

**Untersuchung des Haplotyp-abhängigen
Milchdifferentialzellbildes, der Milchinhaltsstoffe sowie der
Vaginaltemperatur in einem bovinen intramammären
Infektionsmodell mit *Escherichia coli* und
*Staphylococcus aureus***

von Katharina Mareike Müller-Langhans

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

**Untersuchung des Haplotyp-abhängigen
Milchdifferentialzellbildes, der Milchhaltsstoffe sowie der
Vaginaltemperatur in einem bovinen intramammären
Infektionsmodell mit *Escherichia coli* und
*Staphylococcus aureus***

von Katharina Mareike Müller-Langhans

aus Villingen-Schwenningen

München 2025

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

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Wolfram Petzl

Mitbetreuung durch:

Dr. Marie Margarete Meyerholz-Wohllebe

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolfram Petzl

Korreferent: Prof. Dr. Armin M. Scholz

Tag der Promotion: 08. Februar 2025

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Die folgende Publikation ist in dieser kumulativen Dissertationsschrift enthalten:

Katharina Müller-Langhans, Lisa Oberberger, Yury Zablotski, Susanne Engelmann,
Martina Hoedemaker, Christa Kühn, Hans-Joachim Schuberth, Holm Zerbe,
Wolfram Petzl, Marie Margarete Meyerholz-Wohllebe

Cows with diverging haplotypes show differences in differential milk cell count, milk parameters and vaginal temperature after *S. aureus* challenge but not after *E. coli* challenge

<https://doi.org/10.1186/s12917-024-03996-y>

BMC Veterinary Research (2024) 20:200

Received 05 January 2024; Accepted 27 March 2024; Published online 15 May 2024

Für meine Familie mit allen Zwei- und Vierbeinern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
1.	Die Mastitis des Rindes: Ätiologie und Pathogenese.....	4
1.1.	Einteilung von Mastitiden	4
1.2.	Management- & umweltassoziierte Faktoren	5
1.3.	Kuhassoziierte Faktoren.....	7
2.	Mastitis-Erreger	8
2.1.	<i>S. aureus</i>	8
2.2.	<i>E. coli</i>	9
3.	Die Rolle des Immunsystems bei der Infektabwehr im Euter	11
3.1.	Lokale und systemische Wirtsreaktion bei Mastitis.....	12
3.2.	Immunzellen in der Milch.....	13
3.2.1.	Neutrophile Granulozyten (PMN).....	13
3.2.2.	Lymphoide Zellen	15
3.2.3.	Makrophagen.....	17
4.	Mastitisiagnostik	18
4.1.	Somatische Zellzahl (Somatic cell count – SCC)	18
4.2.	Milchdifferentialzellbild (Differential milk cell count – DMCC)	19
4.2.1.	Durchflusszytometrische Bestimmung des DMCC	19
4.2.2.	Einsatzmöglichkeiten des DMCC in der Mastitisiagnostik	21
5.	Milchinhaltstoffe und ihre Dynamik während einer Mastitis	23
5.1.	Milchinhaltstoffe.....	23
5.1.1.	Fett.....	23
5.1.2.	Protein	24
5.1.3.	Laktose	24
5.1.4.	pH.....	25
5.2.	Veränderungen der Milchinhaltstoffe während einer Mastitis	25
6.	Dynamik der Körpertemperatur während einer Mastitis.....	27
7.	Genetische Selektion auf reduzierte Empfänglichkeit gegenüber Mastitiserregern	29

8.	Bayesische Modelle.....	32
III.	PUBLIKATION	34
IV.	DISKUSSION	51
1.	Haplotyp-spezifischer Effekt auf den DMCC.....	53
2.	Pathogen-spezifischer Effekt auf den DMCC.....	56
3.	PMN und SCC als Mastitis-Indikatoren.....	57
4.	Pathogen- und Haplotyp-spezifischer Effekt auf die Körpertemperatur.....	59
5.	Pathogen- und Haplotyp-spezifischer Effekt auf die Milchinhaltsstoffe	62
V.	ZUSAMMENFASSUNG	66
VI.	SUMMARY.....	69
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
VIII.	ANHANG	94
1.	Additional Figure 1	94
2.	R-Skripte	96
2.1.	DMCC	96
2.2.	Milk parameters.....	97
2.3.	Vaginal temperature	98
IX.	DANKSAGUNG	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BLE – Bundeministerium für Landwirtschaft und Ernährung	nm – Nanometer
BTA – <i>bos taurus</i> Autosom-18	PAMP – engl.: ‘pathogen associated molecular pattern’
CMT – California Mastitis Test	PJ – Propidiumjodid
DMCC – engl.: ‘differential milk cell count’	PMN – engl.: ‘polymorphnuclear cells’
DVG – Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft	PRR – engl.: ‘pattern recognition receptor’
<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>	QTL – engl.: ‘quantitative trait loci’
FL – Fluoreszens-Licht	ROS – engl.: ‘reactive oxygen species’
FSC – engl.: ‘forward scatter’	Strep. – Streptococcus
h – Stunde	spp. – Subspezies
IL – Interleukin	SCC – engl.: ‘somatic cell count’
kg – Kilogramm	SSC – engl.: ‘side scatter’
LPS – Lipopolysaccharid	<i>S. aureus</i> – <i>Staphylococcus aureus</i>
LTA – Lipoteichonsäure; engl.: ,lipoteichoic acid‘	TLR – Toll-like-Rezeptor
MEC – Milchdrüsenepithelzellen; engl.: ‘mammary epithelial cells’	TNF – Tumor-Nekrose-Faktor
ml – Milliliter	z.B. – zum Beispiel
MHC – engl.: ‘major histocompatibility complex’	°C – Grad Celsius
mRNA – messenger RNA	% – Prozent
µm – Mikrometer	€ – Euro
NK – Natürliche Killerzellen	

I. EINLEITUNG

Die Mastitis ist eine der häufigsten Krankheiten bei Milchkühen auf der ganzen Welt (HALASA et al., 2007; HOGEVEEN et al., 2011; DE VLIEGHER et al., 2012). Einerseits beeinträchtigt jede Mastitis das Wohlbefinden des betroffenen Tieres, andererseits hat ein häufiges Auftreten dieser Erkrankung einen starken Einfluss auf die Rentabilität von Milchviehbetrieben (JANZEN, 1970; RUEGG, 2017). Die hohen finanziellen Verluste für die Milchindustrie werden durch direkte und indirekte Auswirkungen auf die Milchqualität und Milchmenge verursacht (RUEGG & REINEMANN, 2002). Laut Untersuchungen von BLUDAU et al. (2014) sowie HILLERTON und BERRY (2005) zeigen 20-50 % aller laktierenden Milchkühe innerhalb eines Jahres in mindestens einem Euterviertel eine Mastitis.

Aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen ist die frühzeitige und wirksame Mastitisiagnostik und -behandlung auch in Zukunft für die Gesundheit von Menschen und Tieren von wesentlicher Bedeutung (PYÖRÄLÄ, 2002; TREVISI et al., 2014). So gilt es, Mastitiden bereits im Frühstadium zu erkennen, damit Management und Behandlung angepasst werden können. Derzeit wird in erster Linie die erhöhte somatische Zellzahl in der Milch (SCC - somatic cell count) zur Erkennung von Mastitiden verwendet. Darüber hinaus wird das Differentialmilchzellbild (DMCC – differential milk cell count) als vielversprechende Methode zur frühen Erkennung von Mastitiden diskutiert. Mittels Durchflusszytometrie werden dabei überwiegend die verschiedenen Leukozytenpopulationen in der Milch differenziert. Dieses Vorgehen ermöglicht eine frühere und präzisere Analyse von Veränderungen der Zusammensetzung der Milchzellpopulationen (FARSCHTSCHI et al., 2022). Die Pathogen-spezifischen Veränderungen während einer Mastitis hinsichtlich der Zusammensetzung der Milchzellen sowie der Milchleistung und -qualität sind in der Literatur wiederholt beschrieben worden (COULON et al., 2002; MARTINS et al., 2020). In diesem Kontext wird ebenfalls diskutiert, ob die Empfänglichkeit gegenüber Mastitiden genetisch determiniert ist. Ein Hauptaugenmerk muss in dieser Hinsicht auf moderne Zuchtmethoden gelegt werden. Genetische Selektion auf höhere Milchleistung geht nachweislich mit einer erhöhten Anfälligkeit für Mastitis einher (VUKASINOVIC et al., 2017). Daher wurden in den vergangenen zwei Jahrzehnten mehrere Forschungsprojekte realisiert, welche die Möglichkeiten

genetischer Selektion in Bezug auf Mastitisresistenz genauer verfolgt (RUPP & BOICHARD, 2003; KÜHN et al., 2008; COLE et al., 2009). Unter anderem wurden dabei mittels markergestützter Methoden divergente Haplotypen mit unterschiedlichen Merkmalsausprägungen in einer bestimmten Region des *Bos taurus* Autosom-18 (BTA18) selektiert. Diese Region bildet den funktionellen Hintergrund für genetisch verankerte Merkmale zu Produktion, (Euter-) Gesundheit, Reproduktion und weiteren körperlichen Merkmalen von Holstein Friesian Kühen (BRAND et al., 2009; COLE et al., 2011). Eine genomweite Expressionsanalyse zur Identifizierung molekularer Mechanismen ergab, dass Mastitisanfälligkeit durch spezifische „Quantitative Trait Loci“ (QTL) für SCC auf dem BTA18 beeinflusst wird (MAO et al., 2016). Die damit identifizierten divergenten Haplotypen hinsichtlich einer vorteilhaften Veranlagung für SCC (Q) und einer unvorteilhaften Veranlagung für SCC (q) (BRAND et al., 2011) bilden die Grundlage für die durchgeführten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit. Gefördert von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) und der Landwirtschaftlichen Rentenbank wurde ein nationales Forschungsprojekt mit dem Titel: „Chron Mast - Entwicklung von Biomarkern für Wirtsdeterminanten akuter und chronischer Mastitis beim Rind“ durchgeführt. Kernstück des Projektes war ein hochstandardisierter *In-vivo*-Infektionsversuch. Dafür wurden 36 Holstein Friesian Färsen mit divergierenden paternalen Haplotypen selektiert, um Unterschiede zwischen den Tieren mit vorteilhaftem (Q, n=18) und unvorteilhaftem (q, n=18) Haplotyp zu untersuchen. Diese primiparen Kühe wurden rund um die Geburt intensiv überwacht und 36 ± 3 Tage nach der Geburt entweder mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) oder mit *Escherichia coli* (*E. coli*) intrazisternal infiziert. Unterschiede zwischen den Haplotypen konnten sowohl im peripartalen Zeitraum (MEYERHOLZ et al., 2019) als auch während des Infektionsversuches festgestellt werden (ROHMEIER et al., 2020). Während des Infektionsversuches wurden alle 12 Stunden Viertelgesamtmelkproben entnommen und auf die Zusammensetzung der Zellpopulationen sowie der Bestandteile der Milch untersucht. Darüber hinaus wurde mittels intravaginal eingeführter Temperaturlogger die Vaginaltemperatur der Tiere alle drei Minuten gemessen. Dieser komplexe Datensatz wurde im Zuge der hier vorliegenden Dissertation mittels hochmoderner statistischer Methoden analysiert.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die vergleichende Untersuchung mittels Bayesischer Modelle der Dynamik (i) des Milchdifferentialzellbildes (DMCC), (ii) der Milchhaltsstoffe und (iii) der Körpertemperatur von Kühen mit divergierenden paternalen Haplotypen (Q vs. q) während einer experimentell induzierten Mastitis mit *S. aureus* oder *E. coli*. Es lag die Hypothese zugrunde, dass das Milchdifferentialzellbild und die Vaginaltemperatur vorteilhaftere Indikatoren für die genetisch determinierte frühe Antwort auf Mastitispathogene darstellen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Mastitis des Rindes: Ätiologie und Pathogenese

Die Mastitis ist eine der häufigsten Erkrankungen bei Milchkühen weltweit und wird als „infektiös bedingte Entzündung der Milchdrüse“ (WATTS, 1988) definiert. Die Milchdrüse setzt sich aus dem milchbildenden, milchspeichernden und milchleitenden System zusammen (RADOSTITS et al., 2007). Eine Mastitis wird größtenteils durch eine intramammäre Infektion mit Bakterien verursacht und kann bei allen laktierenden Säugetierarten auftreten (RUEGG, 2017). Diese Erkrankung ist trotz intensiver Kontrollprogramme eine der häufigsten und wirtschaftlich bedeutendsten Erkrankungen bei Milchkühen (HILLERTON & BERRY, 2005). Einer Studie zufolge liegt in Deutschland der jährliche Anteil an Mastitiden mit einem Zellgehalt $> 100.000/\text{ml}$ bei 47,76 % (PFÜTZNER et al., 2019). Wirtschaftliche Verluste durch Mastitiden beinhalten direkte Kosten (Diagnostik und Therapie) sowie nicht abgelieferte Milch oder Mehrarbeit durch die Landwirte (HEIKKILÄ et al., 2018). Als indirekte Kosten gelten Milchproduktionsausfall, herabgesetzte Milchqualität, Präventionsmaßnahmen, Merzung und vorzeitige Remontierung. Diese Aspekte stellen den größten Kostenfaktor in der Milchviehwirtschaft dar (SANTOS et al., 2004; HOGEVEEN et al., 2011; PFÜTZNER et al., 2019). Das Auftreten von Mastitiden verringert die Nutzungsdauer von erkrankten Tieren, da diese Erkrankung mit einer Abgangsrate von 5-17 % die zweithäufigste Abgangsursache darstellt (SEEGERS et al., 2003).

1.1. Einteilung von Mastitiden

Mastitiden können je nach Ausprägung in klinische und subklinische Mastitis sowie je nach Verlaufsform in akut und chronisch eingeteilt werden. Bei einer subklinischen Mastitis liegen keine sichtbaren Veränderungen in der Milch vor, es sind keine Entzündungssymptome am Euter wahrnehmbar und auch keine Veränderung der Milch Inhaltsstoffe vorhanden, allerdings ist der Anteil somatischer Zellen in der Milch erhöht ($> 100.000/\text{ml}$) (DVG, 2002). Bei einer klinischen Mastitis ist zusätzlich das Milchsekret makroskopisch verändert. Je nach Ausprägung sind Entzündungssymptome am Euter (Schwellung, Rötung, Schmerzhaftigkeit, Wärme) feststellbar (GRUNERT & AHLERS, 1996). Die klinische Mastitis kann weiterhin eingeteilt werden in akute und chronische

Krankheitsstadien. Kommt es zur Flockenbildung in der Milch, einer Erhöhung der Körpertemperatur und lokalen oder systemischen Entzündungssymptomen, handelt es sich um eine akute Mastitis. Das Allgemeinbefinden des betroffenen Tieres ist beeinträchtigt, oft ist die Körpertemperatur erhöht und es kann zu Dehydratation und Anorexie kommen. Im internationalen Gebrauch hat sich die Einteilung nach Schweregraden (I-III: (I) mild, (II) moderat und (III) schwer) durchgesetzt (PINZÓN-SÁNCHEZ et al., 2011; OLIVEIRA & RUEGG, 2014). Subakute Mastitiden können wiederum ohne deutliche Entzündungssymptome, jedoch mit einer Flockenbildung, besonders im Anfangsgemelk einhergehen. Demgegenüber sind chronische Mastitiden durch ein langfristiges Krankheitsgeschehen, oft als Folge einer unvollständigen Ausheilung, gekennzeichnet. Chronische Mastitiden gehen meistens mit anhaltender Flockenbildung in der Milch sowie Verhärtung und Atrophie des betroffenen Euterviertels einher (KRÖMKER, 2006). Der klinische Verlauf von Mastitiden ist sehr unterschiedlich und abhängig von Faktoren des Wirtes, des Erregers und der Umwelt (PARK et al., 2004). Prädisponierende Einflussfaktoren für das Entstehen von Mastitiden können unterteilt werden in kuhassoziierte und umweltassoziierte Faktoren.

1.2. Management- & umweltassoziierte Faktoren

Zu den management- und umweltassoziierten Faktoren zählen hygienische, technische und bauliche Parameter. Wesentliche Punkte sind hierbei Umwelthygiene und Melkhygiene. Zu den häufigsten umweltassoziierten Erregern gehören *Enterococcus spp.*, *Streptococcus uberis* und koliforme Keime wie *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Klebsiella spp.* (PINZÓN-SÁNCHEZ & RUEGG, 2011; DE VliegHER et al., 2012). Die Hygiene und Wahl des Einstreumaterials in den Liegeboxen sowie die gesamte Stallhygiene (z.B. Liegeboxen und Vorwartebereich) haben einen Einfluss auf die Bakterienmenge und somit auf das Mastitisrisiko (KRÖMKER et al., 2010; ROBLES et al., 2020). Die Übertragung der umweltassoziierten Mastitiserreger aus dem Haltungsumfeld der Tiere findet vorwiegend zwischen den Melkzeiten statt. Zusätzlich bringt die Trockenstehzeit eine hohe Neuinfektionsrate des Euters durch umweltassoziierte Erreger mit sich, was in der Regel nicht während der Trockenstehzeit, sondern nach der Kalbung zu klinischen Symptomen führt (PIEPER et al., 2013).

Auch auf der Körperoberfläche klinisch gesunder Kühe lassen sich Erreger nachweisen, sodass der Kontakt mit dem Euter beim Liegen auf den

Einstreumaterialien, aber auch Stallfliegen wichtige Infektionswege darstellen können (MATOS et al., 1991).

Unzureichende Desinfektion und Reinigung von Melkanlagen fördert die Verschleppung von Keimen, und auch die Zwischendesinfektion der Melkzeuge spielt eine wichtige Rolle bei der Reduzierung der Inzidenz klinischer Mastitiden. Ebenso dient die Zitzenreinigung und -desinfektion vor dem Melken der Reduktion von Umweltkeimen, während das „Dippen“ im Anschluss an den Melkvorgang die Verbreitung kuhassoziiierter Erreger vermindert (RUEGG, 2017). Ein angepasstes Melkmanagement mit systematischen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen und mehrmaliges Melken der Kühe verbessert die Eutergesundheit (RASMUSSEN et al., 2001; PYÖRÄLÄ, 2002). Der Einfluss der Jahreszeit ergab unterschiedliche Ergebnisse. Mehrere Autoren berichten über eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung chronischer Mastitiden bei Abkalbungen während der Wintermonate (STEENEVELD et al., 2008; GHAVI HOSSEIN-ZADEH & ARDALAN, 2011), wohingegen GREEN et al. (2002) einen Trend vermehrt infizierter Euterviertel bei Kühen, welche im Sommer abgekalbt haben, beobachteten. Des Weiteren hat Hitzestress einen maßgeblichen Einfluss auf die Eutergesundheit und möglicherweise auch auf Bakterienwachstum und -verteilung in der Stalleinrichtung (HOHMANN et al., 2020; HAMEL et al., 2021) und stellt aufgrund der globalen Klimaerwärmung eine immer größer werdende Herausforderung dar.

In weiteren Studien wurde eine längere Dauer klinischer und subklinischer Mastitiden in Milchvieh-Herden mit Selen- und Vitamin-E-Unterversorgung aufgezeigt (SHARMA et al., 2010; KHAN et al., 2022). Die pathophysiologische Konsequenz eines Selenmangels ist eine herabgesetzte Neutrophilen-Aktivität. Selen und Vitamin E spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Enzymen wie der Glutathion-Peroxidase und anderen Antioxidantien, welche Neutrophile vor der Zerstörung durch toxische Moleküle, welche bei der Phagozytose von Pathogenen aufgenommen wurden, schützen (HOGAN et al., 1993). Auch die Messung von Vitamin A und E sowie dem Spurenelement Zink zeigte signifikant reduzierte Konzentrationen im Blut zum Zeitpunkt der Abkalbung, welche ebenso negative Konsequenzen für die Immunabwehr der Kühe haben können (MEGLIA et al., 2001).

1.3. Kuhassozierte Faktoren

Die häufigsten kuhassozierten Mastitiserreger sind *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Streptococcus agalactiae* und *Streptococcus uberis* (KROEMKER, 2012; COBIRKA et al., 2020). Parameter wie Rasse, Morphologie von Euter und Zitzen, das Laktationsstadium zum Zeitpunkt der Infektion, aber auch die Milchleistung, frühere Erkrankungen oder die Genetik gehören zu den kuhassozierten Einflussfaktoren. In einer Studie von TAPONEN et al. (2017) wurde die Rasse Holstein Friesian als empfänglicher für Mastitiden beschrieben als beispielsweise die nordische Rotviehrasse. Schon seit längerem bekannt ist auch der Einfluss der Euterform und Morphologie von Zitze und Strichkanal (SEYKORA & MCDANIEL, 1985; MILES et al., 2019).

Die höchste Wahrscheinlichkeit einer intramammären Infektion besteht in der Trockenstehzeit, die klinische Manifestation der Erkrankung zeigt sich allerdings meist erst in der frühen Phase der Laktation (GREEN et al., 2007; NITZ et al., 2021). Nach der Geburt erfährt der gesamte Organismus eine große Umstellung und mit Laktationsbeginn werden den Pathogenen ausreichend Nährstoffe zur Verfügung gestellt, um sich im Euter zu vermehren. In den ersten fünf Tagen der Laktation wird für primipare Kühe die größte Mastitiswahrscheinlichkeit beschrieben, während multipare Kühe ab Tag zehn der Laktation signifikant prädisponierter sind (STEENEVELD et al., 2008). Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien, die über ein höheres Risiko einer klinischen Mastitis für erstlaktierende Kühe in den ersten 14 Tagen der Laktation im Vergleich zu älteren Tieren berichten (BARKEMA et al., 1998; STEENEVELD et al., 2008). Jedoch haben ältere Tiere insgesamt ein höheres Infektionsrisiko als jüngere Tiere (BARKEMA et al., 1998) und pluripare Kühe ein höheres Risiko zur Ausbildung chronischer Mastitiden (GHAVI HOSSEIN-ZADEH & ARDALAN, 2011). Die Euterviertel von Kühen mit mehr als drei Laktationen zeigten auch in anderen Studien ein erhöhtes Risiko, eine klinische Mastitis auszubilden. Mastitiden in vorangegangenen Laktationen erhöhen wiederum das Risiko für weitere Infektionen (VIKOVA et al., 2017).

Auch im Hinblick auf subklinische Mastitiden ist zu erwähnen, dass in der Trockenstehperiode infizierte Euterviertel in der nächsten Laktation eine geringere Milchleistung zeigten und ebenso ein höheres Mastitis-Risiko aufwiesen (GREEN et al., 2002). Die Milchverluste sind signifikant höher bei Infektion in der frühen Laktation (HAGNESTAM et al., 2007). Auch haben Kühe mit höherer Milchleistung generell eine größere Wahrscheinlichkeit, an einer Mastitis zu erkranken und eine chronische Mastitis auszubilden, als Kühe mit geringerer Milchleistung (DE HAAS et al., 2004; HAGNESTAM et al., 2007). Kühe, welche peripartale Komplikationen wie Stoffwechselstörungen oder andere Krankheiten hatten, haben aufgrund des geschwächten Immunsystems ebenfalls ein höheres Risiko für das Auftreten einer klinischen Mastitis (CURTIS et al., 1985; GHAVI HOSSEIN-ZADEH & ARDALAN, 2011).

2. Mastitis-Erreger

Als auslösendes Agens einer Mastitis wurde eine Vielzahl an Mikroorganismen identifiziert. Hierzu gehören grampositive und gramnegative Bakterien, Pilze und Algen (WATTS, 1988). Auch ist eine Beteiligung von Viren wie z.B. Bovines Herpesvirus 1 und 4 und dem Parainfluenzavirus 3 bekannt (WELLENBERG et al., 2002). In über 95 % der Fälle liegen bakterielle Infektionen vor (SCHUKKEN et al., 2011).

