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Tobias Pfister und Daniel Mehne bedanken. Sie haben mich bei der Einarbeitung in das Thema, die Technik und die Methoden in großem Maße unterstützt und die Daten aus ihren Arbeiten bereitwillig für Vergleichszwecke bereitgestellt.

Mein Dank gilt auch allen Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Klinik für Wiederkäuer für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, die Einarbeitung in die Kunst des Melkens, die liebevolle und sorgfältige Betreuung meiner Versuchstiere. In diesem Zusammenhang danke ich ganz besonders Kerstin Richter und Matthias Berger, die die Tiere von manchmal sehr weit abgelegenen Höfen in die Klinik transportiert haben.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse bedanke ich mich bei Frau Dr. Carola Sauter-Louis und Frau Sonja Eberle, die mir kurzfristig beiseite gestanden ist.

Frau Rita Radloff, Frau Sybille Kirsch danke ich für ihre Herzlichkeit und ihre Hilfe bei allen großen und kleinen Verwaltungsangelegenheiten.

Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Christina Beyer, Frau Ingrid Hartmann und Frau Monika Altmann für die nette Zusammenarbeit und die schnelle und zuverlässige Bearbeitung der Blutproben.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathologie des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, ganz besonders Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Hafner-Marx, danke ich für die unkomplizierte und zuvorkommende Hilfe bei der Sektion der Versuchstiere.

Ein riesengroßer Dank gilt Frau Monique Lind und Frau Katharina Mühlbauer. Für die Zusammenarbeit, ihre Hilfe und entstandene Freundschaft bin ich unglaublich dankbar. Ohne die beiden wären die Versuchswochen nicht durchzustehen gewesen.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und ganz besonders bei Dir, lieber Arni. Ohne Euch, Eure Unterstützung und das immer wiederkehrende Korrekturlesen wäre diese Arbeit nie möglich gewesen!