Zwei häufig auftretende Erreger der bovinen Mastitis sind *S. aureus* und *E. coli*. Allerdings führen diese beiden Bakterien nach intramammären Infektionen zu gegensätzlichen Krankheitsverläufen. Aufgrund dessen wurden sie im Rahmen von Infektionsversuchen oft als Modellpathogene zur Erforschung akuter (klinischer) und chronischer (subklinischer) Mastitiden verwendet (BANNERMAN et al., 2004; PETZL et al., 2008). Da im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchungen ausschließlich mit *S. aureus* und *E. coli* durchgeführt wurden, wird im Weiteren nur auf diese beiden Mastitis-Erreger näher eingegangen.

2.1. *S. aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein grampositives, fakultativ pathogenes Bakterium, das überwiegend chronische Mastitiden mit mildem Verlauf verursacht (JENSEN et al., 2013). Das Bakterium lebt als Kommensale auf Haut und Schleimhäuten und die Pathogenität ist durch verschiedene Virulenzfaktoren bedingt (SUTRA & POUTREL, 1994): Zu diesen gehören u. a. eine Polysaccharid-

Kapsel mit Lipoteichonsäuren (LTA, engl.: ‚lipoteichoic acid‘) und Protein A, welche der Phagozytose durch die Immunzellen entgegenwirken. Außerdem produziert *S. aureus* antiphagozytäre Toxine (z.B. Leukocidine, Zytolysine, Sphingomyelinasen) als Virulenzfaktoren zur Immunevasion. Weitere Enzyme (Hyaluronidasen, Phosphatasen, Nucleasen, Lipasen, Katalasen, Proteasen) dienen der Invasion in Gewebezellen (SUTRA & POUTREL, 1994; HAVERI et al., 2007; WHELEHAN et al., 2011). Infektionen mit *S. aureus* führen meist zu einer subklinischen Mastitis, sind oft weniger schwerwiegend, können aber lebenslang im Tier persistieren. Dieser chronische Verlauf hat nachweislich langfristige Auswirkungen auf die Gesamtmilchleistung, die Milchqualität, die Milchzusammensetzung und auf die Produktivität betroffener Tiere z.B. hinsichtlich verlängerter Zwischenkalbezeiten, verzögertem Einsetzen des Zyklus und Subfertilität (LEITNER et al., 2000b; RUEGG, 2017). Darüber hinaus penetriert das Bakterium viele Zellen, überlebt und vermehrt sich in diesen: u.a. in Milchdrüsenepithelzellen oder auch in Zellen des Immunsystems (ALMEIDA et al., 1996; BARDIAU et al., 2014). So persistiert *S. aureus* in den meisten Fällen im Euter, wird aber nur intermittierend ausgeschieden und ist deshalb schwer zu diagnostizieren. Aufgrund der Abkapselung in Granulomen im Euterviertel ist eine vollständige Erregereliminierung oftmals schwierig (BARKEMA et al., 2006). Betroffene Tiere stellen somit ein ständiges Erregerreservoir dar. Obwohl aus der Milch isolierte *S.-aureus*-Stämme vergleichsweise wenige Resistenzen aufweisen, gilt eine antimikrobielle Therapie oftmals als wenig aussichtsreich aufgrund schlechter bakteriologischer Heilungsraten (KARELL et al., 2024).

2.2. *E. coli*

Im Gegensatz zu *S. aureus* ist das gramnegative, säurebildende Bakterium *E. coli* den umweltassoziierten Erregern zuzuordnen (BURVENICH et al., 2003). Eine Infektion mit *E. coli* führt meistens zu einer akuten Mastitis mit mittelschweren bis schweren klinischen Symptomen, die im Heilungsfall innerhalb weniger Tage überwunden werden kann, jedoch häufig eine tierärztliche Behandlung erfordert (MITTERHUEMER et al., 2010). Schwere Verläufe können aufgrund einer Endotoxämie zum Tod des betroffenen Tieres führen (SCHUKKEN et al., 2011).

Der Schweregrad der *E.-coli*-Mastitis wird hauptsächlich durch Kuh-individuelle Faktoren, wie beispielsweise die Immunkompetenz des betroffenen Tieres, bestimmt (BURVENICH et al., 2003; BANNERMAN et al., 2004; MITTERHUEMER et al., 2010). Außerdem ist eine positive Korrelation zwischen der Schwere der Symptome und der Keimzahl in der Milch beschrieben (HOGAN & SMITH, 2003). Eine intramammäre Infektion mit *E. coli* ist nicht von Virulenzfaktoren oder einer Adhärenz an den MEC (engl.: „mammary epithelial cells“, Milchdrüsenepithelzellen) gekennzeichnet. Da *E. coli* jedoch die Fähigkeit zur Spaltung von Laktose hat, kann sich das Bakterium in der Milch sehr schnell vermehren und auch weitere Milchinhaltsstoffe verstoffwechseln (OPDEBEECK et al., 1988).

Die primäre zelluläre Abwehr der bovinen Milchdrüse gegen koliforme Keime ist die Phagozytose der Bakterien durch neutrophile Granulozyten (HOGAN & SMITH, 2003). Die Abwehrmechanismen werden im Wesentlichen durch das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) von *E.-coli*-Stämmen induziert (BURVENICH et al., 2003). Die Freisetzung des LPS aktiviert die Toll-like-Rezeptor-Kaskade (TLR-Kaskade; insbesondere TLR-4) in MEC und Alveolarmakrophagen und führt so zu einem starken Anstieg immunrelevanter Zytokine, Chemokine, Akut-Phase-Proteine und Faktoren des Komplementsystems (PAAPE et al., 2003; BANNERMAN et al., 2004; GRIESBECK-ZILCH et al., 2009; ELAZAR et al., 2010). Eine überschießende Zytokin-Ausschüttung kann jedoch zu einer schweren systemisch-inflammatorischen Immunantwort führen, wodurch die Kuh schwer erkrankt (BURVENICH et al., 2003). Eine starke primäre Belastung durch *E. coli* oder LPS kann Studien zufolge eine verringerte Immunreaktion des Wirts auf nachfolgenden Pathogen-Kontakt bedingen. Dieses Phänomen wird als Endotoxintoleranz bezeichnet (PETZL et al., 2012).

3. Die Rolle des Immunsystems bei der Infektabwehr im Euter

Das Immunsystem eines Organismus besteht aus dem angeborenen bzw. unspezifischen und dem erworbenen bzw. adaptiven Immunsystem. Diese beiden Anteile interagieren als komplexe Einheit, um den Körper vor Pathogenen und körperfremden Substanzen zu schützen.

Zum angeborenen Immunsystem zählen anatomische Barrieren wie Epithelzellen (z.B. MEC), die zur Erreger-Erkennung oder Phagozytose (z.B. Leukozyten) fähig sind und lösliche Faktoren synthetisieren und sezernieren (z.B. Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Komplementfaktoren, antimikrobielle Peptide) (OVIEDO-BOYSO et al., 2007; EZZAT ALNAKIP et al., 2014). Diese Komponenten des angeborenen Immunsystems benötigen keinen vorausgehenden Erregerkontakt, sondern sind darauf ausgerichtet, eingedrungene Pathogene zu eliminieren. Dies geschieht durch die Erkennung spezifischer, konservierter Muster des Erregers, den PAMPs (engl.: ‚pathogen associated molecular patterns‘), zu welchen Zellwandbestandteile, z.B. das LPS gramnegativer Bakterien, aber auch Lipopeptide oder Peptidoglykane grampositiver Bakterien gehören. Durch die Erkennung dieser Strukturen durch das Immunsystem können eingedrungene Erreger innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Invasion eliminiert werden (AITKEN et al., 2011).

Das erworbene Immunsystem wird durch den angeborenen Teil der Immunantwort angeregt und ist gekennzeichnet durch die Adaptation an neue und sich verändernde Mikroorganismen. Dieser Teil des Immunsystems beinhaltet neben den Antikörpern vor allem T- und B-Lymphozyten, welche spezifische Antigen-Strukturen der eingedrungenen Pathogene erkennen und bei erneuter Infektion mit diesen eine gesteigerte Immunantwort induzieren. Dieses „Gedächtnis“ des adaptiven Immunsystems ist somit schneller und effizienter bei der Eliminierung von Erregern als das angeborene Immunsystem, benötigt jedoch länger, um ausgebildet zu werden (EZZAT ALNAKIP et al., 2014). Nach derzeitigem Kenntnisstand spielen klassische Mechanismen des erworbenen Immunsystems bei der Infektabwehr im Euter keine nennenswerte Rolle (RAINARD & RIOLLET, 2006).

3.1. Lokale und systemische Wirtsreaktion bei Mastitis

Das Immunsystem der Milchdrüse besteht aus einer Vielzahl an physikalischen (z.B. Konformation der Zitze, Sphinkter, Zitzenkanal mit Keratin und Fettsäuren), zellulären (z.B. PMN, Makrophagen) und molekularen (z.B. Zytokine, Komplementfaktoren, Laktoferrin) Faktoren, welche zu dem angeborenen Immunsystem gehören (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Nach der Invasion von Bakterien folgt die Infektion der Milchdrüse, was schließlich in der Entzündungsreaktion resultiert. Akute Entzündungsreaktionen in der Milchdrüse sind primär eine Manifestation durch das unspezifische Immunsystem. Dies hat den Vorteil, dass in jedem Fall einer intramammären Infektion durch verschiedene Erreger eine Immunreaktion stattfindet, auch wenn zuvor noch nie eine spezifische Erregererkennung stattgefunden hat (RAINARD & RIOLLET, 2003).

Die Freisetzung inflammatorischer Zytokine durch die MEC und Leukozyten führt unter anderem auch zu einer (systemischen) Erhöhung der Körpertemperatur. Dies ist eine wichtige Reaktion des betroffenen Tieres zur Bekämpfung der eindringenden Krankheitserreger. Viele Studien belegen, dass die MEC besonders für die Aktivierung von Immunfunktionen zur Abwehr und Eliminierung von Krankheitserregern im Euter der Kuh verantwortlich sind (YANG et al., 2008; GÜNTHER et al., 2010; SCHUKKEN et al., 2011). Die wichtigsten Schlüsselmediatoren lokaler und systemischer inflammatorischer Reaktionen sind die Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha und Interleukin (IL)-1. Beide Zytokine sind Faktoren des angeborenen Immunsystems und wichtige systemische Auslöser von Fieber. Dabei sind diese auch wesentliche Signale für die Rekrutierung von Neutrophilen an die Infektionsstelle, die Aktivierungsmechanismen variieren jedoch je nach Mastitiserreger: Im Gegensatz zu *S. aureus* wurden zu mehreren Zeitpunkten nach einer experimentellen *E. coli*-Infektion hohe Konzentrationen des Komplementfaktors C5a und des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 nachgewiesen, welche entscheidend für die weitere Entwicklung der systemischen Reaktion des Wirtes sind (YANG et al., 2008; GÜNTHER et al., 2010; SCHUKKEN et al., 2011). PETZL et al. (2016) konnten anhand eines *In-vivo*-Versuches genauer aufzeigen, dass *E. coli* in den ersten Stunden nach der Inokulation eine 25- bis 105-fach gesteigerte Expression von Chemokinen und Zytokinen, einschließlich antimikrobieller Peptide, induzierte als *S. aureus*.

Im Gegensatz dazu wird bei einer Mastitis mit *S. aureus* die Signalübertragung von spezifischen TLR in MEC nicht aktiviert (PETZL et al., 2008; GÜNTHER et al., 2017). Somit führen diese Faktoren des angeborenen Immunsystems erregerabhängig zur Rekrutierung weiterer Immunzellen, die für die Abwehr von in das Euter eindringenden Krankheitserregern unabdingbar sind.

3.2. Immunzellen in der Milch

Der zelluläre Anteil des Immunsystems besteht überwiegend aus Leukozyten. Innerhalb der Gruppe der Leukozyten unterscheidet man Granulozyten, Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen. Alle genannten Zellarten differenzieren aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Über die Blutbahn und Migration gelangen diese Zellen in das jeweilige Zielgewebe. Bei einer Mastitis ist die Entzündung durch die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut gekennzeichnet. Chemokin-vermittelt werden die Leukozyten dabei in das Lumen der Milchdrüse gelockt (ALHUSSIEN et al., 2015). Einen der ersten Effektormechanismen gegen eindringende Krankheitserreger im Euter bilden hierbei die neutrophilen Granulozyten (PMN, engl.: polymorphnuclear cells) als primäre phagozytische Zellen (PAAPE et al., 2002). Neben PMN gehören weitere Leukozyten-Populationen (Makrophagen, Lymphozyten) und auch Epithelzellen zu den Immunzellen in der Milch.

3.2.1. Neutrophile Granulozyten (PMN)

Neutrophile Granulozyten (PMN) haben einen Durchmesser von 9 bis 16 µm und bilden einen Anteil von ca. 25 % an der Leukozyten-Population im bovinen Blut (PAAPE et al., 2003). Sie sind somit die zweitstärkste Zellfraktion nach den Lymphozyten. Bei anderen Lebewesen hingegen stellen PMN mit 50 – 70 % den größten Anteil der im Blut zirkulierenden Leukozyten dar (KRAUS & GRUBER, 2021). Anfänglich besitzen die PMN einen länglichen Zellkern, weshalb sie als „stabkernige neutrophile Granulozyten“ bezeichnet werden. Die ausgereiften Zellen werden jedoch durch einen mehrfach gelappten Zellkern gekennzeichnet und als „segmentkernige neutrophile Granulozyten“ bezeichnet. Daher resultiert der Name „polymorphkernige“ neutrophile Granulozyten (KRAUS & GRUBER, 2021). Gereifte PMN sind im Blut von Kühen allerdings selten zu sehen und kommen hauptsächlich im Knochenmark vor (PAAPE et al., 2003).

Nach der Auswanderung aus dem Knochenmark zirkulieren die PMN für weniger als 24 h in der Blutbahn. Diese kurze Lebensspanne und hohe Produktionsrate an PMN bedingt eine ständige Apoptose eines Teils der zirkulierenden PMN, um die Homöostase aufrechtzuerhalten (KRAUS & GRUBER, 2021). Der Speicherort ist primär das Knochenmark, da die PMN dort anti-apoptotische Signale von mesenchymalen Stammzellen und durch IL-6 erhalten (RAFFAGHELLO et al., 2008). Außerdem werden einige PMN durch Adhäsionsmoleküle am Endothel venöser Blutgefäße festgehalten, was eine rasche Rekrutierung ermöglicht. Knochenmark, Leber, Niere und auch die Lunge sind Orte dieser Reserven (SUMMERS et al., 2010). Neben der raschen Rekrutierung wird die Adhäsion der PMN am Endothel auch als Kontrollfunktion diskutiert. So könnten zerstörte Gewebe und eingedrungene Mikroorganismen in den genannten Organen schneller detektiert werden. Eine enge Kommunikation mit anderen organständigen Immunzellen des adaptiven Immunsystems wie bspw. den B-Lymphozyten ist in der Literatur beschrieben (PUGA et al., 2012).

Im Falle des Eindringens von Mikroorganismen in Gewebe und der nachfolgenden Schädigung dieser Gewebe kommt es zur Extravasation der PMN vom peripheren Blutstrom an die Zielorte (SADIK et al., 2011). Verschiedene Entzündungsmediatoren (u.a. Chemokine, Leukotriene, Komplementfaktoren wie bspw. C5a) induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen und locken die PMN so durch Chemotaxis an den Ort der Läsion und des Infektionsgeschehens (VAN WERVEN et al., 1997). Mittels Transmigration durch die Basalmembran der Blutgefäße gelangen die PMN entlang eines Konzentrationsgradienten der Entzündungsmediatoren in das Zielgewebe. Dort erkennen sie durch spezifische Oberflächenmoleküle (PRR, engl.: ‚pattern recognition receptors‘) das Pathogen. Diese PRR der PMN sind hauptsächlich Toll-like-Rezeptoren (TLR). Bindet ein Pathogenbestandteil an den entsprechenden TLR, werden Gene exprimiert, welche direkt eine Entzündungsreaktion modulieren. Außerdem können Antikörper oder Komplementfaktoren durch Opsonisierung markierte Erreger den PMN zur Phagozytose präsentieren. PMN werden dabei aktiviert und generieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl.: ‚reactive oxygen species‘) zur Eliminierung der durch Phagozytose aufgenommenen Mikroorganismen (LEINO & PAAPE, 1993).

Auch die Granula im Zytoplasma der PMN enthalten bakterizide Stoffe zur Eliminierung von gramnegativen und grampositiven Bakterien, Viren und Pilzen. Dazu gehören verschiedene Proteine und Enzyme wie Hydrolasen, Lysozym, Proteinasen, Histaminasen, Myeloperoxidasen, Lactoferrin und Kollagenasen (RAUSCH & MOORE, 1975; BAGGIOLINI, 2017).

Haben die PMN erfolgreich die eingedrungenen Erreger erkannt, phagozytiert und abgetötet, werden sie durch Makrophagen eliminiert oder durchlaufen eine Apoptose. Eine längere Verweildauer der PMN im Milchdrüsenepithel kann zur Gewebsschädigung der Milchdrüsen durch die Granulainhalte führen (PAAPE et al., 2003).

Auch die MEC sondern im Falle eingedrungener Mikroorganismen Zytokine und Chemokine ab, was zur Rekrutierung von PMN ins Euter führt (PAAPE et al., 2003). In der Milchdrüse ist eine effektive und schnelle Immunabwehr maßgeblich durch den schnellen Einstrom an PMN zur Phagozytose und Abtötung der Bakterien bedingt (PAAPE et al., 2002). Jedoch gelten PMN in der Milch als weniger funktionell als im Blut zirkulierende PMN, da es durch die Aufnahme von Milcfettglobulinen und Kaseinen zu einem Verlust der zytoplasmatischen Granula und somit zu einer reduzierten bakteriziden Aktivität kommt (PAAPE & TUCKER, 1966; PAAPE et al., 2002). PMN in der Milch sind ebenso weniger effektive Phagozyten, da ca. 38 % weniger Energiereserven durch gespeichertes Glykogen vorliegen im Vergleich zu PMN in der Blutbahn (NEWBOULD, 1973).

3.2.2. Lymphoide Zellen

Lymphoide Zellen haben einen großen Zellkern mit einem schmalen Zytoplasmasaum und eine Größe von 8 - 10 µm. Ebenso wie die PMN werden Lymphozyten aus pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet. Diese Immunzellen sind für die Antikörperproduktion und die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich. Sie sind die einzigen Zellen des Immunsystems, die adaptiv Antigenstrukturen durch membranständige Rezeptoren erkennen und so eingedrungene Erreger spezifisch bekämpfen können (SORDILLO et al., 1997). Der Begriff lymphoide Zellen umfasst sowohl Lymphozyten mit spezifischem Antigenrezeptor als auch Zellen, denen ein spezifischer Antigenrezeptor fehlt, z.B. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Lymphozyten werden weiterhin in B- und T-Lymphozyten unterteilt.

B-Lymphozyten produzieren als einzige Leukozyten-Subpopulation Antikörper. Sie reifen im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe und in Lymphknoten heran und werden auch als „Gedächtniszellen“ bezeichnet. So können spezifische Immunreaktionen durch wiederholte Exposition gegenüber einem Krankheitserreger verstärkt werden (SORDILLO et al., 1997).

T-Lymphozyten hingegen reifen im Thymus heran und erkennen fremde Zellen direkt. Je nach Laktationsstatus und Lokalisation variiert ihre Verteilung in den Geweben stark (SORDILLO et al., 1997). HARP et al. (2004) untersuchten die prozentuale Verteilung von Lymphozyten und fanden signifikant höhere Prozentsätze von B-Lymphozyten im Blut als in der Milch, während T-Lymphozyten in der Milch und auf Mukosaoberflächen vorherrschen. Somit spielen T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der schnellen Immunantwort und Abwehr von intramammären Infektionen (ALLISON & HAVRAN, 1991). T-Lymphozyten produzieren Zytokine als Antwort auf die Antigen-MHC-Komplexe (engl.: major histocompatibility complex) und aktivieren dadurch B-Lymphozyten, weitere T-Lymphozyten, Makrophagen und weitere Zellen des Immunsystems (INOUE et al., 1993). B- und T-Lymphozyten dringen somit bei einer intramammären Infektion in die Milchdrüse ein und setzen zusammen mit dort ansässigen Zellen Zytokine frei, die die Qualität und Intensität der Immunantwort regulieren (SORDILLO et al., 1997).

NK-Zellen wurden bei intramammären Infektionsversuchen bislang wenig untersucht. In einem Versuch von SIPKA et al. (2016) wurden NK-Zellen im Eutergewebe nach einer experimentellen Infektion mit *E. coli* nachgewiesen. Weiterhin konnten aus dem Blut gewonnene NK-Zellen die Anzahl von *E. coli in vitro* vorübergehend reduzieren.

In neueren Veröffentlichungen analysierten RAINARD et al. (2020) Verteidigungsmechanismen von Th17-Lymphozyten an epithelialen Grenzen. Diese Immunzellen exprimieren Gene, welche für Interleukin-17A (IL-17A), IL-17F und IL-22 kodieren. So stellen diese Zellen eine organisatorische Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem, zwischen Epithelzellen, neutrophilen Granulozyten und allen weiteren lymphoiden Zellen dar.

3.2.3. Makrophagen

Makrophagen sind die größte Art von Leukozyten mit einem Durchmesser von ca. 20 µm. Ihre Vorläuferzellen, die Monozyten, reifen ebenfalls im Knochenmark und können zu Makrophagen differenzieren (JOHNSTON JR, 1988). Sie können in verschiedene Gewebe einwandern, wo sie jeweils transformiert werden und eine unterschiedliche Morphologie annehmen können (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005). Wie die PMN sind Makrophagen zur Phagozytose fähig und können Bakterien, Zelldebris und akkumulierte Milchbestandteile phagozytieren (SORDILLO et al., 1997). Es gilt jedoch zu beachten, dass Makrophagen darüber hinaus auch Milchfett, Kaseine und andere Milchkomponenten aufnehmen können, sodass die Phagozytose bakterieller Bestandteile durch Makrophagen in der bovinen Milchdrüse als weniger effektiv gilt. Ihre Morphologie und Größe sind sehr variabel, da diese entsprechend der aufgenommenen Partikel variieren (PAAPE et al., 1981; KOESS & HAMANN, 2008). Zusätzlich zu ihrer Rolle bei der schnellen, unspezifischen Verteidigung gegen eingedrungene Erreger spielen Makrophagen auch eine Schlüsselrolle bei der Antigen-Prozessierung und Präsentation. Antigene von aufgenommenen Bakterien werden in den Makrophagen verarbeitet und erscheinen auf ihrer Oberfläche in Verbindung mit MHC-II-Molekülen. Bei diesen MHC-II-Molekülen handelt es sich um Strukturen, die von anderen Zellen (z.B. den Lymphozyten) zur Erkennung fremder Antigene benötigt werden (SORDILLO et al., 1997). Makrophagen spielen somit als professionelle Antigen-präsentierende Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer spezifischen Immunität.

4. Mastitisiagnostik

In der Mastitisiagnostik stehen eine Vielzahl diagnostischer Methoden für die Messung des Zellgehalts in der Milch zur Verfügung. Der Schalm- oder California-Mastitis-Test (CMT) und andere auf dem gleichen Prinzip basierende Tests (z.B. Eimü Zell-Check©) ermöglichen eine direkte semiquantitative Erfassung des Milchzellgehalts (SCHALM, 1962). Insbesondere die Verwendung der somatischen Zellzahl (SCC) ist ein beliebtes und anerkanntes Instrument zur Beurteilung der Eutergesundheit auf Herdenebene sowie zur Erkennung von Mastitiden beim Einzeltier und wird weltweit vorwiegend eingesetzt (RUEGG, 2017). Die somatische Zellzahl kann mittels CMT geschätzt oder zytometrisch genau bestimmt werden (ADKINS & MIDDLETON, 2018). Da der SCC jedoch nur die Gesamtzahl der Zellen in der Milch angibt, bleibt der Anteil verschiedener Zelltypen unberücksichtigt. Um die Zellpopulationen in der Milch weiter zu differenzieren, wird das Milchdifferentialzellbild (DMCC) verwendet.

4.1. Somatische Zellzahl (Somatic cell count – SCC)

Die Gesamtheit aller Zellen in Rohmilch wird als somatische Zellzahl (SCC, engl.: ‚somatic cell count‘) bezeichnet. Bei gesunden Kühen besteht der SCC zu mehr als 97 % aus Leukozyten und zu weniger als 3 % aus Milchdrüsenepithelzellen (MEC) (KOEISS & HAMANN, 2008; FARSCHTSCHI et al., 2022). In den meisten gesunden laktierenden Eutervierteln liegt der SCC deutlich unter 100.000 Zellen/ml Milch, steigt jedoch mit Fortschreiten der Laktation an (RAINARD & RIOLLET, 2006). Die Identifizierung einer subklinischen Mastitis basiert weitgehend auf SCC-Werten > 100.000 Zellen/ml. Allerdings können auch eutergesunde Kühe höhere Werte aufweisen und Kühe mit klinischer Mastitis unter diesem Grenzwert liegen (RIVAS et al., 2001; SUMON et al., 2020). Der Zusammenhang zwischen SCC und Milchleistung kann mit einem Rückgang von 0,5 kg Milch pro zweifacher Erhöhung des SCC bei über 50.000 Zellen/ml angenommen werden (SEEGERS et al., 2003). Auch ein niedriger SCC kann mit schlechter Milchqualität verbunden sein und der SCC kann je nach Laktationsstatus, Alter, Stress des Tieres und auch mit der Häufigkeit des Melkens oder der Jahreszeit variieren (LE ROUX et al., 2003; SCHWARZ et al., 2011).

4.2. Milhdifferentialzellbild (Differential milk cell count – DMCC)

Bereits vor über zwei Jahrzehnten wurde beschrieben, dass der DMCC die Erkennung von Mastitiden in der Anfangsphase durch die Analyse der verschiedenen Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems erleichtert (PILLAI et al., 2001). Diese Technik ermöglicht die Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen in PMN, Lymphozyten und Makrophagen (WALL et al., 2018). Die Durchführung erfolgt entweder mittels mikroskopischer oder zytometrischer Analyse wie der Durchflusszytometrie (PILLA et al., 2013). In mehreren Studien wurde die Durchflusszytometrie zur Differenzierung dieser Zellpopulationen erfolgreich eingesetzt (PILLAI et al., 2001; KOESS & HAMANN, 2008; SCHWARZ et al., 2011; DAMM et al., 2017).

4.2.1. Durchflusszytometrische Bestimmung des DMCC

Die Durchflusszytometrie beschreibt ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen oder Partikeln aufgrund ihrer spezifischen Beschaffenheit mithilfe von Laserstrahlung. Einzelne Zellen werden dabei in einem Flüssigkeitsstrom transportiert und passieren hintereinander mit hoher Geschwindigkeit einen Laserstrahl (ORMEROD, 1990; SHAPIRO, 2005). Das dabei gestreute Licht einer spezifischen Wellenlänge (hier 448 nm) wird in zwei Raum-Achsen als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) und im 90° Winkel dazu als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) erfasst. Die Vorwärtsstreuung charakterisiert dabei die Partikelgröße und dessen Refraktionsindex, die Seitwärtsstreuung die Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) eines Partikels (MEHNE et al., 2010). Die dabei entstandenen Lichtsignale werden in elektronische Signale konvertiert und mithilfe eines Computers ausgewertet und gespeichert. So können Zellpopulationen basierend auf ihrer Fluoreszenz und spezifischen Lichtstreuung analysiert werden (MCKINNON, 2018). Es werden dabei Fluoreszenz-Licht-Emissionen in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen erfasst:

FL-1 = Grünfluoreszenz der Wellenlänge 515-545nm;

FL-2 = Orangetfluoreszenz der Wellenlänge 564-606nm;

FL-3 = Rotfluoreszenz der Wellenlänge >650nm.

Somit wird jedes Messereignis durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3) charakterisiert. Die Ergebnisse werden mehrparametrisch als korrelierte Dichte- oder Punktediagramme dargestellt. Die einzelnen Messereignisse werden schließlich in Untergruppen als sogenannte „Events“ zusammengefasst.

Zur Beurteilung der Vitalität von Zellen werden die Zellsuspensionen mit einer Acridin-Orange/Propidiumjodid (PJ)-Lösung versetzt. Acridin-Orange dringt in die Zelle ein und interkaliert mit der doppelsträngigen DNA. Unter UV-Anregung erscheint der Zellkern im Durchflusszytometer grün-fluoreszierend (FL-1 Kanal). Das Propidiumjodid (PJ) kann jedoch nur bei geschädigter Zellmembran in die Zellen eindringen und dann ebenso mit der DNA interkalieren, färbt diese jedoch rot-fluoreszierend und überlagert die Grünfluoreszenz des Acridin-Oranges. Diese Rotfluoreszenz ist wiederum im FL-3 Kanal des Durchflusszytometers erfassbar. Somit ist eine grundsätzliche Differenzierung zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellen möglich (PFISTER, 2009).

Bei dem in der vorliegenden Arbeit angewendeten Verfahren wurden nach Durchlaufen des Durchflusszytometers die Proben zuerst im Seitwärtsstreulicht (SSC) im FL-1 Kanal für Grünfluoreszenz erfasst, um nicht-kernhaltige Ereignisse von der Erfassung auszuschließen. Somit wurden die Acridin-Orange positiven Ereignisse in einem „live-gate“ erfasst. Anschließend wurde im FL-3/SSC-Punktediagramm ein „Gate“ auf PJ-negative Ereignisse gesetzt. Die in diesem Fenster morphologisch als Zellen identifizierbaren Ereignisse wurden in einem weiteren Ausschnitt („Gate“) erfasst (MEHNE et al., 2010).

Die weiteren einzelnen PJ-negativen (vitalen) Zellpopulationen wie PMN, lymphoide Zellen, Makrophagen oder Epithelzellen konnten abschließend in einem Punktediagramm des FSC/SSC anhand ihrer morphologischen Charakteristika identifiziert und auch quantifiziert werden (PETZL, 2005). Durch die softwaregestützte Auswertung der Zellen im Durchflusszytometer konnten somit folgende Zellpopulationen erfasst und als DMCC zusammengefasst werden: Vitale Zellen, Nicht-vitale Zellen, Leukozyten-Subpopulationen (PMN, Lymphozyten und „Large Cells/Makrophagen“) in prozentualer Verteilung (DOSOGNE et al., 2003; MEHNE et al., 2010). Durch das separate Erfassen der somatischen Zellen (SCC) in jeder einzelnen Milchprobe konnten die absoluten Zahlen der einzelnen Zellsubpopulationen pro ml Milch berechnet werden. Zusammengefasst ist die

Durchflusszytometrie ein Verfahren, mit welchem einzelne Zellpopulationen differenziert werden können und quantitative Informationen zu den einzelnen Zellpopulationen mit hoher Genauigkeit und Wiederholbarkeit in einer kurzen Zeit gesammelt werden können (FULWYLER, 1981).

4.2.2. Einsatzmöglichkeiten des DMCC in der Mastitisdiagnostik

Das Milchdifferentialzellbild (DMCC) umfasst neben vereinzelt Epithelzellen die in der Milch vorkommenden Leukozyten-Subpopulationen. Bei steigendem Zellgehalt steigt der prozentuale Anteil an PMN (13 – 92 %) signifikant an und der Anteil an Makrophagen (7 – 79 %) sinkt ab (DAMM et al., 2017). Bei einer akuten klinischen Mastitis besteht die Population der immigrierenden Leukozyten im alveolären Lumen zu mehr als 90 % aus PMN. Damit gelten diese als Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems bei einer intramammären Infektion (SORDILLO & STREICHER, 2002). Über die Anzahl zirkulierender PMN und der damit verbundenen effektiven Adhäsion, Migration, Opsonisierung, Phagozytose und Abtötung der Bakterien wird der Ausgang der Infektion sowie der Schweregrad der Erkrankung beeinflusst (PAAPE et al., 2003).

Bei Untersuchungen zum DMCC beobachteten WALL et al. (2018) bereits in den ersten 5 Stunden nach intramammärer Inokulation mit LPS (*E. coli*) und LTA (*S. aureus*) einen Anstieg der Leukozyten in der Milch. RIVAS et al. (2001) analysierten durchflusszytometrisch den DMCC während eines Infektionsversuchs mit *S. aureus* bei 6 laktierenden Kühen. Hierbei konnten drei Reaktionsarten herausgearbeitet werden: nicht-entzündliche Reaktion (kein Anstieg von PMN), frühe Entzündungsreaktion (prozentualer Anstieg der PMN und Abfall der Lymphozyten am ersten Tag nach der Infektion) und späte Entzündungsreaktion (in den ersten 8 Tagen nach der Infektion blieben die PMN vorherrschend). Im Gegensatz zum DMCC ermöglichten SCC und bakteriologische Untersuchung keine Aussage zu den beschriebenen verschiedenen Reaktionsarten.

Der maximale PMN-Einstrom in Euterviertel, die mit *E. coli* inokuliert wurden, trat 6 – 24 Stunden nach einer experimentellen Infektion auf (MEHRZAD et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass im Falle einer schweren klinischen *E.-coli*-Mastitis eine intensive Rekrutierung von PMN erfolgte. Hingegen zeigten mit *S. aureus* infizierte Kühe mit subklinischer Mastitis lediglich eine mäßige Rekrutierung von PMN.

DEGEN et al. (2015) bewerteten den DMCC aufgrund von Veränderungen in den relativen Zellpopulationen zur Unterscheidung zwischen gesunden und entzündeten Milchdrüsen sowie zwischen akuter und chronischer Mastitis als wirksames Instrument zur früheren Mastitiserkennung. Im Jahr 2019 wurde die erste Studie veröffentlicht, welche die Genauigkeit von DMCC zur Erkennung subklinischer Mastitis unter Feldbedingungen mit einem modernen Hochdurchsatz-Milchanalysator untersuchte: ZECCONI et al. (2019) postulierten, dass aufgrund der genetischen Selektion für eine höhere Mastitisresistenz und einer fortschreitenden Abnahme der mittleren SCC-Werte die Genauigkeit von SCC als Marker für subklinische Mastitis beeinträchtigt zu sein scheint, während hingegen der DMCC mit einer hohen Genauigkeit PMN und Lymphozyten subklinischer Mastitiden unter Feldbedingungen identifizieren kann. Weitere zuletzt veröffentlichte Studien diskutieren den DMCC als vielversprechendes Diagnoseinstrument, welches das Potenzial hat, die Mastitisdiagnostik zu optimieren und außerdem als Instrument zur Überwachung des Krankheitsverlaufs oder des Behandlungserfolgs verwendet werden könnte (FARSCHTSCHI et al., 2022).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Messung des DMCC den Vorteil hat, die Anteile verschiedener somatischer Zellpopulationen in Milchproben zu untersuchen, um die Diagnose von Mastitiden bei Milchkühen zu optimieren und somit die Überwachung der Herdengesundheit zu verbessern. Diese Analyse ist genauer als der SCC und liefert zusätzliche Informationen zur Erkennung von Mastitiden in verschiedenen, insbesondere frühen Stadien der Infektion sowie von subklinischer Mastitis mit $SCC < 100.000$ Zellen/ml.

Inwiefern das Milchdifferentialzellbild im Vergleich zu konventionellen Parametern verbesserte frühzeitige Indikatoren für die genetisch determinierte frühe Antwort auf Mastitispathogene liefert, soll im Rahmen dieser Dissertation anhand von Daten aus einem hochstandardisierten Infektionsmodell untersucht werden.

5. Milchinhaltsstoffe und ihre Dynamik während einer Mastitis

Die Analyse der Milchinhaltsstoffe gilt seit Jahrzehnten als Standardverfahren zur Beurteilung der Milchqualität und ist ein wichtiges Hilfsmittel für Rinderzüchter und Genetiker. Die Analyse auf Inhaltstoffe der Milch umfasst standardmäßig die Milchinhaltsstoffe Fett, Protein, Laktose, Harnstoff und darüber hinaus können weitere Parameter wie der pH-Wert bestimmt werden. Diese Daten können auch zur Beurteilung von Futterzusammensetzung und Gesundheitsstatus der Milchkühe herangezogen werden (HAMANN & KRÖMKER, 1997).

Die bovine Milchdrüse ist eine apokrin und merokrin sezernierende Drüse. Die meisten Milchbestandteile werden kontinuierlich von den MEC synthetisiert und nur ein geringer Anteil tritt aus dem Blut über in die Milchdrüse. Die Speicherung der Milch erfolgt im Hohlraumsystem der Milchdrüse (BRADE & FLACHOWSKY, 2005). Die Gewebsschichten zwischen dem Hohlraumsystem und dem Blutgefäßsystem des Euters bilden die Blut-Euter-Schranke. Diese Barriere schützt das Euter vor Pathogenen und ihren Toxinen (WELLNITZ & BRUCKMAIER, 2021). Da das Zusammenspiel zwischen Blutzirkulation und Milchsekretion sehr intensiv ist (ca. 500 Liter Blut/1 Liter Milch), können die Veränderungen der Milchinhaltsstoffen im Hinblick auf den Stoffwechsel- und Gesundheitszustand der Kuh und des Euters Aufschlüsse geben (BOGIN, 1995).

Die physiologische durchschnittliche Zusammensetzung der Milchinhaltsstoffe ist bei BRADE and FLACHOWSKY (2005) für Holstein Friesian mit einem Gesamteiweiß von 3,0 bis 3,7 %, für den Fettgehalt mit 3,1 bis 4,8 % und für den Laktose-Gehalt mit 4,6 bis 4,8 % angegeben.

5.1. Milchinhaltsstoffe

5.1.1. Fett

Milchfett besteht größtenteils aus Triglyceriden, aber auch aus Phospholipiden, Cholesterol und freien Fettsäuren. Etwa die Hälfte sind kurz- und mittelkettige Fettsäuren (C4-C16). Die Milchfettzusammensetzung ist stark abhängig von der Fütterung des jeweiligen Tieres, da die Verdauung von Wiederkäuern im Pansen auf die Umwandlung von Kohlenhydraten aus der Nahrung in flüchtige Fettsäuren ausgelegt ist, welche in den Blutkreislauf aufgenommen werden und als primäre

Energiequelle für die Kuh zur Verfügung stehen (PALMQUIST et al., 1993). Die flüchtigen Fettsäuren sind wiederum Bausteine für die *De-novo*-Synthese des Milchfetts in der Milchdrüse, welche hauptsächlich aus Acetat und β -Hydroxybutyrat gebildet werden (KENNELLY et al., 2000). Nicht nur die Fütterung, sondern auch Laktationsstadium, Rasse und Jahreszeit können die Milchlaktosezusammensetzung beeinflussen (PALMQUIST et al., 1993). Eine mittlere bis hohe Heritabilität wird für die Fettsäuren in der Milch berichtet (SAMKOVÁ et al., 2012).

5.1.2. Protein

Das Milcheiweiß besteht aus Aminosäuren, welche hauptsächlich im Pansen gebildet werden und über das Blut ins Euter gelangen. Kaseine, β -Laktoglobulin und α -Laktalbumin werden in der Milchdrüse synthetisiert. Die Immunglobuline und das Serumalbumin werden hingegen direkt aus dem Blut in die Milch abgegeben (BRADE & FLACHOWSKY, 2005). Der Proteingehalt der Milch steigt im Laufe einer Laktation signifikant an und ist ebenfalls linear abhängig von dem Energiegehalt in der Futtermittelration (COULON & RÉMOND, 1991).

5.1.3. Laktose

Laktose ist ein Disaccharid, das aus den beiden Monosacchariden Glukose und Galaktose aufgebaut ist. Laktose ist in der Milchdrüse osmotisch wirksam und zieht somit das Wasser aus dem umliegenden Gewebe in das Lumen der Milchdrüse nach. Diese Regulierung ist maßgebend für die erzeugte Milchmenge (BRUCKMAIER & GROSS, 2019). Laktose wird in den Alveolarzellen hauptsächlich aus Glukose gebildet, welche über das Blut ins Euter transportiert wird (BRADE & FLACHOWSKY, 2005). Ein kleiner Teil wird aus Propionat synthetisiert. Ebenso wie das Milchlaktose wird die Laktose-Synthese durch viele Faktoren, bspw. durch die Fütterung, beeinflusst (KENNELLY et al., 2000). Die Blut-Euter-Schranke ist bei physiologischen Zuständen in der Milchdrüse nahezu impermeabel für Laktose (LINZELL & PEAKER, 1971). Der Anteil der Milchlaktose ist, abgesehen von einer Reduktion während der Kolostralperiode bis zu zwei Wochen *post partum*, weitgehend konstant und bleibt auch von kurzfristigen negativen Energiebilanzen unbeeinflusst (BRUCKMAIER & GROSS, 2019).

5.1.4. pH

Der pH-Wert in Rohmilch liegt bei 6,4 bis 6,8. Er gibt das Verhältnis zwischen Säuren und Basen an und liegt somit im leicht sauren Bereich (MAROUF & SARA, 2018). Während einer Mastitis kommt es durch Schädigung der Blut-Milch-Schranke zu einem Anstieg des pH-Wertes in der Milch (BAGRI et al., 2018). Bei starken Entzündungsvorgängen jedoch sinkt der pH infolge reduzierter Syntheseleistung der MEC und der Zunahme saurer Stoffwechselprodukte (Ameisensäure, Milchsäure und Essigsäure) wie beispielsweise bei der Fermentation der Laktose durch *E. coli* (MEHNE, 2010).

5.2. Veränderungen der Milchinhaltsstoffe während einer Mastitis

Da die physiologischen Prozesse der Milchbildung eine große Komplexität aufweisen, können beim Vorliegen einer Mastitis verschiedene Veränderungen in der Milchezusammensetzung auftreten. Durch Entzündungsvorgänge im Euter kommt es zu einer Lockerung der Blut-Euter-Schranke, sodass diese durchlässiger wird. Im Falle einer klinischen Mastitis sind die ‚tight junctions‘ der MEC geschädigt, was zum Austritt von Blutbestandteilen und Komponenten der extrazellulären Matrix in das Lumen der Alveolarzellen und somit auch zu einer verringerten Milchsekretionsrate führt (NGUYEN & NEVILLE, 1998). Die Anzahl und Aktivität der Alveolarzellen bestimmen die Fähigkeit der bovinen Milchdrüse, Milch zu produzieren und zu sezernieren. Daher können die Milchmenge sowie die Konzentrationen von Protein, Laktose und Fett in der Milch durch das Ausmaß von Entzündungen nach intramammärer Infektion beeinflusst werden (WAHYU HARJANTI & SAMBODHO, 2020).

Im Allgemeinen sind der Fettanteil und die Fettsäurezusammensetzung von Milchfett am anfälligsten für Veränderungen, gefolgt vom Milcheiweißgehalt. Dem gegenüber ist der Parameter Laktose am wenigsten anfällig für Veränderungen (KENNELLY et al., 2000). In einer Studie von HAGNESTAM et al. (2007) wurden Veränderungen der Milchinhaltsstoffe über einen Zeitraum von 16,5 Jahren wöchentlich analysiert: bei chronischen Mastitiden primiparer Kühe wurde eine Reduktion des Fettgehalts von 0 – 8 %, sowie eine Reduktion des Proteingehalts von 0 – 9 % über den Zeitraum einer Laktation hinweg beobachtet. Bei multiparen Kühen lagen allerdings der Rückgang des Fettgehalts bei 0 – 12 % und der Rückgang des Proteingehalts bei 0 – 11 %.

Eine Abnahme der Fettkonzentration in der Milch während einer Mastitis kann auf eine reduzierte Synthese- und Sekretionsleistung der Alveolarzellen zurückgeführt werden (WAHYU HARJANTI & SAMBODHO, 2020).

Subklinische Mastitiden führten zu einer höheren Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und einer höheren Immunglobulinkonzentration in der Milch, zeitgleich lag der pH-Wert deutlich höher als in der Milch gesunder Kühe (BATAVANI et al., 2007). Da beim Vorliegen einer Mastitis die Durchlässigkeit der Blut-Milch-Schranke verändert ist, kommt es zu einem Ausstrom von Laktose und Kaliumionen (K^+) von der Milch in den Blutkreislauf, gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg von Natriumionen (Na^+), Chloridionen (Cl^-) und Proteinen aus dem Blutkreislauf in die Milch (MARTINS et al., 2020). Der Verlust von Milchlaktose bei Mastitiden kann auch durch die geschädigten ‚tight junctions‘ der MEC erklärt werden (STELWAGEN et al., 1997). Bei Mastitiden kann es ebenfalls zu Änderungen des Anteils an Laktose in der Milch kommen, da einige Bakterien die Fähigkeit zur Laktosespaltung haben. Da laktosespaltende Bakterien bei diesem Prozess Milchsäure produzieren, kann sich folglich der pH-Wert in den sauren Bereich verschieben. Bei subklinischen und klinischen Mastitiden kann der pH-Wert jedoch auch ansteigen, und verschiebt sich dann in den alkalischen Bereich, denn durch die Schädigung der Blut-Euter-Schranke kann es zu Konzentrationsänderungen und Übertritt verschiedener Stoffe in beide Richtungen kommen (HAMANN & KRÖMKER, 1997). Der Milch-pH-Wert hat somit nur eine eingeschränkte Aussagekraft in der Mastitis-Diagnostik (KANDEEL et al., 2019).

Zwischen dem Schweregrad einer Mastitis und den Milchinhaltsstoffen Fett, Protein und Laktose wurden negative Korrelationen aufgezeigt: Je gravierender die Mastitis ist, desto stärker sinkt die Milchproduktion und Synthese von Milchinhaltsstoffen (WAHYU HARJANTI & SAMBODHO, 2020). Weiterhin treten diese Veränderungen in Abhängigkeit des verursachenden Erregers auf (COULON et al., 2002; MARTINS et al., 2020). Bei klinischer Mastitis durch *S. aureus* und *E. coli* wurden eine geringere Laktosekonzentration und höhere Proteinkonzentration in infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Vierteln derselben Kuh gemessen. Hierbei wurde bei *E. coli* infizierten Vierteln im Vergleich zu *S. aureus* infizierten Vierteln ein stärkerer Rückgang der Milchleistung beobachtet.

Der Rückgang von Laktose, Fett und Protein war bei *S. aureus* infizierten Tieren im Vergleich zu mit *E. coli* infizierten Tieren deutlich geringer, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (COULON et al., 2002).

Durch *S. aureus* induzierte subklinische Mastitiden führten zu verringerten Laktosekonzentrationen in der Milch, jedoch wurde kein Unterschied im Protein- und Fettgehalt zwischen infizierten und nicht infizierten Vierteln beobachtet (MALEK DOS REIS et al., 2013). Diese Ergebnisse bezüglich des reduzierten Laktosegehaltes stimmen mit den Erkenntnissen von KAYANO et al. (2018) überein, die mehrere Mastitis-Pathogene untersuchten (einschließlich *S. aureus* und *E. coli*): alle Pathogene führten zu einem signifikanten Anstieg des Fett- und Proteingehaltes in der Milch erkrankter Kühe, im Gegensatz zu sinkenden Laktosekonzentrationen, insbesondere bei mit *S. aureus* infizierten Tieren. Auch eine experimentelle intramammäre Inokulation mit LPS führte zu signifikant reduzierten Laktose-Konzentrationen und war am niedrigsten 9 h nach Versuchsbeginn (WAGNER et al., 2023).

6. Dynamik der Körpertemperatur während einer Mastitis

Ein zentraler Bestandteil der klinischen Untersuchung ist die Messung der inneren Körpertemperatur. Die physiologische Körpertemperatur eines Rindes liegt zwischen 38,0 und 39,2 °C und wird gewöhnlich rektal mittels Fieberthermometer gemessen (ARRUDA et al., 2013).

In einer klinischen Studie führte die intramammäre Infektion mit *S. aureus* innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Inokulation nicht zu einem Anstieg der Körpertemperatur. Im Gegensatz dazu entwickelten in der gleichen Studie alle Kühe nach intramammärer Inokulation mit *E. coli* Fieber. Die maximale Körpertemperatur nach Inokulation mit *E. coli* wurde zwischen 12 und 18 Stunden nach Beginn des Infektionsversuches erreicht (PETZL et al., 2008). Wie in vielen anderen Studien war hier die Körpertemperatur rektal ermittelt worden.

In mehreren Publikationen wurden wissenschaftliche Arbeiten zu neuen Messverfahren untersucht und verglichen. Trotz mittlerer bis hoher Korrelationen zwischen der vaginal und der rektal gemessenen Körpertemperatur, wurde in mehreren Studien aufgezeigt, dass Messungenauigkeiten, Typ des Rektalthermometers, die rektale Eindringtiefe bei der Messung und auch der

einzelne Untersucher Einfluss auf das Messergebnis bei den verschiedenen Methoden haben können (BURFEIND et al., 2010; FISCHER-TENHAGEN & ARLT, 2020). Fieber beim Rind wird ab einer inneren Körpertemperatur über 39,5 °C definiert (FISCHER-TENHAGEN & ARLT, 2020). Da die Modernisierung der Landwirtschaft auch mit der Anwendung neuer Methoden zur Überwachung des Tiergesundheitsstatus einhergeht, wurden verschiedene neue Verfahren zur Erfassung der inneren Körpertemperatur entwickelt. Dazu gehören bspw. Pansenlogger, Vaginallogger, die Erfassung der Körperoberflächentemperatur mittels Infrarotthermographie oder auch die Milchtemperaturmessung. Im Rahmen des „Precision Livestock“ Farming sollen diese Monitoringsysteme helfen, frühzeitig Erkrankungen wie bspw. Mastitiden zu erkennen und zur Verbesserung des Tierwohls beitragen. Da die Messung der Körperoberflächentemperatur mittels Infrarotthermographie um 1,0 bis 3,0 °C niedriger als die innere Körpertemperatur (rektal und vaginal gemessen) ist und von sehr vielen äußeren Faktoren (nasses Fell, Witterung, etc.) beeinflusst wird, gilt diese bislang nicht als validierte Messmethode (HOFFMANN et al., 2013; FISCHER-TENHAGEN & ARLT, 2020).

Die indirekte Erfassung der Körpertemperatur über die Milch ergab eine mittlere Korrelation mit der vaginal gemessenen Temperatur. Da die Messung der Milchtemperatur einfach in automatische Melksysteme integriert werden kann, bietet diese Methodik zukünftig großes Potential zur Weiterentwicklung und Integration in automatische Erfassungssysteme (POHL et al., 2014).

In einer weiteren Studie verknüpften die Autoren die Vaginaltemperaturen mit den Rektaltemperaturen bei Kühen *post partum* und in der Hochlaktation. Hier wurden mittlere bis hohe positive Korrelationen zwischen den beiden Messverfahren aufgezeigt. Die Autoren beschrieben, dass der Einsatz vaginaler Temperaturlogger den Vorteil hat, genauere Veränderungen der Körpertemperatur zu erfassen (VICKERS et al., 2010).

Eine weniger invasive und in der Praxis bereits häufiger verwendete Methode zur kontinuierlichen Erfassung der Körpertemperatur sind die Pansenlogger, welche oral eingegeben werden. Die gemessene Temperatur ist jedoch um ca. 0,5 °C höher als die Rektaltemperatur. Ein großer Nachteil ergibt sich daraus, dass die Wasseraufnahme des Tieres die im Pansen gemessene Temperatur je nach Wassertemperatur für eine Zeit von bis zu 3,5 h deutlich absenken kann.

Jedoch wird eine gute Korrelation zwischen der Rektaltemperatur und den Pansenloggern angegeben (BEWLEY et al., 2008). Neuere Studien konnten jedoch mittels Algorithmus die Absenkung der von den Pansenloggern gemessenen Temperatur nach einer oralen Wasseraufnahme herausrechnen (KIM et al., 2019). Die Anwendung von Vaginalloggern hat den Vorteil, dass die Körpertemperatur über einen begrenzten Zeitraum kontinuierlich erfasst werden kann, und eignet sich daher für wissenschaftliche Zwecke sehr gut. In der Praxis besteht jedoch die Gefahr, dass es zur Vaginitis kommt und es ist mit einer hohen Verlustrate der Vaginallogger durch Herausdrücken zu rechnen (FISCHER-TENHAGEN & ARLT, 2020).

7. Genetische Selektion auf reduzierte Empfänglichkeit gegenüber Mastitiserregern

Heutzutage werden zur Beurteilung des Zuchtwertes von Milchkühen neben Auswahlkriterien auf Basis phänotypischer Merkmale wie dem SCC und Milchqualitätsanalysen auch genotypische Merkmale herangezogen.

Die genetische Selektion hinsichtlich reduzierter Anfälligkeit gegenüber intramammärer Infektionen wurde schon vor einigen Jahrzehnten postuliert (LEGATES & GRINNELLS, 1952) und stellt nach wie vor eine wichtige Möglichkeit für die moderne Milchviehwirtschaft dar, um die Mastitisinzidenz zu verringern und gleichzeitig das Tierwohl zu steigern. In verschiedenen Studien wurden bereits mehrere chromosomale Regionen, Gene und Polymorphismen in der deutschen Holstein Friesian Population identifiziert, welche Einfluss auf Eutergesundheit, Fertilität und somit auch auf die Gesundheit und Langlebigkeit der Milchkühe haben (KÜHN et al., 2003; COLE et al., 2009; BRAND et al., 2010). In routinemäßigen Zuchtbewertungen wird hingegen hauptsächlich der SCC als Indikator für die Eutergesundheit eingesetzt, da dieser stark mit dem Auftreten klinischer Mastitiden korreliert (RUPP & BOICHARD, 2003; KÜHN et al., 2008). Die Möglichkeiten zur genetischen Selektion haben in den letzten Jahrzehnten enorm zugenommen. Genomweite Analysen großer Gendatenbanken identifizierten spezifische Kandidatengene und Chromosomenregionen, wobei verschiedene *Bos taurus* Autosome (BTA) untersucht wurden.

Dabei wurden auf mehreren Autosomen Zusammenhänge zu Kalbeverlauf, verschiedenen Exterieurmerkmalen, der Langlebigkeit und der Gesamtleistung bei Holstein Friesian Kühen vorgefunden (COLE et al., 2011). Weitere Studien konnten mehrere Regionen (Megabasen 43 – 48 und Megabasen 53 – 59) auf dem BTA18 identifizieren, die den SCC in der Milch beeinflussen (KÜHN et al., 2003; KÜHN et al., 2008). In weiteren Studien wurden „Quantitative Trait Loci“ (QTL) dieser Regionen identifiziert, um mehr Informationen über genetisch bedingte molekulare Mechanismen der Mastitisresistenz in Milchdrüsenepithelzellen von Kühen zu erlangen (RUPP & BOICHARD, 2003; BRAND et al., 2009; GRIESBECK-ZILCH et al., 2009). Diese Ergebnisse lieferten Grundlagen für die Anwendung von Informationen über diese QTL als erfolgreiches Instrument zur Selektion von Kühen hinsichtlich Mastitisresistenz. In einem weiteren Versuch von BRAND et al. (2010) wurden drei Bullen aus der deutschen Holsteinpopulation mittels linearer Zuchtwertschätzung ausgewählt, die eine Diskrepanz der markergestützten Zuchtwerte für SCC in der telomerischen Region des BTA18 für alternative Haplotypen hatten. Es konnten so selektierte primipare Töchter dieser Bullen für einen Infektionsversuch verwendet werden, unterteilt in 6 Färsen mit dem vorteilhaften Haplotypen (Q) und 5 Färsen des unvorteilhaften Haplotypen (q). BRAND et al. (2011) führten einen *In-vitro*-Versuch mit kultivierten MEC der beiden divergenten Haplotypen anhand einer Stimulation mit durch hitzeinaktivierten *E.-coli*- und *S. aureus*-Isolaten durch. Nach 1, 6 und 24 h wurden diese Zellen „geerntet“ und mit einer Microarray-Expressionschip Technologie analysiert, um mRNA-Expressionsprofile zu identifizieren, die auf die genetische Prädisposition, die bakterielle Stimulation und auf die MEC selbst zurückzuführen sind. Es zeigte sich eine schnellere und stärkere Reaktion nach einer Stimulation der MEC, die von dem vorteilhaften Haplotypen (Q) hinsichtlich der somatischen Zellzahl stammten: Diese Tiere des vorteilhaften Haplotypen Q, zeigten eine deutlich erhöhte mRNA-Expression von Genen der angeborenen Immunantwort wie *TLR2* und *TNF- α* . Nach der bakteriellen Stimulation zeigten MEC von Q-Kühen eine erhöhte Genexpression mehrerer Interleukine (IL), was zu einer insgesamt weniger ausgeprägten und verzögerten Reaktion auf die Stimulation führte. Die Hochregulierung der Gene der Akuten-Phase-Antwort, der Leukozytenmigration (in den ersten 6 h), sowie die Hochregulation von Genen verschiedener Zytokine (in den ersten 24 h) erfolgte signifikant schneller und höher in den MEC des vorteilhaften Haplotypen (Q).

Die am stärksten veränderten Signalwege in den MEC von Kühen des unvorteilhaften Haplotypen (q) hingegen betrafen die Kommunikation zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem sowie die Akute-Phase-Antwort: Bei den MEC von Kühen des vorteilhaften Haplotypen (Q) wurde überwiegend die Reifung dendritischer Zellen beeinflusst, was durch die signifikant höhere Genexpression von Molekülen, welche an den MHC-II beteiligt sind, aufgezeigt werden konnte (BRAND et al., 2011).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich Unterschiede zwischen Kühen mit divergierenden Haplotypen auch *in vivo* manifestieren würden. Gefördert von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) und der Landwirtschaftlichen Rentenbank wurde ein nationales Forschungsprojekt mit dem Titel: „Chron Mast - Entwicklung von Biomarkern für Wirtsdeterminanten akuter und chronischer Mastitis beim Rind“ implementiert. Im Rahmen dieses Kooperationsprojektes wurden Unterschiede zwischen Kühen des vorteilhaften (Q) und unvorteilhaften (q) Haplotypen in der peripartalen Periode (MEYERHOLZ et al., 2019), während eines kontrollierten intramammären Infektionsmodells (ROHMEIER et al., 2020) sowie im Verlauf von zwei Laktationen (Langzeitmodell) (HEIMES et al., 2019) detektiert. MEYERHOLZ et al. (2019) fanden signifikant geringere Inzidenzen von Metritis und eine seltenere Entwicklung von Fieber bei Q-Kühen im Vergleich zu q-Kühen. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich Nachgeburtshaltung, Uterusinvolution oder dem Einsetzen der Zyklizität *post partum* festgestellt. Auch wurden verschiedene metabolische Faktoren untersucht, unter anderen die Serumkonzentrationen von Beta-Hydroxybutyrat und Plasmakonzentrationen des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (insulin-like growth factor 1, IGF-I), als Parameter für ein erhöhtes Risiko von Stoffwechselstörungen. Die Blutanalysen zeigten eine weniger stark ausgeprägte Entkopplung der somatotropen Achse bei primiparen Kühen vom vorteilhaften Haplotypen (Q) im Vergleich zu primiparen Kühen vom unvorteilhaften Haplotypen (q) (MEYERHOLZ et al., 2019). Im Weiteren zeigten primipare Kühe vom vorteilhaften Haplotypen (Q) 24 und 36 Stunden nach Beginn des Infektionsversuchs mit *S. aureus* einen signifikant geringeren SCC sowie bereits 12 Stunden nach der Challenge eine geringere Bakterienausscheidung in der Milch im Vergleich zu den primiparen q-Kühen (ROHMEIER et al., 2020).

Im Langzeitmodell wurden 6 Kühe (Q: n=3, q: n=3) über zwei Laktationen beobachtet. HEIMES et al. (2019) konnten zeigen, dass die q-Kühe eine deutlich höhere Anzahl an Eutervierteln mit einem sehr geringen SCC (< 10.000 Zellen/ml) in den ersten Laktationswochen aufwiesen. Postuliert wurde, dass dies mit einer geringeren Immunabwehr der MEC gegenüber eindringenden Krankheitserregern einhergeht. Demgegenüber hatten die q-Kühe im Laufe der ersten Laktation jedoch einen insgesamt höheren SCC, was eine erhöhte Anfälligkeit für das Eindringen von Keimen ins Euter im Verlauf der Laktation vermuten lässt.

Zusammenfassend lässt sich über die bereits publizierten Ergebnisse des ChronMast Projektes sagen, dass der Vergleich von Kühen mit divergierenden paternalen BTA18 Haplotypen zeigte, dass Kühe vom vorteilhaften Haplotypen Q neben einer geringeren Inzidenz postpartaler reproduktiver und metabolischer Erkrankungen auch eine geringere somatische Zellzahl im Verlauf der Laktation aufwiesen.

Die Analyse potenzieller Unterschiede zwischen Q- und q-Kühen hinsichtlich der Zusammensetzung der Milchzellpopulationen, der Entwicklung der Körpertemperatur sowie der Milchinhaltstoffe in einem intramammären Infektionsmodell ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

8. Bayesische Modelle

Die Verwendung von Bayesischen Modellen ist noch nicht weit verbreitet, hat jedoch in den letzten Jahren stark zugenommen. Diese Zunahme ist vermutlich auf die fortgeschrittene rechnerische Leistung und Verfügbarkeit von statistischen Programmen zurückzuführen (LOPES & WEST, 2004). Bayesische Modelle sind multivariate Faktorenmodelle, welche methodische und rechnerische Fragen der Modellspezifikation und Modellanpassung kombinieren. Diese Faktorenanalysen sind eine der leistungsstärksten und flexibelsten statistischen Verfahren zur Bewertung multivariater Abhängigkeiten und Co-Abhängigkeiten. Durch Bayesische Modelle können verschiedene Arten von Datenbeziehungen zwischen den untersuchten Variablen überprüft und widerlegt werden (LOPES & WEST, 2004). Diese Modelle eignen sich daher für komplexe Fragestellungen, da sie eine fast beliebige Anzahl an Einflussfaktoren in die Analyse miteinbeziehen können. Bayesische Modelle unterscheiden sich von anderen statistischen Verfahren dadurch, dass auch Vorwissen über die Datenauswertung integriert werden kann.

Diese Modelle können so die wahrscheinlichste Hypothese aus einer Reihe konkurrierender Hypothesen über die Mechanismen der beobachteten Daten bestimmen (STEPHAN et al., 2009).

RAFTERY (1995) argumentierte, dass p-Werte und die zugehörigen statistischen Tests insbesondere bei großen Stichproben unbefriedigende Ergebnisse liefern. Er zeigte auf, dass bei Verwendung anderer statistischer Verfahren, wie beispielsweise der Regressionsanalyse, wenn es viele unabhängige Kandidatenvariablen gibt, Standardverfahren zur Variablenauswahl zu sehr irreführenden Ergebnissen führen können. Zusätzlich wird durch die Auswahl eines einzelnen Modells die Modellunsicherheit unterschätzt. Die Bayesischen Modelle überwinden diese Problematik, in dem sie mehr Vorhersagen unter Einbeziehung komplexer Zusammenhänge ermöglichen, was einen großen Vorteil darstellt.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der hierarchische Ansatz der Bayesischen Modelle bei Vorhandensein von Ausreißern erheblich robuster ist als andere Methoden, die zufällige Effekte inkludieren (random effects) (STEPHAN et al., 2009).

III. PUBLIKATION

Cows with diverging haplotypes show differences in differential milk cell count, milk parameters and vaginal temperature after *S. aureus* challenge but not after *E. coli* challenge

*Katharina Müller-Langhans, Lisa Oberberger, Yury Zablotski, Susanne Engelmann,
Martina Hoedemaker, Christa Kühn, Hans-Joachim Schuberth, Holm Zerbe,
Wolfram Petzl, Marie Margarete Meyerholz-Wohllebe*

BMC Veterinary Research (2024), 20:200

RESEARCH

Open Access



Cows with diverging haplotypes show differences in differential milk cell count, milk parameters and vaginal temperature after *S. aureus* challenge but not after *E. coli* challenge

Katharina Müller-Langhans¹, Lisa Oberberger², Yury Zablotski¹, Susanne Engelmann^{3,4}, Martina Hoedemaker⁵, Christa Kühn^{6,7,8}, Hans-Joachim Schuberth⁹, Holm Zerbe¹, Wolfram Petzl^{1†} and Marie Margarete Meyerholz-Wohllebe^{1*†}

Abstract

Background In dairy cattle, mastitis causes high financial losses and impairs animal well-being. Genetic selection is used to breed cows with reduced mastitis susceptibility. Techniques such as milk cell flow cytometry may improve early mastitis diagnosis. In a highly standardized in vivo infection model, 36 half-sib cows were selected for divergent paternal *Bos taurus* chromosome 18 haplotypes (Q vs. q) and challenged with *Escherichia coli* for 24 h or *Staphylococcus aureus* for 96 h, after which the samples were analyzed at 12 h intervals. Vaginal temperature (VT) was recorded every three minutes. The objective of this study was to compare the differential milk cell count (DMCC), milk parameters (fat %, protein %, lactose %, pH) and VT between favorable (Q) and unfavorable (q) haplotype cows using Bayesian models to evaluate their potential as improved early indicators of differential susceptibility to mastitis.

Results After *S. aureus* challenge, compared to the Q half-sibship cows, the milk of the q cows exhibited higher PMN levels according to the DMCC (24 h, $p < 0.001$), a higher SCC (24 h, $p < 0.01$ and 36 h, $p < 0.05$), large cells (24 h, $p < 0.05$) and more dead (36 h, $p < 0.001$) and live cells (24 h, $p < 0.01$). The protein % was greater in Q milk than in q milk at 0 h ($p = 0.025$). In the *S. aureus* group, Q cows had a greater protein % (60 h, $p = 0.048$) and fat % (84 h, $p = 0.022$) than q cows. Initially, the greater VT of *S. aureus*-challenged q cows (0 and 12–24 h, $p < 0.05$) reversed to a lower VT in q cows than in Q cows (48–60 h, $p < 0.05$).

Additionally, the following findings emphasized the validity of the model: in the *S. aureus* group all DMCC subpopulations (24 h–96 h, $p < 0.001$) and in the *E. coli* group nearly all DMCC subpopulations (12 h–24 h, $p < 0.001$) were higher in challenged quarters than in unchallenged quarters. The lactose % was lower in the milk samples of *E. coli*-challenged quarters than in those of *S. aureus*-challenged quarters (24 h, $p < 0.001$). Between 12 and 18 h, the VT was greater in cows challenged with *E. coli* than in those challenged with *S. aureus* (3-h interval approach, $p < 0.001$).

[†]Wolfram Petzl and Marie Margarete Meyerholz-Wohllebe contributed equally to this work.

*Correspondence:
 Marie Margarete Meyerholz-Wohllebe
 marie.meyerholz@lmu.de
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusion This in vivo infection model confirmed specific differences between Q and q cows with respect to the DMCC, milk component analysis results and VT results after *S. aureus* inoculation but not after *E. coli* challenge. However, compared with conventional milk cell analysis monitoring, e.g., the global SCC, the DMCC analysis did not provide refined phenotyping of the pathogen response.

Keywords Cattle, Intramammary infection model, Milk parameters, Vaginal temperature, Mastitis, *S. aureus*, *E. coli*, Bayesian model

Background

Bovine mastitis is one of the most common diseases in dairy cows worldwide [1–3]. In addition to detrimentally affecting animal well-being, it strongly influences dairy farm profitability by direct and indirect effects on milk yield and quality [4, 5]. Intramammary infection (IMI) occurs in 20–50% of all lactating cows [3, 6]. Due to increasing antibiotic resistance, measures to reduce the use of antibiotics to treat mastitis are needed. This includes prevention strategies, including milking hygiene procedures, early mastitis diagnosis and mastitis treatment, supportive treatment of clinical cases, separation of infected cows and culling to reduce IMI at the herd level [1].

In addition, breeding for increased mastitis resistance is essential. Parameters based on phenotypic characteristics such as the somatic cell count (SCC) and milk quality analysis are often used to assess the genetic value of mastitis resistance in dairy cows. In addition to the use of surrogate parameters, new tools for genetic selection, including genomic information, have become state-of-the-art. In earlier studies [7, 8], quantitative trait loci (QTLs) were identified to provide more information about genetically determined molecular mechanisms of mastitis resistance in mammary epithelial cells from cows harboring alternative QTL alleles [9]. These observations were based on previous studies reporting a QTL on *Bos taurus* chromosome 18 (BTA18), which was related to the SCC [10, 11]. Several follow-up studies have confirmed that this major locus segregates in the Holstein dairy cattle population and has a substantial effect on longevity [7, 8]. However, to date, no distinction has been made between the different pathogenetic and pathophysiological backgrounds of mastitis when selecting for mastitis resistance.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) are two of the most important mastitis pathogens with different clinical disease courses [12, 13]. IMI caused by *S. aureus* usually results in subclinical mastitis, which is often less severe but can persist for a lifetime. This chronic course has long-term effects on total milk yield, milk quality, milk composition and overall productivity [4, 14]. Due to the persistence and intermittent shedding of *S. aureus*, detection is difficult [1, 15]. In

contrast, *E. coli* causes acute mastitis with moderate to severe clinical signs that can be overcome within a few days but often require veterinary treatment. Severe disease may gravely affect the animal [16]. Because of their opposite clinical outcomes, *S. aureus* and *E. coli* have widely been used in experimental studies for subclinical and clinical mastitis, and these studies have revealed the different underlying mastitis pathophysiologies of *S. aureus* and *E. coli* mastitis [12, 14, 17].

In general, the somatic cell count (SCC) in milk is > 97% leukocytes and < 3% mammary epithelial cells (MECs) [18, 19]. The innate immune response during IMI leads to enhanced recruitment of immune cells, which are important for defense against invading pathogens. The identification of subclinical mastitis is widely based on SCC values > 100,000 cells / ml. However, healthy cows may display higher values [20, 21]. Moreover, inflammation of the mammary gland has even been observed in cows with SCC values below 100,000 cells / ml [22]. Furthermore, the SCC varies with lactation status, age, stress, milking frequency and season [23, 24].

For mastitis control programs, a large variety of diagnostic methods are available for milk sample analysis, including the SCC and the California Mastitis Test (CMT) [25]. The SCC is a widespread tool used to estimate cell quantities for mastitis detection but does not determine the distribution of different cell types.

To further distinguish between cell types in milk, the differential milk cell count (DMCC) has gained increasing attention in recent years [18]. Twenty-five years ago, the DMCC was described to allow the detection of mastitis in its initial phase via the analysis of different immune cell populations in milk [26]. This technique allows for the differentiation of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), lymphocytes and macrophages [27] by either microscopic or flow cytometric analysis [19, 20, 22, 28–30].

PMNs constitute more than 90% of the chemokine-attracted migrating leukocyte populations in the alveolar lumen [31]. Alongside resident mammary epithelial cells, these phagocytes serve as one of the first lines of defense against invading pathogens. PMNs are recruited by chemokines secreted from MECs [32]. The maximum PMN influx (3122 ± 458 PMN / μL) in quarters that were

inoculated with *E. coli* occurred 6–24 h after challenge [33]. In contrast, in cases of chronic mastitis, PMN fractions may vary from very high values, as observed in acute mastitis (~56 – 73% of the SCC), to very low percentages, as observed in uninfected quarters (~28%). The predominant cell population in the milk of healthy cows is reported to be lymphocytes (~47% of the SCC). Their fraction and number seem to be genetically determined [14, 22]. Dosogne et al. reported that lymphocytes and monocytes were more abundant in early lactation than in mid- and late lactation, whereas macrophages and PMNs remained considerably less abundant [34].

Degen et al. assessed the effectiveness of the DMCC as a tool for early mastitis detection based on changes in the relative cell populations for differentiation between healthy and inflamed quarters as well as between acute and chronic mastitis [35]. In summary, the DMCC is advantageous because it can be used to investigate the proportions of different somatic cell populations in milk samples to optimize mastitis diagnosis and to assess the general health of dairy cows. The DMCC is more accurate than the SCC and provides additional information for detecting mastitis in different and early stages as well as for detecting subclinical mastitis in patients with an SCC of <100,000 cells / ml. The accuracy of the DMCC for detecting subclinical mastitis under field conditions has been evaluated [36], and the DMCC has been suggested as a tool for monitoring disease progression or treatment success [18]. Thus, the DMCC can serve as a tool for preventive health management in dairy cows, allowing early and accurate detection of mastitis.

The aim of the present study was to explore whether cows with similar overall genetic backgrounds (paternal half-sibs) but divergent BTA18 paternal haplotypes show differential early responses to mastitis pathogen challenge in acute or chronic mastitis models. In particular, we hypothesized that compared with conventional parameters, the differential milk cell count (DMCC), milk parameters and vaginal temperature would be better early indicators of a genetically driven differential early response to mastitis pathogen challenge in an acute or chronic mastitis model.

Results

Differences in the DMCC

Differences in the DMCC between challenged quarters and unchallenged quarters

The DMCC of untreated quarters and quarters treated with saline solution (0.9%) differed significantly in both pathogen groups. In the *E. coli* group at timepoint 24 h *post inoculation* (*p. i.*) numbers of cells in all leukocyte subpopulations ($p < 0.001$) were higher in the untreated quarters compared to the quarters treated with saline solution.

In the *S. aureus* group from timepoint 24 *p. i.* until the end of the experiment PMNs, live cells and SCC were significantly lower in untreated quarters compared to quarters treated with saline solution ($p < 0.05$, except for 72 h: PMNs $p = 0.06$, live cells: $p = 0.07$ and SCC: $p = 0.08$). Furthermore, from timepoint 36 h *p. i.* until the end of the experiment, lymphoid cells, large cells and dead cells were significantly lower in untreated quarters compared to quarters treated with saline solution in the *S. aureus* group ($p < 0.05$, except for 72 h: lymphoid cells and large cells $p = n. s.$, and 72 h and 96 h dead cells: $p = n. s.$).

No significant differences in the DMCC were found between challenged quarters and untreated or saline solution treated quarters at timepoint 0 h for cows challenged with *E. coli* and at timepoint 0 h and 12 h for cows challenged with *S. aureus*, irrespective of the haplotype (Additional Fig. 1).

At timepoint 12 h and 24 h *p. i.* significantly higher cell counts of all cell populations were detected in the *E. coli*-challenged quarters compared to untreated or saline solution treated quarters ($p < 0.01$). Similarly, *S. aureus*-challenged quarters showed significantly higher numbers of cells in all cell populations starting 24 h *p. i.* until the end of the experiment ($p < 0.001$) compared to untreated or saline solution treated quarters (Additional Fig. 1).

Differences in the DMCC between cows with haplotypes q vs. Q

The DMCC of the challenged quarters did not differ significantly between the haplotypes q and Q in the first 24 h *p. i.* (Bayesian model independent of the inoculated pathogen, $p > 0.1$, data not shown). Differences between q and Q cows were detected in the *S. aureus*-challenged quarters at later timepoints after inoculation. PMN levels were significantly higher in the challenged quarters of q cows compared to challenged quarters of Q cows at 24 h *p. i.* ($p < 0.001$, Fig. 1). Similarly, the SCC at timepoints 24 h *p. i.* ($p < 0.01$) and 36 h *p. i.* ($p < 0.05$), as well as live cell count ($p < 0.01$) and large cell count ($p < 0.05$) at timepoint 24 h *p. i.* and dead cell count at 36 h *p. i.* ($p < 0.001$) were higher in the challenged quarters of q cows compared to challenged quarters of Q cows (Fig. 1).

Differences in the DMCC between quarters challenged with E. coli and quarters challenged with S. aureus within the haplotype groups

There were no significant differences in the DMCC between the *E. coli*- and *S. aureus*-challenged quarters at timepoint 0 h. Within the Q group, at timepoint 12 h *p. i.* numbers of all measured cell populations in *E. coli*-challenged quarters were significantly higher than in *S. aureus*-challenged quarters ($p < 0.05$). This cannot be reported for q cows except for PMNs, that were significant higher at timepoint 12 h *p. i.* in *E. coli*-challenged quarters

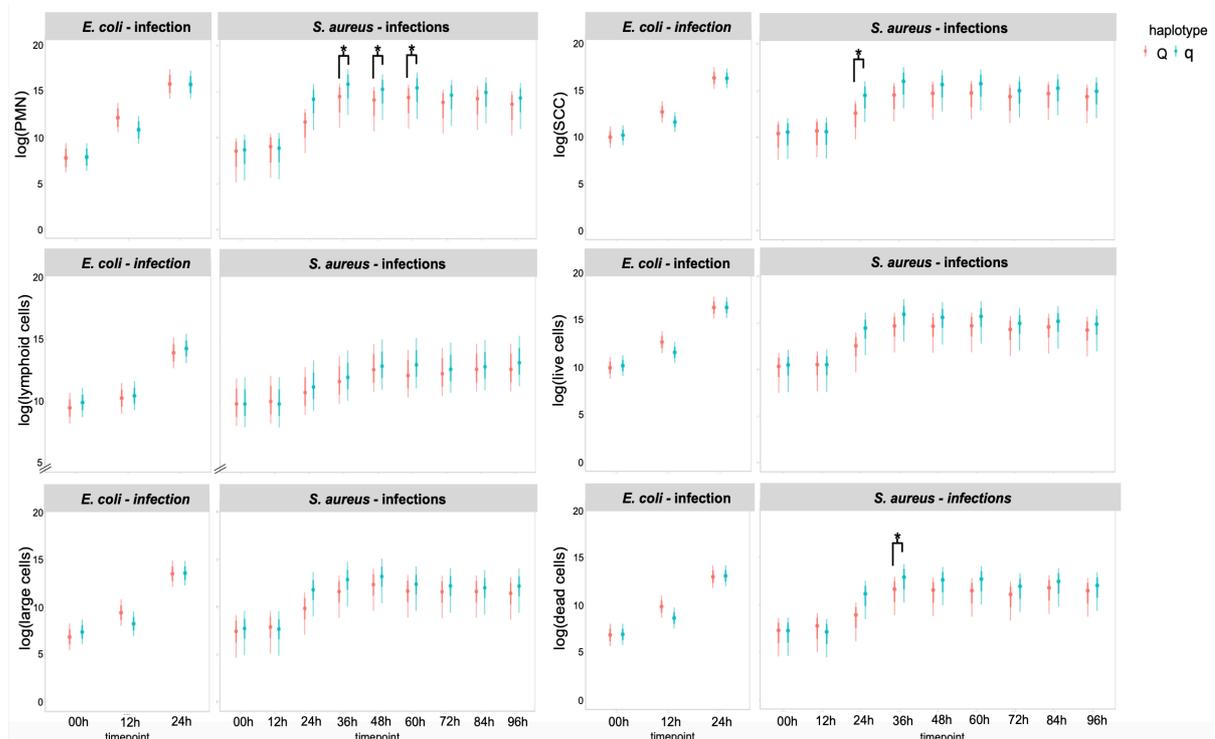


Fig. 1 DMCC of milk samples from cows with divergent haplotypes during challenge with *E. coli* or *S. aureus*. Illustration of the Bayesian model including the logarithmized number [cells/ml] of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), somatic cell count (SCC), lymphoid cells, large cells, and live and dead cells in the milk of challenged quarters of primiparous cows with either favorable (Q) or unfavorable (q) haplotypes that were challenged with *Escherichia coli* (*E. coli*) for 24 h or with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) for 96 h. The dataset includes $n=35$ cows, distributed as follows: *E. coli* challenge Q: $n=5$, q: $n=6$ and *S. aureus* challenge Q: $n=12$, q: $n=12$. Model predictions are presented as 80% and 95% confidence intervals of the mean. Differences between Q and q cows are indicated with * if $p < 0.05$ and with ** if $p < 0.01$ and *** if $p < 0.001$. Significant differences between the pathogen groups (*E. coli* vs. *S. aureus*) as well as differences over time relative to challenge are not shown

compared to *S. aureus*-challenged quarters ($p=0.015$) within the q group. Except for PMNs within haplotype group q ($p=0.061$), at 24 h *p. i.*, all cell populations were significantly higher in the *E. coli*-challenged quarters compared to the *S. aureus*-challenged quarters, independent of the cow haplotype ($p < 0.05$) (Fig. 1, only significant differences between haplotype groups, but not between pathogen groups are indicated with asterisks).

Differences in milk component analysis
Differences in milk component analysis between cows with haplotypes q vs. Q

The overall analysis of all cows and all quarters from both pathogen groups in one Bayesian model revealed significant differences in protein % at 0 h, which was significantly greater in Q than in q cows ($p=0.025$; Q: mean \pm sd = 2.97 ± 0.24 ; q: median = 2.76, IQR = 0.27; data not shown). Regarding the *S. aureus* group, there were significant differences between Q and q cows at later timepoints: the protein % was significantly greater in Q cows at 60 h *p. i.* ($p=0.048$, Fig. 2), as was the fat % at 84 h *p. i.* ($p=0.022$, Fig. 2). For pH, a trend at 72 h *p. i.* was detected to be greater for q than for Q cows ($p=0.055$).

In both pathogen groups, no significant differences were found for the lactose % in quarters of cows with different haplotypes (Fig. 2).

Differences in milk component analysis between cows challenged with *E. coli* and cows with *S. aureus*

Concerning the milk component analysis, few differences were found between the applied pathogens. The fat % was significantly greater in *S. aureus*-challenged cows than in *E. coli*-challenged cows at 0 h ($p < 0.01$) and 24 h ($p < 0.05$) (Fig. 2). Similarly, the lactose % was significantly lower in *E. coli*-challenged cows at 24 h *p. i.* ($p < 0.001$) than in *S. aureus*-challenged cows. No significant differences in pH or protein % were detected between the two pathogens (Fig. 2, only significant differences between haplotype groups, but not between pathogen groups are indicated with asterisks).

Differences in vaginal temperature
Course of VT during intramammary challenge

The analysis of the vaginal temperature (VT), which was measured every three minutes, revealed divergent curves for the two pathogens and between the two different

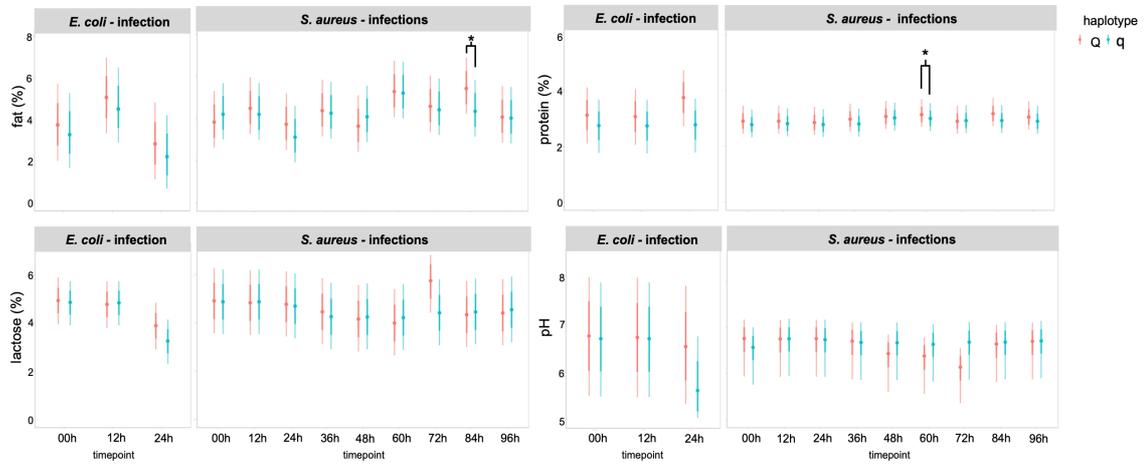


Fig. 2 Milk component analysis of milk samples from cows with divergent haplotypes during pathogen challenge. Illustration of the Bayesian model including fat %, protein %, lactose % and pH in milk of all quarters of primiparous cows with either favorable (Q) or unfavorable (q) haplotype, challenged with *Escherichia coli* (*E. coli*) for 24 h or with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) for 96 h. The dataset includes $n = 35$ cows, distributed as follows: *E. coli* challenge Q: $n = 5$, q: $n = 6$ and *S. aureus* challenge Q: $n = 12$, q: $n = 12$. Model predictions are presented as 80% and 95% confidence intervals of the mean. Differences between Q and q cows are indicated with * if $p < 0.05$ and with ** if $p < 0.01$ and *** if $p < 0.001$. Significant differences between the pathogen groups (*E. coli* vs. *S. aureus*) as well as differences over time relative to challenge are not shown

haplotypes, as shown in Fig. 3. The VT of *E. coli*-challenged cows was greater during the whole experiment in q than in Q cows. Vice versa, *S. aureus*-challenged cows with haplotype q showed an initially greater VT; however, this reversed after 48 h to a lower VT in q cows than in Q cows. While *E. coli*-challenged cows developed one vaginal temperature peak within the 24 h challenge,

S. aureus-challenged cows showed undulant vaginal temperature during the 96 h challenge. The circadian rhythm of the physiological body temperature during *S. aureus* challenge was affected for at least the first 36 h after infection (Fig. 3).

These findings revealed the effect of intramammary challenge on VT. To uncover significant differences

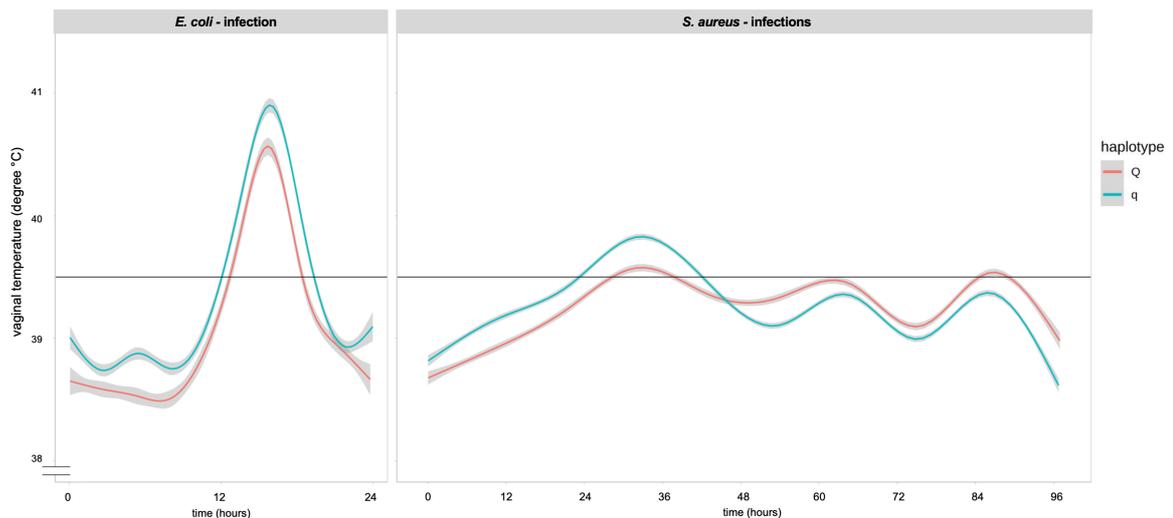


Fig. 3 Vaginal temperature of divergent haplotype cows during pathogen challenge. Vaginal temperature (in degrees Celsius) of primiparous cows with either favorable (Q) or unfavorable (q) haplotypes challenged with *Escherichia coli* (*E. coli*) for 24 h or with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) for 96 h. Vaginal temperature was measured every 3 min. The dataset included $n = 34$ cows, distributed as follows: *E. coli* challenge Q: $n = 5$, q: $n = 5$ and *S. aureus* challenge Q: $n = 12$, q: $n = 12$. The ggplot2 package [37] with the geom_smooth function, which uses a generalized additive model (gam), was used for visualization. The gray areas above and below the line represent the 95% confidence intervals, and the intercept is set at 39.5 °C

between the pathogen and haplotype groups, the data were further analyzed at 3-h and 12-h intervals.

Three-hour interval approach

With the Bayesian model, when analyzing the vaginal temperature at 3-h intervals, highly significant differences between both pathogens were detected at 12–15 h and 15–18 h after the start of the intramammary challenge. The vaginal temperature was greater in cows challenged with *E. coli* than in those challenged with *S. aureus* ($p < 0.001$; Fig. 4).

No significant differences were found between the two haplotypes (Q versus q) in this 3-h interval analysis (Fig. 4).

Twelve-hour interval approach

Using a 12-h interval approach, a comparison between the haplotypes revealed significant differences between Q and q cows. The two haplotypes did not differ in the *E. coli*-challenged group ($p > 0.1$, Fig. 5), but in the *S. aureus* group in the interval 12–24 h *p. i.* ($p = 0.029$), the vaginal temperature was significantly greater in q than in Q cows. Vice versa, in the interval of 48–60 h *p. i.* ($p = 0.011$), the vaginal temperature was significantly lower in q cows than in Q cows (Fig. 5).

Discussion

The aim of the present study was to compare the differential milk cell count (DMCC), parameters of milk component analysis and vaginal temperature between two divergent paternal haplotype groups (Q vs. q) during a controlled intramammary challenge experiment with either *E. coli* or *S. aureus* using Bayesian models. In our study, we started with the hypothesis that compared to conventional parameters, the DMCC, milk parameters and vaginal temperature would be better early indicators of a genetically driven differential early response to a mastitis pathogen challenge in an acute or a chronic mastitis model.

As expected, leukocyte subpopulations differed significantly between challenged and unchallenged quarters. This was the case for SCC, PMNs and live cell counts, that were significantly greater in the milk of the challenged quarters than in that of the unchallenged quarters 24 h after inoculation of *S. aureus*. In contrast, in the *E. coli* group all cell populations, except for lymphoid cells, were significantly higher in challenged compared to unchallenged quarters already 12 h after inoculation. This finding is in line with observations reported in several other studies [12, 13].

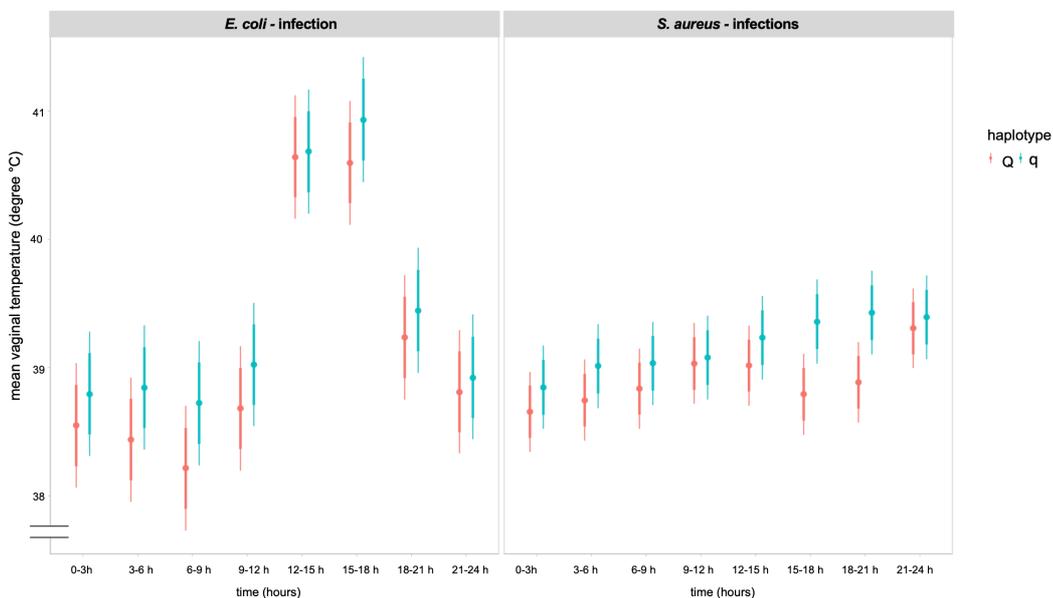


Fig. 4 Vaginal temperature of divergent haplotype cows during pathogen challenge illustrated in 3-h intervals. Illustration of the Bayesian model including the vaginal temperature (in degrees Celsius) of primiparous cows with either favorable (Q) or unfavorable (q) haplotypes challenged with *Escherichia coli* (*E. coli*) for 24 h or with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) for 96 h. Vaginal temperature was measured every 3 min and summed into 3-h intervals. The dataset included $n = 34$ cows, distributed as follows: *E. coli* challenge Q: $n = 5$, q: $n = 5$ and *S. aureus* challenge Q: $n = 12$, q: $n = 12$. Model predictions are presented as 80% and 95% confidence intervals of the mean. Statistical analysis did not reveal any significant differences ($p < 0.05$) between Q and q cows. Significant differences between the pathogen groups (*E. coli* vs. *S. aureus*) as well as differences over time relative to challenge are not shown

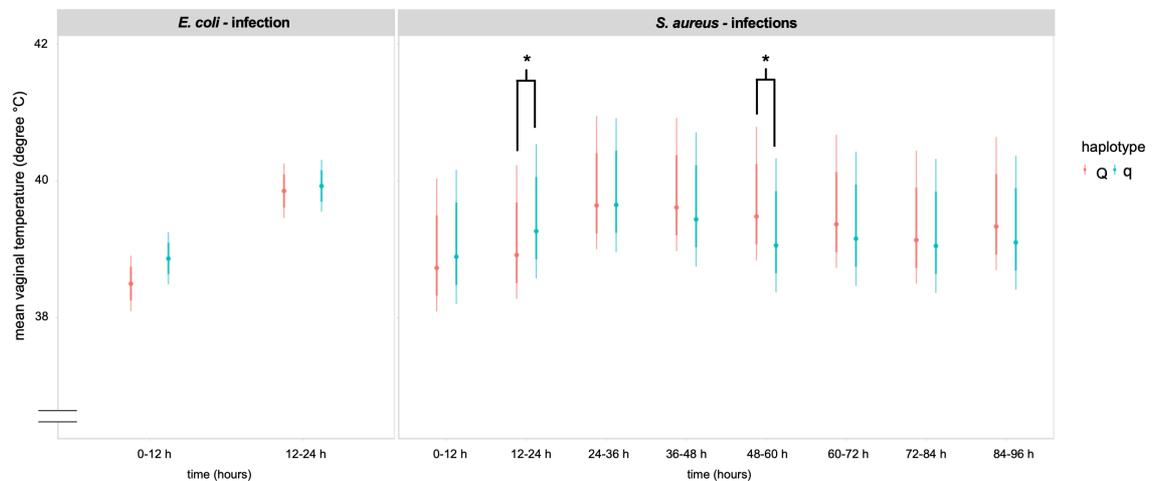


Fig. 5 Vaginal temperature of divergent haplotype cows during pathogen challenge illustrated in 12-h intervals. Illustration of the Bayesian model including the vaginal temperature (in degrees Celsius) of primiparous cows with either favorable (Q) or unfavorable (q) haplotypes challenged with *Escherichia coli* (*E. coli*) for 24 h or with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) for 96 h. The vaginal temperature was measured every 3 min and summarized into 12-h intervals. The dataset included data for 34 cows, distributed as follows: *E. coli* challenge Q: $n=5$, q: $n=5$ and *S. aureus* challenge Q: $n=12$, q: $n=12$. Model predictions are presented as 80% and 95% confidence intervals of the mean. Differences between Q and q cows are indicated with * if $p < 0.05$ and with ** if $p < 0.01$ and *** if $p < 0.001$. Significant differences between the pathogen groups (*E. coli* vs. *S. aureus*) as well as differences over time relative to challenge are not shown

Although the differences were less pronounced than expected, we confirmed our hypothesis regarding DMCC differences between Q and q cows in the *S. aureus* model: the DMCC showed significantly more PMNs in the milk of q cows than in that of Q cows at 24 h, a greater SCC at 24 and 36 h, an elevated number of live and large cells (24 h *p. i.*) as well as dead cells (36 h *p. i.*) after challenge. Such differences were not observed in the acute mastitis model, as no differences between Q and q cows were detected after intramammary infection with *E. coli*. This might be due to the experimental setup with a shorter period of observation after inoculation with *E. coli* (24 h) than after inoculation with *S. aureus* (96 h), which is a limitation of the present study. Another limitation of this experimental setup of this study involves the comparability of untreated udder quarters and quarters treated with saline solution. Surprisingly, DMCC in milk samples of these quarters differed significantly in the *E. coli* group (12 h and 24 h) as well as in the *S. aureus* group (24 h - 96 h). This was unexpected, as these two treatments were both meant to serve as negative controls. The observed differences cannot be explained by the fact, that on one treatment group saline solution was inserted and in the other treatment group the teat channel and udder parenchyma was not touched, because both pathogen groups showed inverse results. In the *S. aureus* group, the untreated quarters were lower in cell counts compared to the saline solution treated quarters (numerically at 0 h

and 12 h, significantly 24 h - 96 h). But in the *E. coli* group it was the other way around: untreated quarters showed higher numbers of leukocyte subpopulations compared to quarters treated with saline solution. It can be speculated that these differences originate from the allocation of the treatment groups, which were different in the two pathogen groups: In the *E. coli* group the hind left quarter was treated with saline solution, and the front right and front left quarters remained untreated. In the *S. aureus* group, the front left quarter was treated with saline solution, and the front right quarter remained untreated. These differences in DMCC between untreated quarters and saline solution were relatively low and had no impact on clinical parameters as swelling or pain. However, this aspect must be taken into account in future study designs.

Overall, the findings concerning the dynamics of the different cell populations in the milk of challenged quarters are in accordance with a study from Rivas et al. (2001), who found PMNs to be the predominant subpopulation during an intramammary challenge experiment [20]. In the same study, the authors demonstrated the possibility of detecting nonmastitic, early inflammatory and late inflammatory reactions within their study population (inoculated *S. aureus* in six lactating cows) via DMCC analysis. They demonstrated an early increase in the percentage of PMNs and a decrease in lymphocytes one day after inoculation. At days four to eight, PMNs

were the predominant subpopulation, but the percentage of mononuclear cells increased [20]. Using the DMCC, Wall et al. observed a shift in different cell populations, predominantly PMNs, even at low SCC levels after intramammary treatment with LPS [27]. A study from Damm et al. revealed increasing proportions of PMNs and decreasing proportions of macrophages as the SCC increased, whereas the lymphocyte population remained consistently lower than the other cell populations [30].

The cows included in this study were genetically selected via SNP genotyping for alternative paternal chromosome 18 haplotypes associated with favorable (Q) or unfavorable (q) effects on the health of the mammary gland. During the selection procedure, the somatic cell score (SCS) served as a surrogate for mastitis incidence [10, 38–40]. Beyond that, strict selection criteria, for example, only primiparous cows, equal housing conditions, and a highly standardized experimental setup and data collection, were applied to reach the maximal scientific output. Furthermore, Bayesian models including variable and fixed effects were used as up-to-date and robust statistical analyses to complete the high-grade data analysis. The consideration of individual cow effects was applied in the Bayesian models to achieve the most accurate predictions.

To date, other in vivo studies that investigate DMCC in the milk of cows with divergent genetics regarding mastitis resistance in general and with respect to the target region on BTA18 in particular are lacking. Although the confirmed quantitative trait locus (QTL) on BTA18 has been associated with important performance traits, such as calving ease and stillbirth [41–44], several authors have attempted to identify the exact causal mutation, which has recently been further investigated by Dachs et al. [45].

In parallel to the in vivo infection model, a long-term trial including $n=6$ selected cows (Q: $n=3$, q: $n=3$) for two lactation periods was performed by our scientific group at the Research Institute for Farm Animal Biology in Dummerstorf, Germany. In the long-term trial, it was shown that the average SCC was significantly greater in q cows than in Q cows [46], and these individuals had more subclinical mastitis. This finding is in line with a greater PMN level and SCC after pathogen challenge in the q cows in the present study. Additionally, in a previous publication of this group including the same set of cows used for the intramammary infection model, quarter milk yield and bacterial shedding were analyzed. No significant differences between the haplotypes regarding quarter milk yield could be detected, but the total milk yield decrease 12 h and 24 h after the start of the challenge was minor in Q cows compared to q cows. Concerning the bacterial shedding in milk, cows with haplotype Q

showed fewer colony-forming units in milk samples from challenged quarters 12 h after intramammary inoculation than did those with haplotype q [38].

In addition to the DMCC analysis, within this study, the milk parameters protein %, fat %, lactose % and pH were analyzed at the quarter milk level during the challenge experiment. These serve as the most important parameters for describing milk composition and can be interpreted in the context of important physiological processes such as energy balance and changes in the blood–milk barrier. In the case of IMI, pathogen-dependent changes in milk yield and quality have been reported [47, 48]. In addition to negative correlations between the SCC and milk yield, positive correlations between the SCC and the percentage of fat and protein were also reported [49]. Conversely, negative correlations were found between IMI and the milk parameters fat, protein and lactose [50]. Clinical signs of mastitis coincided with lower lactose and higher protein concentrations. In the same clinical trial, greater changes in milk yield were observed for IMI with *E. coli* than with *S. aureus*, but *S. aureus* IMI led to slightly reduced lactose concentrations [47]. Similarly, in other studies that included mastitis-causing pathogens such as *S. aureus*, reduced lactose was found in patients with subclinical mastitis, but no difference in protein or fat content was reported [51]. In the present study, at 24 h, the lactose % was significantly lower in the milk of *E. coli*-challenged cows than in that of *S. aureus*-challenged cows, which can be explained by the reduced synthesis capacity of MECs due to the inflammatory response. In addition, IMI changes blood–milk barrier permeability, which leads to a concurrent efflux of lactose and potassium into the bloodstream and a simultaneous increase in sodium, chloride and proteins from the bloodstream into the milk [48]. Because lactose is exclusively produced in the mammary gland and cannot pass through an intact epithelial barrier [52], this difference in lactose may also be explained by leakage through the impaired tight junctions of the MEC [53]. Concerning the comparison of pathogen-specific effects, we most likely detected a lower lactose % in the *E. coli* group, as inflammation was more vigorous and bacterial shedding was greater [38], indicating greater metabolism of lactose and, therefore, a lower lactose % in the *E. coli* group than in the *S. aureus*-challenged group. Furthermore, the severity of clinical signs during mastitis coincides with lower lactose concentrations in cows with IMI caused by *S. aureus*, *Streptococcus uberis* and *E. coli*, with the greatest decrease in *E. coli*-affected animals [47]. However, as the setup of the present studies does not allow for mechanistic conclusions, these explanations remain speculative.

Interestingly, the protein % was significantly greater in milk from Q cows than in milk from q cows at 0 h.

Regarding the *S. aureus* group, Q cows had a significantly greater protein % in milk at 60 h. Although these differences might be side effects, it is noteworthy that in both pathogen groups at all other timepoints, the protein % was also numerically greater in Q cows than in q cows.

As anticipated, we also showed that the vaginal temperature was significantly greater in *E. coli*-challenged cows than in *S. aureus*-challenged cows between 12 and 18 h *p. i.* This finding is in line with previous studies demonstrating a greater and faster increase in rectal body temperature in *E. coli*-challenged cows [13]. However, in the present study, we detected small-scale changes throughout the entire experimental period due to the use of intravaginal temperature loggers. The measurement of vaginal temperature with loggers has the advantage of detecting diurnal and accurate changes in body temperature compared to measuring rectal body temperature with thermometers [54]. An increase in body temperature is an important reaction of the host to fight against invading pathogens. As reported by several authors, MECs are more capable of inducing stronger cytokine and chemokine synthesis after IMI with *E. coli* than after IMI with *S. aureus* and are responsible for the activation of immune functions to eradicate pathogens [55–57]. This also explains the faster and greater increase in body temperature in *E. coli*-inoculated cows, as shown in our study.

In addition, our study revealed haplotype-dependent differences concerning vaginal temperature. In the *E. coli*-challenged group, Q and q cows showed comparable reactions, with a constant increase in vaginal temperature with the onset of inflammation. In contrast, the initial increase in the vaginal temperature of *S. aureus*-challenged q cows at 0 h and 12–24 h reversed to a decrease in the vaginal temperature in q cows compared to Q cows at 48–60 h. As previously published, our group showed that the incidence of metritis after calving was lower in Q cows than in q cows and that Q cows rarely developed fever [40, 46]. These findings suggest that Q cows are less susceptible to infectious diseases than q cows are. Examining the (patho)physiological mechanisms underlying these differences requires further study.

Taken together, these main findings concerning the pathogen comparison are consistent with the existing body of literature and emphasize the validity of this intramammary challenge model. The use of two pathogens, *E. coli* and *S. aureus*, to model acute and chronic mastitis is widely acknowledged, as previously reviewed by Petzl et al. [17]. However, to the best of our knowledge, this is the first IMI model study to compare two divergent BTA18 haplotypes (favorable Q vs. unfavorable q) during a controlled intramammary challenge with either *E. coli* or *S. aureus*.

Conclusion

In conclusion, specific differences in the DMCC, milk parameters and vaginal temperature could be detected between diverging haplotype cows after intramammary infection with *S. aureus*. However, the potential of the DMCC for the refined identification of early response differences to mastitis pathogens could not be confirmed.

Taken together, this study showed that with a highly standardized intramammary challenge experiment combined with robust statistical analyses, it was possible to observe differences between primiparous cows inheriting divergent paternal haplotypes. The results suggest that haplotype selection for mastitis susceptibility works but is far more complex than expected. These findings are relevant to the field, as they provide more information about the connection between genetics and immune functions, leading to mastitis susceptibility.

Methods

In vivo infection model

In total, 36 cows were included in this study, which was conducted between January and September 2016 at the Clinic for Cattle at the University of Veterinary Medicine Hanover (TiHo). The study was approved by the Lower Saxony Federal State Office for Consumer Protection and Food Safety (reference number 33.12–42,502–04–15/2024; approval date: December 15th, 2015). Previously published results included the observed differences between the favorable (Q) and unfavorable (q) BTA18 haplotype half-sib cows before and after parturition [40] as well as the details concerning the in vivo infection model [38]. In brief, 36 primiparous Holstein Friesian cows were selected based on two divergent paternal BTA18 haplotypes, with a focus on the SCC as a marker for udder health and mastitis susceptibility (favorable haplotype Q $n=18$, unfavorable haplotype q $n=18$). The cows were purchased from German conventional private dairy farms. From at least four weeks before the expected calving until the end of the intramammary challenge experiment, the animals were kept in individual pens on straw at the Clinic for Cattle, TiHo Hanover. The cows received component rations adjusted to their lactation/gestation status and milk yield, and they were intensively monitored. Details concerning the selection process, daily management of the cows and clinical examination have previously been published [40]. On Day 36 ± 3 after calving, the cows received an intramammary challenge with either *E. coli*₁₃₀₃ (Q: $n=6$, q: $n=6$) or *S. aureus*₁₀₂₇ (Q: $n=12$, q: $n=12$) followed by necropsy after 24 h in the case of *E. coli* challenge or after 96 h in the case of *S. aureus* challenge (Fig. 6A). We decided to use differing numbers of animals between the two pathogen groups because it was an important goal to use the lowest animal

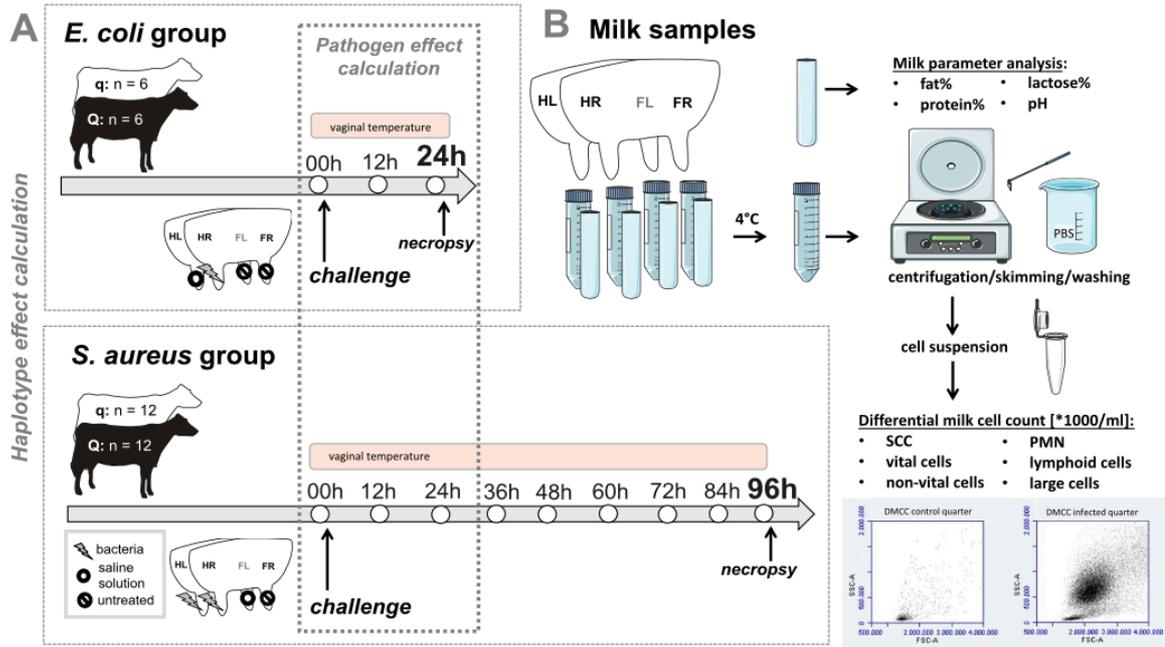


Fig. 6 Experimental setup (5A) and sample processing (5B) of the in vivo infection model. **A** Illustration of the experimental setup including $n = 36$ primiparous Holstein Friesian cows with either favorable (Q) or unfavorable (q) BTA haplotypes. After intramammary challenge with *Escherichia coli* (*E. coli*) for 24 h, the hind right (HR) quarter was challenged, the hind left (HL) quarter was treated with saline solution as a control quarter, and the front right (FR) and front left (FL) quarters remained untreated. After challenge with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) for 96 h, the HR and HL quarters were challenged, the FL was treated with saline solution, and the FR remained untreated. Cows were milked with a quarter milking system every 12 h during the challenge to assess full milk samples and milk yield at the quarter level, and vaginal temperature was measured every 3 min during the challenge. **B** Illustration of milk sample processing for milk component analysis and differential milk cell count (DMCC). Milk samples were stored at 4 °C, and one set of samples per cow at each timepoint was analyzed for the milk parameters fat %, protein %, lactose % and pH. With another set, several washing, skimming and centrifugation steps were performed until the cell suspension was analyzed for the DMCC via flow cytometry to assess the absolute somatic cell counts (SCCs) and numbers of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and live, dead, lymphoid and large cells

number possible according to the 3R principle but still generate robust results and detect differences between the two haplotypes. The number of animals subjected to both challenges was allocated via a power analysis that respected the increase in the SCC after intramammary challenge with *E. coli* and *S. aureus*, which is the key surrogate for mastitis susceptibility during the Q/q haplotype selection process. As previously published by our group, the increase in the SCC is greater and more homogenous in *E. coli*-challenged cows than in *S. aureus*-challenged cows [13]. Therefore, a smaller number of animals is needed to detect significant differences within the *E. coli* group. The rationale behind the two different time courses was animal welfare. It is known that the course of inflammation after infection with *E. coli* is acute and associated with a strong increase in body temperature and severe clinical signs of inflammation, including swelling and pain, in the affected udder quarter. In contrast, the course of inflammation after infection with *S. aureus* is less

severe, less homogenous and less chronic. To avoid excessive suffering of the cows included in the study and to stay within the ranges of cancellation criteria, the duration of the follow-up period after intramammary challenge was shorter in the *E. coli* group than in the *S. aureus* group. For *E. coli* challenge, the right hind quarter was inoculated with the pathogen, whereas the left hind quarter was inoculated with saline solution, and both front quarters served as untreated negative control quarters. In the case of *S. aureus* challenge, both hindquarters were inoculated with the pathogen, whereas the left front quarter was inoculated with saline solution, and the right front quarter served as the untreated negative control quarter (Fig. 6A). Intramammary infection was successfully induced in all cows enrolled in the in vivo infection model. Each cow developed clinical signs of mastitis, and the respective pathogen was repeatedly recovered from the milk samples after the inoculation of every cow. The clinical results



Fig. 7 Quarter milking system. Photo of the quarter milking system, which was used every 12 h during the challenge experiment to milk the cows to assess the milk yield and representative full milk samples at the quarter level

of the in vivo infection model have previously been published [38].

Milk component analysis and the DMCC

During the intramammary challenge experiment, the cows were milked every twelve hours with a quarter milking system (Fig. 7) to assess the milk yield, and representative samples were collected at the quarter level at each timepoint (*E. coli*: 0 h, 12 h, 24 h; *S. aureus*: 0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h and 96 h) (Fig. 6A).

The SCC, DMCC and milk parameters were analyzed for each milk sample (Fig. 6B). One full-quarter milk sample (Volume 50 ml) from each cow at each timepoint was preserved with bronopol, stored at 4 °C, transported on dry ice and analyzed via MilkoScan™ FT+ (Foss Analytics, Denmark) at Milchwirtschaftlicher Kontrollverband Mittelweser e.V. (Rehburg-Loccum, Germany) for the fat %, protein %, lactose %, pH and SCC.

For flow cytometric analysis, 50 ml per quarter was collected into a centrifuge tube™ (Corning CentriStar, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany), placed on ice for transport to the laboratory and stored at 4 °C until further processing to isolate the milk cells for the DMCC (Fig. 6B). The first centrifugation step was performed at 1,000 g and 4 °C for 10 min (Universal 32 R, Hettich, Tuttlingen, Germany), followed by removal of the cream layer and discarding of the supernatant. To suspend the cell pellet, 50 ml of phosphate-buffered saline (PBS, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added. The second centrifugation was performed at 400×g and 4 °C for 10 min. The remaining cream was removed, and the final centrifugation step was performed at 250×g and 4 °C for 10 min. Then, the remaining cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS by vortexing (Vortex ZX3, Velp Scientifica, Usmate (MB), Italy) and labeled for flow cytometry. Next, 50 µl of the milk cell suspension was transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany). Then, 100 µl of diluted propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and 50 µl of diluted acridine orange (AO, 0.01%, Polysciences Inc., Warrington, USA) were added. Both AO and PI are DNS-intercalating dyes, but PI can stain only necrotic cells. Therefore, the combination of AO and PI was used to differentiate between live and dead cells.

Flow cytometric analysis of the milk cell suspension samples was performed with a BD Accuri™ C6 Plus flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). For each sample, 20,000 events were counted and displayed as dot plots with CFlow Sampler Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). The cells that were labeled PI positive and AO positive were categorized as dead cells. The cells that were labeled PI negative and AO positive were categorized as live cells. According to previous studies [22, 29, 58], characteristics measured via forward scatter (FSC, size-related) and side scatter area (SSC, complexity- and granularity-related) allow for the differentiation of live cells into lymphoid cells, PMNs and large cells. Gating strategy to determine fractions of leukocytes among milk cells was performed in four steps: (1) Identification of nucleated cells in a PI/SSC-Area density plot after staining with AO. (2) Identification of viable, PI-negative cells in a PI/SSC-Area density plot. (3) Identification of single AO+/PI- cells in an FSC-Area/FSC-Height density plot. (4) Identification of major cell populations among single AO+/PI- milk cells in a FSC-A/SSC-A density plot. PMNs, lymphoid cells, and large cells were identified according to Mehne et al. (2010) [58], who used cell type-specific antibodies. The gating strategy is illustrated in Additional Fig. 2.

It can be assumed that the events recorded as lymphoid cells with this technique include B and T cells as

well as natural killer cells of small size. Events recorded as PMNs include neutrophilic granulocytes, whereas events recorded as large cells are macrophages, epithelioid cells, monocytes and large natural killer cells. The percentages of live cells, lymphoid cells, PMNs and large cells were calculated with CFlow Sampler software and transferred to the central project database until further statistical analysis. The percentage of dead cells was calculated as '100%-percentage of live cells'. Although the SCC was measured together with the other milk parameters (fat %, protein %, lactose % and pH) via MilkoScan™ FT+ analysis (see above), it is mentioned as part of the DMCC in our study because the SCC built the basis for absolute number calculation of the PMNs, live, dead, lymphoid and large cell subgroups. Absolute numbers per ml were calculated by multiplication of the percentages with the SCC per ml.

Vaginal temperature monitoring

During the whole intramammary challenge experiment, the vaginal temperature was measured every 3 min. Therefore, a vaginal data logger (HOBO U12 Stainless Temperature (4,900 ft.), Onset Computer Corporation, Bourne, Massachusetts/USA) was inserted on a plastic device (EAZI-BEED CIDR-blank, Zoetis, USA) and placed into the vagina of the cow (Fig. 6A) as previously described by Smith et al. and Espejo et al. [59]. The data were recorded on a USB mass storage device. At the end of the experiment, shortly before necropsy, the vaginal temperature logger was removed, and the sample was placed directly into cold water to mark the extraction timepoint. The data were saved from the USB device. For each cow, only the data from the start of the experiment until extraction of the logger were transferred to the central project database until further statistical analysis. All values < 36.5 °C were excluded because they were non-physiological. In one cow, missing values occurred because the logger had to be reinserted multiple times. Hence, a total of 54,349 data points for *S. aureus*-challenged cows and 4,728 data points for *E. coli*-challenged cows were analyzed. For further analysis, mean values for each cow at 3-h and 12-h intervals were calculated. Both interval approaches were applied to analyze the differences between the two pathogen groups (*E. coli* vs. *S. aureus*) from 0 h until 24 h (*E. coli*-challenge ended) as well as for comparisons between the two BTA18 haplotype groups (Q vs. q).

Statistical analysis

Concerning the data analysis included in this part of the project, one cow (haplotype Q, pathogen *E. coli*) was excluded. This cow had a congenital defect of the teat channel in two udder quarters. The two teat channels were not

consistent, so it was only possible to milk this cow on the remaining two functional udder quarters. As the cows were selected for the experiment before their first calving, this defect was not detected until parturition. The cow reached an adequate average daily milk yield and was subjected to *E. coli* challenge. However, concerning the data presented here, we decided to exclude this cow and only use animals with four intact udder quarters. Therefore, the dataset used for the DMCC and milk component analyses included 35 cows, which were subjected to the following conditions: *E. coli* challenge, Q: $n=5$; q: $n=6$ for 24 h; and *S. aureus* challenge, Q: $n=12$, q: $n=12$ for 96 h. Due to a lack of data transfer, another cow (haplotype q, pathogen *E. coli*) had to be excluded from the vaginal temperature analysis. All the data were refined in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Microsoft Excel, 2018) and analyzed using R statistical software [60]. In the case of missing values (< 1%), data were collected during the analysis in R statistical software using the 'missRanger' package [61].

Data analysis of the DMCC and SCC, milk component analysis and vaginal temperature was performed using Bayesian models with the R package 'brm' [62, 63]. The response variable was either a DMCC parameter (SCC, PMNs, lymphoid cells, large cells, live cells or dead cells), a milk parameter (fat %, protein %, lactose % or pH) or the mean vaginal temperature during a 3-h or 12-h interval. Cow individuality was considered within the model via random effects on the intercept, and interactions between haplotype and timepoint (haplotype*timepoint) or between the respective pathogen and timepoint (pathogen*timepoint) for repeated measures were also assessed. These models were used to determine differences between challenged and unchallenged quarters ("treatment": challenged vs. untreated vs. saline solution), differences between the two pathogens (*E. coli* vs. *S. aureus* during the first 24 h *p. i.*) and differences between the haplotypes (Q vs. q) during the first 24 h in *E. coli*-challenged cows and for 96 h in *S. aureus*-challenged cows.

The analysis of the DMCC (data log transformed), milk components and VT with the Bayesian models was performed as as listed in Table 1.

Post hoc pairwise comparisons among groups after fitting a model were performed using the package 'emmeans' [64] for estimated marginal means.

To calculate the *p* values for the pairwise comparisons from the Bayesian models, the package 'bayestestR' was used [65].

To calculate the differences in protein % between Q and q cows at 0 h, the data were tested for a normal

Table 1 Bayesian models for analysis of differential milk cell count (DMCC), milk components and vaginal temperature (VT)

DMCC

Analysis of all cows and all quarters from both pathogen groups in one Bayesian model:

$$\text{Model} = \text{brm}(\log(\text{"response variable"}) \sim \text{haplotype} * \text{pathogen} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

Differences between challenged and untreated or saline solution treated quarters (irrespective of haplotype):

$$\text{Model}(E. coli) = \text{brm}(\log(\text{"response variable"}) \sim \text{treatment} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(S. aureus) = \text{brm}(\log(\text{"response variable"}) \sim \text{treatment} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

Differences between haplotypes were analyzed using the following code (filtered for treatment, only inoculated quarters):

$$\text{Model}(E. coli) = \text{brm}(\log(\text{"response variable"}) \sim \text{haplotype} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(S. aureus) = \text{brm}(\log(\text{"response variable"}) \sim \text{haplotype} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

Differences between pathogens were analyzed using the following code (filtered for treatment, only inoculated quarters):

$$\text{Model}(Q) = \text{brm}(\log(\text{"response variable"}) \sim \text{pathogen} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(q) = \text{brm}(\log(\text{"response variable"}) \sim \text{pathogen} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

Milk component analysis

Analysis of all cows and all quarters from both pathogen groups in one Bayesian model:

$$\text{Model} = \text{brm}(\text{"response variable"} \sim \text{haplotype} * \text{pathogen} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

Differences between haplotypes were analyzed using the following (not filtered for any treatment, all quarters are modeled together):

$$\text{Model}(E. coli) = \text{brm}(\text{"response variable"} \sim \text{haplotype} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(S. aureus) = \text{brm}(\text{"response variable"} \sim \text{haplotype} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

Differences between pathogens were analyzed using the following code (not filtered for any treatment, all quarters are modeled together):

$$\text{Model}(Q) = \text{brm}(\text{"response variable"} \sim \text{pathogen} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(q) = \text{brm}(\text{"response variable"} \sim \text{pathogen} * \text{timepoint} + (1|\text{cow}))$$

Vaginal temperature

Differences between the haplotypes used to analyze the mean vaginal temperature (mean_VT) at both the 3-h and 12-h intervals were analyzed using the following model:

$$\text{Model}(E. coli) = \text{brm}(\text{mean_VT} \sim \text{haplotype} * \text{time_interval} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(S. aureus) = \text{brm}(\text{mean_VT} \sim \text{haplotype} * \text{time_interval} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(Q) = \text{brm}(\text{mean_VT} \sim \text{pathogen} * \text{time_interval} + (1|\text{cow}))$$

$$\text{Model}(q) = \text{brm}(\text{mean_VT} \sim \text{pathogen} * \text{time_interval} + (1|\text{cow}))$$

distribution and are presented as the mean/median and standard deviation (SD)/interquartile range (IQR).

P values between 0.05 and 0.01 were regarded as statistically significant (*). *P* < 0.01 was regarded as significant (**), and *p* < 0.001 was regarded as highly significant (***).

SCS	Somatic Cell Score
SD	Standard deviation
SNP	Single nucleotide polymorphism
TiHo	University of Veterinary Medicine Hannover
USB	Universal series bus
VT	Vaginal temperature
μL	Microliter

Abbreviations

%	Percent
BTA18	<i>Bos taurus</i> Autosome 18
CMT	California Mastitis Test
DMCC	Differential Milk Cell Count
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e. g.	Exempli gratia
h	Hours
IMI	Intramammary infection
IQR	Inter quartile range
LPS	Lipopolysaccharide
MEC	Mammary epithelial cells
ml	Milliliter
<i>p. i.</i>	Post inoculation
PMNs	Polymorphonuclear neutrophils
QTL	Quantitative trait locus
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC	Somatic cell count

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03996-y>.

Additional file 1: Additional Figure 1. DMCC of quarter milk samples of differentially challenged udder quarters. Illustration of the Bayesian model including logarithmized number [cells/ml] of polymorphonuclear neutrophils (PMN), somatic cell count (SCC), lymphoid cells, large cells, vital and non-vital cells in milk of challenged (one/two quarter/s), versus non-infected (one quarter), versus control quarters (one quarter, treated with saline solution 0.9%) of uniparous cows challenged with *Escherichia coli* (*E. coli*) in one udder quarter for 24 hours or with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in two udder quarters for 96 hours. The dataset includes *n* = 35 cows, distributed as follows: *E. coli* challenge: *n* = 11 and *S. aureus* challenge: *n* = 24. Model predictions are presented as 80% and 95% confidence intervals of the mean. Differences between non-infected, control and infected quarters are indicated with * if *p* < 0.05 and with ** if *p* < 0.01 and *** if *p* < 0.001. Significant differences between the haplotype groups

(Q vs. q), pathogen groups (*E. coli* vs. *S. aureus*) as well as differences over time relative to challenge are not shown.

Additional file 2: Additional Figure 2. Illustration of gating strategy for differential cell count in milk samples. Gating strategy to determine fractions of leukocytes among milk cells. A) Identification of nucleated cells in a PI/SSC-A density plot after staining with acridine orange (AO). B) Identification of viable, propidium iodide (PI)-negative cells in a PI/SSC-A density plot. C) Identification of single AO+/PI- cells in a FSC-area/FSC-height density plot. D) Identification of major cell populations among single AO+/PI- milk cells in a FSC-A/SSC-A density plot. PMN (polymorphonuclear leukocytes), lymphoid cells, and large cells were identified according to Mehne et al. (2010) [58], who used cell type-specific antibodies to identify polymorphonuclear neutrophils (PMN), lymphoid cell subpopulations, monocytes, and macrophages. FSC, forward scatter; SSC, side scatter.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Förderverein Bioökonomieforschung e.V. for their support. We would also like to thank Hans-Martin Seyfert and Juliane Günther for contributing to the design of the study and we would especially like to thank Tordis Eickhoff, Annika Heimes, Johanna Brodhagen, Alina Hülsebusch, Sebastian Jander, Matthias Linden, Mirja Koy, Laura Macias, Laura Rohmeier and Lara Steinhoff for their unremitting and valuable efforts during the realization of the in vivo model. Furthermore, we would like to thank the technical assistants Silke Schöneberg, Udo Rabe and Sonja Kordex from the Immunology Unit, the staff of the Clinic for Cattle as well as the personnel of the Institute for Pathology, the University of Veterinary Medicine Hanover Foundation and the staff of the Milchkontrollverband Mittelweser e.V., Sandra Kirsch and Frank Weber from the laboratory of the Clinic for cattle, and LMU Munich, for their continuous help, assistance and patience during the realization of the experiment. Finally, we would like to thank Rory Champion for native speaker correction of the manuscript.

Authors' contributions

The study design was set up by SE, MH, CK, HJS, HZ and WP. MH, CK, HJS, HZ, WP and MMW performed the intramammary challenge model and data collection. LO carried out the data processing. KML, YZ and MMW performed the data analyses and designed the graphical illustrations. KML, WP and MMW generated the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study was funded by the German Federal Institute for Agriculture and Food (BLE) and the German Government's Special Purpose Fund held at Landwirtschaftliche Rentenbank (grant number: 740718) and supported by the Förderverein Bioökonomieforschung e.V. and the Milchwirtschaftlicher Kontrollverband Mittelweser e.V. The funding had no impact on the design of the study, collection, analysis, interpretation of the data, the development of, and decision to publish the manuscript.

Availability of data and materials

The primary data and the applied statistical codes used in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was evaluated and approved by the ethics committee of the University of Veterinary Medicine, Hanover. The experiment was conducted between January and September 2016 under the approval of the Lower Saxony Federal State Office for Consumer Protection and Food Safety (reference number 33.12-42502-04-15/2024; Approval date: 15th December 2015). All ethical evaluations were performed as required by the German Animal Care law and associated legislative regulations ("Tierschutzgesetz", <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschp/BjNR012770972.html>). Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Clinic for Ruminants With Ambulatory Clinic and Herd Health Services, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Sonnenstrasse 16, Oberschleissheim 85764, Germany. ²Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University Munich, Sonnenstrasse 24, Oberschleissheim 85764, Germany. ³Technical University Braunschweig, Institute for Microbiology, Inhoffenstrasse 7, Brunswick 38124, Germany. ⁴Helmholtz Center for Infection Research, Microbial Proteomics, Inhoffenstrasse 7, Brunswick 38124, Germany. ⁵Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine Hanover Foundation, Bischofsholer Damm 15, Hanover 30173, Germany. ⁶Research Institute for Farm Animal Biology, Genome Biology, Wilhelm-Stahl-Allee 2, Dummerstorf 18196, Germany. ⁷Agricultural and Environmental Faculty, University Rostock, Justus-Von-Liebig-Weg 6, Rostock 18059, Germany. ⁸Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, Greifswald-Insel Riems 17493, Germany. ⁹Institute for Immunology, University of Veterinary Medicine Hanover Foundation, Bünteweg 2, Hanover 30559, Germany.

Received: 5 January 2024 Accepted: 27 March 2024

Published online: 15 May 2024

References

- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*. 2007;29(1):18–31.
- Hogeveen H, Huijps K, Lam T. Economic aspects of mastitis: New developments. *N Z Vet J*. 2011;59(1):16–23.
- Hillerton J, Berry E. A review. Treating mastitis in the cow—a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol*. 2005;98:1250–5.
- Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci*. 2017;100(12):10381–97.
- Janzen JJ. Economic Losses Resulting from Mastitis. A Review 1. *J Dairy Sci*. 1970;53(9):1151–60.
- Bludau MJ, Maeschli A, Leiber F, Steiner A, Klocke P. Mastitis in dairy heifers: Prevalence and risk factors. *Vet J*. 2014;202(3):566–72.
- Brand B, Baes C, Mayer M, Reinsch N, Seidenspinner T, Thaller G, et al. Quantitative trait loci mapping of calving and conformation traits on Bos taurus autosome 18 in the German Holstein population. *J Dairy Sci*. 2010;93(3):1205–15.
- Cole JB, VanRaden PM, O'Connell JR, Van Tassel CP, Sonstegard TS, Schnabel RD, et al. Distribution and location of genetic effects for dairy traits. *J Dairy Sci*. 2009;92(6):2931–46.
- Griesbeck-Zilch B, Osman M, Kühn C, Schwerin M, Bruckmaier RH, Pfaffl MW, et al. Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. *J Dairy Sci*. 2009;92(9):4621–33.
- Brand B, Baes C, Mayer M, Reinsch N, Kühn C. Identification of a two-marker-haplotype on Bos taurus autosome 18 associated with somatic cell score in German Holstein cattle. *BMC Genet*. 2009;10(1):1–13.
- Kühn C, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, et al. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *J Dairy Sci*. 2003;86(1):360–8.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(3):463–72.
- Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Yang W, Seyfert HM, Nurnberg G, et al. 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(2):18.

14. Leitner G, Yadlin B, Glickman A, Chaffer M, Saran A. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Res Vet Sci*. 2000;69(2):181–4.
15. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 1988;16(1):41–66.
16. 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(5):521–64.
17. Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Seyfert HM, Hussen J, Schuberth HJ. Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Res Vet Sci*. 2018;116:55–61.
18. Farschtschi S, Mattes M, Pfaffl MW. Advantages and Challenges of Differential Immune Cell Count Determination in Blood and Milk for Monitoring the Health and Well-Being of Dairy Cows. *Vet Sci*. 2022;9(6):255.
19. Koess C, Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J Dairy Res*. 2008;75(2):225–32.
20. Rivas AL, Quimby FW, Blue J, Coksaygan O. Longitudinal Evaluation of Bovine Mammary Gland Health Status by Somatic Cell Counting, Flow Cytometry, and Cytology. *J Vet Diagn Invest*. 2001;13(5):399–407.
21. Sumon S, Parvin MS, Ehsan MA, Islam MT. Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Vet World*. 2020;13(8):1709–13.
22. Schwarz D, Diesterbeck US, König S, Brügemann K, Schlez K, Zschöck M, et al. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *J Dairy Sci*. 2011;94(10):5033–44.
23. Le Roux Y, Laurent F, Moussaoui F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Vet Res*. 2003;34(5):629–45.
24. Schwarz D, Diesterbeck US, König S, Brügemann K, Schlez K, Zschöck M, et al. Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *J Dairy Res*. 2011;78(4):448–55.
25. Ruegg PL, Reinemann DJ. Milk quality and mastitis tests. *The Bovine Practitioner*. 2002:41–54.
26. Redelman D. Differential inflammatory cell count (DICC) as determined via the bryte HS flow cytometer from Bio-Rad. Annual meeting. 1997.
27. Wall SK, Wellnitz O, Bruckmaier RM, Schwarz D. Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2018;101(6):5362–73.
28. Pilla R, Malvisi M, Snel G, Schwarz D, König S, Czerny C-P, et al. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *J Dairy Sci*. 2013;96(3):1653–60.
29. Pillai SR, Kunze E, Sordillo LM, Jayarao BM. Application of Differential Inflammatory Cell Count as a Tool to Monitor Udder Health. *J Dairy Sci*. 2001;84(6):1413–20.
30. Damm M, Holm C, Blaabjerg M, Bro MN, Schwarz D. Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *J Dairy Sci*. 2017;100(6):4926–40.
31. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7:135–46.
32. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res*. 2003;34(5):597–627.
33. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci*. 2004;87(12):4150–62.
34. Dosogne H, Vangroenweghe F, Mehrzad J, Massart-Leën AM, Burvenich C. Differential Leukocyte Count Method for Bovine Low Somatic Cell Count Milk. *J Dairy Sci*. 2003;86(3):828–34.
35. Degen S, Knorr N, Paduch J-H, Zoche-Golob V, Hoedemaker M, Krömker V. Cell differentiation assisting in evaluating mastitis treatment prognosis. *Milk Sci Int Milchwissenschaft*. 2015;68(1):2–9.
36. Zecconi A, Vairani D, Cipolla M, Rizzi N, Zanini L. Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. *Ital J Anim Sci*. 2019;18(1):460–5.
37. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag; 2016.
38. Rohmeier L, Petzl W, Koy M, Eickhoff T, Hulsebusch A, Jander S, et al. In vivo model to study the impact of genetic variation on clinical outcome of mastitis in uniparous dairy cows. *BMC Vet Res*. 2020;16(1):33.
39. Kühn C, Reinhardt F, Schwerin M. Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. *Arch Anim Breed*. 2008;51(1):23–32.
40. Meyerholz M, Rohmeier L, Eickhoff T, Hulsebusch A, Jander S, Linden M, et al. Genetic selection for bovine chromosome 18 haplotypes associated with divergent somatic cell score affects postpartum reproductive and metabolic performance. *J Dairy Sci*. 2019;102(11):9983–94.
41. Mao X, Kadri N, Thomassen J, De Koning D, Sahana G, Gulbrandsen B. Fine mapping of a calving QTL on *Bos taurus* autosome 18 in Holstein cattle. *J Anim Breed Genet*. 2016;133(3):207–18.
42. Abo-Ismael MK, Brito LF, Miller SP, Sargolzaei M, Grossi DA, Moore SS, et al. Genome-wide association studies and genomic prediction of breeding values for calving performance and body conformation traits in Holstein cattle. *Genet Sel Evol*. 2017;49:1–29.
43. Müller M-P, Rothhammer S, Seichter D, Russ I, Hinrichs D, Tetens J, et al. Genome-wide mapping of 10 calving and fertility traits in Holstein dairy cattle with special regard to chromosome 18. *J Dairy Sci*. 2017;100(3):1987–2006.
44. Wu X, Gulbrandsen B, Nielsen US, Lund MS, Sahana G. Association analysis for young stock survival index with imputed whole-genome sequence variants in Nordic Holstein cattle. *J Dairy Sci*. 2017;100(8):6356–70.
45. Dachs N, Upadhyay M, Hannemann E, Hauser A, Krebs S, Seichter D, et al. Quantitative trait locus for calving traits on *Bos taurus* autosome 18 in Holstein cattle is embedded in a complex genomic region. *J Dairy Sci*. 2023;106(3):1925–41.
46. Heimes A, Brodhagen J, Weikard R, Hammon H, Meyerholz M, Petzl W, et al. Characterization of functional traits with focus on udder health in heifers with divergent paternally inherited haplotypes on BTA18. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):1–11.
47. Coulon J-B, Gasquib P, Barnouin J, Ollier A, Pradel P, Pomiès D. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Res*. 2002;51(05):383–93.
48. Martins L, Barcelos MM, Cue RI, Anderson KL, Dos Santos MV, Gonçalves JL. Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. *J Dairy Res*. 2020;87(3):298–305.
49. Cunha R, Molina L, Carvalho A, Facury Filho E, Ferreira P, Gentilini M. Subclinical mastitis and the relationship between somatic cell count with number of lactations, production and chemical composition of the milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008;60:19–24.
50. Wahyu Harjanti D, Sambodho P. Effects of mastitis on milk production and composition in dairy cows. *IOP Conference Series: Earth Environ Sci*. 2020;518(1):012032.
51. Malek dos Reis CB, Barreiro JR, Mestieri L, Porcionato MAF, dos Santos MV. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Vet Res*. 2013;9:1–7.
52. Linzell J, Peaker M. The permeability of mammary ducts. *J Physiol*. 1971;216(3):701–16.
53. Stelwagen K, Farr VC, McFadden HA, Prosser CG, Davis SR. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1997;273(1):R379–86.
54. Vickers L, Burfeind O, Von Keyserlingk M, Veira D, Weary D, Heuwieser W. Comparison of rectal and vaginal temperatures in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 2010;93(11):5246–51.
55. Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;144(3):270–89.
56. Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Günther J, Draing C, et al. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol*. 2008;45(5):1385–97.
57. Günther J, Liu S, Esch K, Schuberth H-J, Seyfert H-M. Stimulated expression of TNF- α and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;135(1):152–7.
58. 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;65:235–8.

59. Smith J, VanBaale M, Rodriguez R, Jamison C, Brouk M, Harner J III. Using heat stress audits to evaluate the level of heat stress on commercial dairies. *J Animal Sci.* 2006;84:399.
60. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022.
61. Mayer M. *missRanger: Fast Imputation of Missing Values.* 2021.
62. Mills JA. *Objective Bayesian precise hypothesis testing.* University of Cincinnati. 2018.
63. Makowski D, Ben-Shachar MS, Chen S, Lüdtke D. Bayesian indices of existence and significance. *Front Psychol.* 2019;10:1–14.
64. Lenth RV. *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.* 2022.
65. Makowski D, Ben-Shachar M, Lüdtke D. *bayestestR: Describing effects and their uncertainty, existence and significance within the bayesian framework.* *J Open Source Softw.* 2019;4(40):1541.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

IV. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich des Milchdifferentialzellbildes (DMCC), der Milchparameter Fett, Protein, Laktose und pH sowie der Vaginaltemperatur von Kühen zweier divergenter Haplotypen (Q vs. q) während einer intramammären experimentellen Infektion. Als Modellpathogene wurden *E. coli* für akute und *S. aureus* für chronische Mastitis verwendet. Den Analysen lag folgende Hypothese zu Grunde: im Vergleich zu konventionellen Parametern stellen das Milchdifferentialzellbild, die Milchinhaltsstoffe und die Vaginaltemperatur verbesserte frühzeitige Indikatoren für die genetisch determinierte frühe Antwort auf Mastitispathogene im akuten oder chronischen intramammären Infektionsmodell dar. Nach unserem Kenntnisstand handelt es sich bei dieser Studie um die erste *In-vivo*-Studie zum Vergleich des DMCCs und der Milchinhaltsstoffe sowie der Vaginaltemperatur zwischen Q- und q-Kühen nach einer experimentellen IMI.

Im Rahmen eines hochstandardisierten *In-vivo*-Infektionsmodells wurden naive erstlaktierende Kühe verwendet. Der hohe wissenschaftliche Standard der vorliegenden Studie ist unter anderem durch die detaillierte Datenerhebung gekennzeichnet: alle 12 Stunden wurden Milchproben von Viertelgesamtgemelken genommen, die vaginale Temperatur wurde in kurzen Intervallen von 3 Minuten mittels Datenloggern erfasst und die statistische Auswertung berücksichtigte viele Einflussfaktoren in einem Modell. Die Datenanalyse in der vorliegenden Arbeit erfolgte unter Verwendung Bayesischer Modelle. Diese Form der statistischen Datenauswertung ist besonders geeignet für komplexe Datensätze und wird als hochmoderne statistische Methode eingeordnet (STEPHAN et al., 2009). Bayesische Modelle beinhalten variable und fixe Effekte, sodass verschiedene Parameter gleichzeitig in die Auswertung miteinbezogen werden können. Darüber hinaus wurden mit dieser Analyse kuhindividuelle Effekte berücksichtigt.

Die 36 Kühe wurden von der Klinik für Rinder der TiHo Hannover zwischen Januar und September 2016 angekauft und dem Infektionsversuch zugeführt. Da der Zeitpunkt der experimentellen Infektion am Tag 36 +/- 3 Tage der Laktation erfolgte und die Tiere im genannten Zeitraum sukzessive abkalbten (MEYERHOLZ et al., 2018; MEYERHOLZ et al., 2019; ROHMEIER et al., 2020),

konnten jahreszeitliche Schwankungen nicht beeinflusst werden. Die in der Literatur beschriebenen jahreszeitlichen Unterschiede, z. B. zur Mastitis-Anfälligkeit (GHA VI HOSSEIN-ZADEH & ARDALAN, 2011), oder die negativen Auswirkungen durch Hitzestress auf IMI (HAMEL et al., 2021) beziehen sich nicht auf experimentell induzierte Mastitiden. Somit bleibt nur zu vermuten, dass in der vorliegenden Studie ein möglicher jahreszeitlicher Effekt vernachlässigt wurde. Dies sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Weitere Limitationen der vorliegenden Studie betreffen die Unterschiede bezüglich der Anzahl an Tieren, der Versuchsdauer sowie Anzahl infizierter Viertel und Lokalisation von Kontrollvierteln (mit NaCl) und unbehandelten Eutervierteln zwischen den Versuchs-Gruppen. In der *E.-coli*-Gruppe wurden n=12 Tiere über lediglich 24 Stunden beprobt, in der *S.-aureus*-Gruppe hingegen n=24 Tiere über 96 Stunden. Die gewählte unterschiedliche Anzahl an Tieren in den beiden Gruppen basierte auf Erkenntnissen früherer Untersuchungen: der Anstieg des SCC bei mit *E. coli* infizierten Kühen ist stärker und homogener als bei Kühen, die mit *S. aureus* infiziert wurden. Klinische Studien zeigten, dass eine IMI mit *E. coli* innerhalb von 24 h zu einer akuten klinischen Mastitis mit schwerwiegenden klinischen Symptomen führt, während eine IMI mit *S. aureus* zu einer weniger schwerwiegenden, heterogenen Ausprägung einer Mastitis mit chronischem Charakter führt (BANNERMAN et al., 2004; PETZL et al., 2008). Ziel des Studiendesigns war es, so wenige Tiere wie möglich zu verwenden und trotzdem robuste Datensätze zu erzeugen. Gemäß dem 3-R Prinzip (Reduction, Replacement, Refinement) wissenschaftlicher Tierversuche wurden somit die Versuchsdauer und die Anzahl an Tieren angepasst. Auch wurde eine unterschiedliche Anzahl an Vierteln inokuliert (*E. coli*: 1 Viertel vs. *S. aureus*: 2 Viertel). Der Versuchsaufbau wurde außerdem so gewählt, dass die Tiere in den beiden Pathogen-Gruppen auf unterschiedlichen Eutervierteln behandelt wurden (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, S. 10, Figure 6). Dadurch, dass alle Kühe mindestens ein unbehandeltes und ein Kontrollviertel über die gesamte Versuchsdauer hatten, konnte der Einfluss der Manipulation auf das Euter, unabhängig von der experimentellen Infektion, beurteilt werden. Die signifikanten Unterschiede zwischen den NaCl-Vierteln und unbehandelten Kontroll-Vierteln (bei *E. coli* ab 24 h: Kontroll-Viertel > NaCl-Viertel; bei *S. aureus* ab 24 bzw. 36 h: NaCl-Viertel > Kontroll-Viertel) könnten in der *S.-aureus*-Gruppe mit einer lokalen Reaktion des Immunsystems auf die

Manipulation erklärt werden. Auch zwischen den Zeitpunkten 0 h und 12 h sind numerische Unterschiede in der *S.-aureus*-Gruppe zwischen den NaCl-Vierteln und unbehandelten Kontroll-Vierteln zu erkennen. Die Ergebnisse des *E.-coli*-Versuches sprechen jedoch dagegen, dass es sich um einen Effekt durch die Gabe von NaCl handelt, da sich die Unterschiede in dieser Gruppe genau umgekehrt verhalten (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Additional file 1, siehe Anhang). Eine weitere Erklärung für die vorliegenden Unterschiede zwischen den NaCl-Vierteln und unbehandelten Kontroll-Vierteln stellt der sogenannte „Cross-Talk“ zwischen benachbarten Eutervierteln dar. Damit wird beschrieben, dass in einem Euterviertel, welches sich neben einem Viertel mit IMI befindet, ebenfalls die Zellzahl ansteigt. Solche Reaktionen konnten bereits in anderen Studien aufgezeigt werden (BANSAL et al., 2005; JENSEN et al., 2013; PETZL et al., 2018). Es stellt sich somit die Frage, ob die benachbarten Euterviertel bei einer experimentellen Infektion über einen längeren Zeitraum überhaupt als Kontrollgruppe im Sinne eines „Placebo-Effektes“ geeignet sind und ob die hier gezeigten Unterschiede zwischen den Pathogengruppen auf die unterschiedliche Lokalisation der Kontrollviertel mit NaCl und unbehandeltem Viertel zurückzuführen sind. Die vorliegenden Beobachtungen bestätigen die Relevanz der Lokalisation der Viertel und die Notwendigkeit der Verwendung von verschiedenen Kontrollen. Auch in zukünftigen Studien sollten diese Aspekte Berücksichtigung finden.

1. Haplotyp-spezifischer Effekt auf den DMCC

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation lag das Hauptaugenmerk der Datenanalyse auf der vergleichenden Auswertung des Milchdifferentialzellbildes (DMCC) und der Dynamik der Milchzellpopulationen zwischen den beiden divergenten Haplotypen. Unerwarteterweise wurden nur punktuelle Unterschiede im DMCC von Kühen mit dem vorteilhaften (Q) und dem unvorteilhaften Haplotypen (q) festgestellt. Zusammenfassend betrachtet waren nach *S.-aureus*-Exposition alle untersuchten Zellpopulationen zum Zeitpunkt 24 h oder 36 h nach Versuchsbeginn signifikant höher bei q-Kühen im Vergleich zu Q-Kühen. Dabei stellten die PMN diejenige Subpopulation dar, die am schnellsten anstieg und hochsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede zwischen den BTA18-Haplotypen aufwies ($q > Q$).

Im Gegensatz zu der *S.-aureus*-Gruppe konnten in der *E.-coli*-Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Haplotypen hinsichtlich des DMCC detektiert werden. An dieser Stelle muss berücksichtigt werden, dass wie bereits oben erwähnt, die Versuchsdauer der *E.-coli*-Gruppe lediglich 24 Stunden betrug. Es ist denkbar, dass die starke Immunreaktion auf die IMI mit *E. coli* vorhandene Unterschiede zwischen den Haplotypen im untersuchten Zeitraum überlagerte. Die Q-Kühe zeigten bereits zum Zeitpunkt 12 h nach der Infektion mit *E. coli* signifikant höhere DMCC-Subpopulationen im Vergleich zum unvorteilhaften Haplotypen q zum gleichen Zeitpunkt. Diese Ergebnisse untermauern die Studie von BRAND et al. (2011), welche in Bezug auf die beiden Haplotypen ebenfalls eine schnellere und stärkere Reaktion in den MEC des vorteilhaften Haplotypen (Q) hinsichtlich des SCC *in vitro* zeigten. Da zum Zeitpunkt 24 h bei beiden Haplotypen alle DMCC-Subpopulationen in der *E.-coli*-Gruppe signifikant höher waren, zeigt die zeitlich spätere Reaktion auf das Pathogen *S. aureus* das chronischere Ausmaß, welches dieser Erreger hervorrufen kann (BARKEMA et al., 2006).

Eine bessere initiale Immunabwehr des vorteilhaften Haplotypen Q nach experimenteller Infektion mit *E. coli* und *S. aureus* wurde bereits im *In-vitro*-Versuch von BRAND et al. (2011) anhand der unterschiedlichen Reaktionen der MEC aufgezeigt und konnte auch bei ROHMEIER et al. (2020) *in vivo* bestätigt werden. Dabei könnte die in der *S.-aureus*-Gruppe detektierte, signifikant höhere Bakterienausscheidung in der Milch von q-Kühen zum Zeitpunkt 12 h im Vergleich zu den Q-Kühen (ROHMEIER et al., 2020) eine zentrale Rolle spielen und einen Erklärungsansatz für den signifikant höheren SCC bei q-Kühen im Vergleich zu Q-Kühen zu den Zeitpunkten 24 h und 36 h darstellen. Eine höhere Keimausscheidung ist nachweislich mit einer stark positiven Korrelation zum SCC-Anstieg und vermutlich einer nachteiligen Aktivierungsdynamik des angeborenen Immunsystems assoziiert (LOPES JÚNIOR et al., 2012).

Bei der Betrachtung der Haplotypen-Unterschiede im *S. aureus*-Versuch fällt auf, dass die Divergenzen lediglich in der ersten Hälfte der Versuchsdauer aufgetreten sind: alle signifikanten Unterschiede der Zellpopulationen liegen bei den Zeitpunkten 24 h und 36 h nach Versuchsbeginn. Im weiteren Verlauf kam es wieder zu einer Annäherung der DMCC-Werte beider Haplotypen, und unter Verwendung der Bayesischen Modelle wurden keine weiteren signifikanten

Unterschiede detektiert (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 4, Figure 1). Über den weiteren Verlauf der klinischen und durchflusszytometrischen Parameter nach Ablauf der 96-stündigen Versuchsdauer, können im Kontext des vorliegenden Datensatzes keine Aussagen getroffen werden. Allerdings wurde eine mittelfristig reduzierte Mastitisempfindlichkeit durch Selektion auf BTA18-Haplotypen im parallel durchgeführten Langzeitversuch mit n=6 Tieren am FBN in Dummerstorf untersucht. Über den Zeitraum von zwei Laktationen wurden Daten zu Milchleistung und zum SCC erhoben und zwischen den Haplotypen verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten auch über einen längeren Versuchszeitraum hinweg insgesamt höhere SCC-Werte bei q-Kühen, weshalb eine insgesamt erhöhte Anfälligkeit für IMI bei dem unvorteilhaften Haplotypen q postuliert wurde (HEIMES et al., 2019).

In vorangegangenen Auswertungen unserer Arbeitsgruppe konnten weitere Unterschiede zwischen den Haplotypen herausgearbeitet werden: Kühe vom vorteilhaften Haplotypen Q zeigten signifikant geringere Inzidenzen zur Entwicklung von Metritis und hatten seltener Fieber im peripartalen Zeitraum. Weiterhin zeigten Kühe vom vorteilhaften Haplotypen Q *post partum* eine weniger stark ausgeprägte Entkopplung der somatotropen Achse im Vergleich zum unvorteilhaften Haplotypen q (MEYERHOLZ et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse des ChronMast Projektes sagen, dass der *In-vivo*-Vergleich von Kühen mit divergierenden paternalen BTA18-Haplotypen zeigte, dass Kühe vom vorteilhaften Haplotypen Q neben einer geringeren Inzidenz postpartaler reproduktiver und metabolischer Erkrankungen auch eine geringere somatische Zellzahl in der Milch aufwiesen. Genetische Unterschiede, verankert auf dem BTA18, äußern sich somit primär in einem besseren Stoffwechsel sowie sekundär in einer besseren Immunabwehr des Haplotypen Q und haben damit indirekt Auswirkung auf eine verringerte Krankheitsanfälligkeit.

2. Pathogen-spezifischer Effekt auf den DMCC

Wie erwartet konnte durch eine experimentelle Infektion mit *E. coli* invariant eine akute klinische Mastitis induziert werden, während Tiere, die mit *S. aureus* experimentell infiziert wurden eine vergleichsweise geringere Wirtsantwort zeigten (ROHMEIER). Hierdurch wurden Erkenntnisse früherer Infektionsstudien bestätigt (PETZL et al., 2016).

Die signifikant höheren Werte des DMCC nach Pathogenkontakt mit *E. coli* gegenüber *S. aureus* beim vorteilhaften Haplotypen Q (Zeitpunkt 12 h) und darüber hinaus unabhängig vom Haplotypen (Zeitpunkt 24 h) lassen somit folgende Schlussfolgerung zu: der schnelleren und höheren Pathogenvermehrung nach experimenteller Infektion mit *E. coli* folgte eine frühere und stärkere Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und Chemokine gegenüber einer Exposition mit *S. aureus*. Dies spiegelt sich *in vivo* als stärkere klinische Reaktion des Wirts wider, um die eingedrungenen und sich vermehrenden Pathogene zu eliminieren (RIOLLET et al., 2000).

Da die Versuchstiere jedoch mit einer verhältnismäßig hohen Infektionsdosis inokuliert wurden, ist die Verschiebung der Milchzellpopulation in Richtung PMN möglicherweise bei diesem kontrollierten Infektionsversuch noch offensichtlicher als bei IMI unter Feldbedingungen mit natürlicher Keimbelastung und chronischem Charakter der Infektion.

Zusammengefasst stimmen die Hauptergebnisse der Pathogen-spezifischen Wirtsantwort mit der vorhandenen Literatur überein und unterstreichen die Validität dieses experimentellen Infektionsmodells. Bisher gibt es keine weiteren *In-vivo*-Studien mit einer experimentellen intramammären Infektion bei Kühen der beiden divergenten BTA18-Haplotypen.

3. PMN und SCC als Mastitis-Indikatoren

Die PMN gelten als Immunzellen der ersten Verteidigungslinie und migrieren im Falle einer IMI in hoher Zahl in das Lumen der Milchdrüse (PAAPE et al., 2002; PETZL et al., 2008). Bereits vor über 20 Jahren wurde vorgeschlagen, den PMN-Anteil an den Milchzellen als Indikator für Euterentzündungen zu verwenden (HAMANN & KRÖMKER, 1997). In einer Feldstudie von PILLA et al. (2012) wurden Vorgemelke auf Viertelebene zytobakteriologisch untersucht und parallel der DMCC mikroskopisch bestimmt. Die Autoren konnten aufzeigen, dass der durchschnittliche prozentuale PMN-Gehalt in nicht-infizierten Vierteln signifikant niedriger war als in Vierteln mit einer unspezifischen, latenten oder akuten Mastitis.

Auch MEHNE et al. (2010) konnten zeigen, dass sich der Anteil an PMN nach experimenteller Infektion mit *E. coli* oder *S. aureus* von durchschnittlich 40 % in der Milch gesunder Viertel auf > 90 % nach Einsetzen einer Mastitis erhöhte. Des Weiteren konstatierten die Autoren eine stark positive Korrelation zwischen den PMN und dem SCC. Auch in einer großen Feldstudie von DAMM et al. (2017) wurden unter Verwendung routinemäßig gesammelter Milchproben signifikant steigende Anteile an PMN (13 – 92 %) und abnehmende Anteile an Makrophagen (7 – 79 %) aufgezeigt, sobald der SCC zunahm. Die Lymphozyten blieben jedoch konstant niedriger (0 – 19 %). LEITNER et al. (2000a) und RIOLLET et al. (2000) zeigten ebenfalls einen Anstieg der PMN auf über 86 % bzw. 90 % bei akuten Mastitiden. Insgesamt lässt sich aus der Studienlage schlussfolgern, dass sowohl der SCC aber auch der Anteil an PMN in der Milch sehr frühe, geeignete Mastitis-Indikatoren sind.

Da auch die hier analysierten Daten einen schnellen und hochsignifikanten Anstieg der PMN, sogar schon in den ersten 12 h nach experimenteller Infektion für den vorteilhaften Haplotypen Q, jedoch nur einen geringen Anstieg der Lymphozyten aufzeigen, kann diese Aussage gestützt werden (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 4, Figure 1).

RIVAS et al. (2001) haben in ihrer Studie auch die Veränderungen im SCC untersucht und mit dem DMCC verglichen: sie postulierten, dass die Sensitivität von SCC und DMCC (92 % und 100 %) gleich hoch war, jedoch die Spezifität des SCC (45 %) deutlich unter der des DMCC (83 %) lag. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten ebenfalls zum Zeitpunkt 12 h und 24 h einen

höchstsignifikanten Anstieg des SCC beim vorteilhaften Haplotypen Q, sowie einen hochsignifikanten Anstieg bei dem unvorteilhaften Haplotypen q während der experimentellen Infektion mit *E. coli* im Vergleich zur Infektion mit *S. aureus*. Darüber hinaus zeigte sich bei Infektion mit *S. aureus*, dass im weiteren Versuchsverlauf die Subpopulationen bis zum Ende des Versuches auf dem erreichten Niveau konstant nachweisbar blieben (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 4, Figure 1). Durch die vorliegende Datenanalyse wurde somit erneut aufgezeigt, dass die PMN die vorrangige DMCC-Subpopulation darstellen, welche (ähnlich dem Parameter SCC) hochsignifikante Unterschiede nach einer experimentellen intramammären Infektion zeigt. Dem Großteil der präsentierten Studien ist jedoch gemein, dass es gleichzeitig zum Anstieg der PMN ebenso zu einem starken Anstieg des SCC kommt. Dies lässt somit den Schluss zu, dass nach bisherigem Kenntnisstand die Ermittlung der PMN gegenüber dem SCC wenige praktische Vorteile hat. Unter Anwender-bezogenen Gesichtspunkten sind allerdings einfache, semiquantitative Möglichkeiten zur Mastitis-Früherkennung möglicherweise nach wie vor die praktikabelste Alternative: KANDEEL et al. (2018) verglichen beispielsweise verschiedene kuhbasierte Methoden (CMT, SCC und DMCC) zur Mastitisdetektion zu Beginn der Trockenstehperiode und in der frühen Laktation: Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der CMT nach wie vor die beste und praktikabelste Möglichkeit für den Praktiker auf dem Betrieb ist, um eine Mastitis frühestmöglich zu erkennen. Zudem sei er schnell, preiswert, sensitiv, spezifisch und bei einer physiologischen Milchtemperatur (ca. 37 °C) direkt durchführbar. Somit sei keine Probenbearbeitung wie z.B. Kühlung der Milchprobe (auf ca. 4 °C) notwendig, was einen Vorteil dieses Verfahrens darstelle.

Der erwartete Mehrwert der DMCC-Analyse konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Unseren Ergebnissen zufolge kann die Frühphase einer Mastitis unter kontrollierten Bedingungen nicht früher durch das Milchdifferentialbild (DMCC) detektiert werden als mittels SCC, wenn ein 12-stündiges Probenintervall verwendet wird. Der DMCC bietet somit keinen Vorteil gegenüber anderen häufig verwendeten Tests wie SCC und CMT.

4. Pathogen- und Haplotyp-spezifischer Effekt auf die Körpertemperatur

Die Erhöhung der Körpertemperatur ist eine wichtige Wirts-Reaktion zur Pathogen-Bekämpfung. Wesentlich beteiligt an dieser Immunreaktion ist die Pathogen-spezifische Zytokin-Freisetzung durch Milchdrüsenepithelzellen im Euter (YANG et al., 2008; GÜNTHER et al., 2010; SCHUKKEN et al., 2011). Die im vorliegenden Versuch verwendete Methodik zur Erfassung der Körpertemperatur mittels Vaginalloggern kann entsprechend der aktuellen Literatur als valide, robuste und exakte Methode beurteilt werden (BURFEIND et al., 2010; VICKERS et al., 2010; FISCHER-TENHAGEN & ARLT, 2020). Das angewandte Messintervall von drei Minuten bei allen 36 Kühen über 24 h (*E. coli*) bzw. 96 h (*S. aureus*) führte zu einem umfangreichen Datensatz und ermöglichte die Darstellung eines genauen Verlaufs der inneren Körpertemperatur über die gesamte Versuchsdauer hinweg (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 5, Figure 3). Lediglich in Einzelfällen kam es zum kurzfristigen Verlust der Vaginallogger und somit zu lückenhaften Temperaturlaufzeichnungen (< 1 %), was im Rahmen der statistischen Auswertungen aufgrund der großen Datenmenge (insgesamt > 50.500 Datenpunkte) keinen weiteren Einfluss hatte.

Die getrennte Auswertung der beiden Pathogengruppen zur Analyse des Haplotyp-Einflusses zeigte unterschiedliche Ergebnisse: In der mit *E. coli* infizierten Gruppe wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Haplotypen detektiert. Alle Kühe zeigten eine vergleichbare Reaktion mit einem konstanten Anstieg der Vaginaltemperatur zu Beginn der Entzündung, einem Fieberpeak zwischen 12 und 18 h nach Versuchsbeginn, gefolgt von einem Temperaturabfall (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 6, Figure 4). Dies lässt sich, wie bereits diskutiert, möglicherweise durch eine Überlagerung der Haplotypen-Effekte durch die vergleichsweise starke Reaktion gegenüber einer experimentellen Mastitis mit *E. coli* erklären. Auch die auf 24 h beschränkte Versuchsdauer könnte hier mögliche Haplotypen-Effekte unentdeckt lassen.

Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse der *S.-aureus*-Gruppe: Die anfänglich signifikant höhere Vaginaltemperatur der mit *S. aureus* infizierten q-Kühe zum Zeitpunkt 0 h und in den Intervallen 12 bis 24 h kehrte sich in den Intervallen 48 bis 60 h in eine niedrigere Vaginaltemperatur von q- im Vergleich zu Q-Kühen um

(MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 7, Figure 5). Initial reagierten die Kühe des unvorteilhaften Haplotypen q also stärker auf die Inokulation mit *S. aureus* als die des vorteilhaften Haplotypen Q, gefolgt von einem inversen Verlauf ab dem Intervall 48 bis 60 h. Die q-Kühe zeigten eine initial höhere Pathogenauscheidung nach der *S.-aureus*-Infektion (ROHMEIER et al., 2020), was ebenfalls den Anstieg der Körpertemperatur erklären könnte. Möglicherweise reagierten die q-Kühe initial mit einer ausgeprägteren Immunreaktion als die Q-Kühe, was zu einer stärkeren Gegenregulation des Körpers führte und somit zu einem schnelleren Absenken der Körpertemperatur.

Wie bereits veröffentlicht, konnte aufgezeigt werden, dass die Metritis-Inzidenz nach der Kalbung bei Q-Kühen im Vergleich zu q-Kühen ebenfalls geringer war und dass Q-Kühe seltener Fieber entwickelten als q-Kühe (HEIMES et al., 2019; MEYERHOLZ et al., 2019). Die hier dargestellte initiale Reaktion ist somit kongruent zu diesen Ergebnissen und könnte auch darauf hindeuten, dass Q-Kühe im Vergleich zu q-Kühen weniger anfällig gegenüber IMI und eingedrungenen Erregern sind.

Die hohe Anzahl an Datenpunkten zur Körpertemperatur-Dynamik ermöglichte uns verschiedene Ansätze der Datenanalyse zu prüfen: Zunächst wurden bei der Auswertung in einer 3-Stunden-Intervall-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Haplotypen (Q vs. q) gefunden. Erst durch die Bündelung der Daten unter Verwendung eines 12-Stunden-Intervalls ließen sich signifikante Unterschiede zwischen Q und q herausarbeiten. Die Rechnung des Bayesischen Modells mit deutlich mehr Daten in einem Mittel über 12 Stunden im Vergleich zu 3 Stunden zeigt somit auf, dass Unterschiede bestehen, jedoch eine größere Datenmenge benötigt wird, um diese aufzuzeigen, auch wenn in beiden Analysewegen jeweils die Wiederholungen innerhalb der Individuen berücksichtigt wurden.

Wie erwartet konnten wir mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten *In-vivo*-Infektionsmodell auch eindrucksvoll zeigen, dass die vaginal gemessene Körpertemperatur bei den mit *E. coli* infizierten Kühen im Vergleich zu mit *S. aureus* infizierten Kühen 12 bis 18 h nach Inokulation signifikant höher war (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 6, Figure 4). Bereits vor einigen Jahren haben PETZL et al. (2008) gezeigt, dass eine experimentelle intramammäre Infektion mit *S. aureus* im Gegensatz zu *E. coli* innerhalb der ersten 12 Stunden

nach der Inokulation weder zu einem Anstieg der Körpertemperatur noch zu Veränderungen der Blutleukozytenzahl führte (rektale Messung der Körpertemperatur alle 12 Stunden). Dahingegen entwickelten alle mit *E. coli* infizierten Kühe in den ersten 12 Stunden des Versuches Fieber und die maximale Körpertemperatur (40,4 °C) wurde zwischen 12 und 18 Stunden nach Beginn des Infektionsversuches erreicht. Diese Beobachtung ließ sich im Rahmen dieser Studie reproduzieren.

Bezüglich der Auswertung der VT war es überraschend, dass die hier verwendeten beiden Ansätze (3-Stunden vs. 12-Stunden Intervall) zu unterschiedlichen Ergebnissen führten: mit dem Bayesischen Modell, das die Vaginaltemperatur in 3-Stunden-Intervallen berücksichtigte, wurden zwischen 12 - 15 und 15 - 18 Stunden nach Beginn der experimentellen Infektion hochsignifikante Unterschiede zwischen beiden verwendeten Pathogenen festgestellt. Die VT war bei Kühen, die mit *E. coli* infiziert waren, hochsignifikant höher als bei Kühen in der *S.-aureus*-Gruppe (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 6, Figure 4).

Bei der Betrachtung des Verlaufes der VT fiel folgendes auf: Während mit *E. coli* infizierte Kühe innerhalb der 24 Stunden des Versuches lediglich eine einzelne Fieberzacke entwickelten, zeigten die mit *S. aureus* infizierten Kühe während der 96 Stunden-Exposition einen schwankenden Temperaturverlauf. Dabei war initial eine Aufhebung der zirkadianen Rhythmik während der ersten 36 Stunden nach Versuchsbeginn zu beobachten, die danach jedoch wieder zum physiologischen Tagesverlauf der Körpertemperatur zurückkehrte (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 5, Figure 3). Der schnellere und höhere Anstieg der VT bei *E. coli* infizierten Kühe kann durch die stärkere Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (TNF α ; IL1 β) erklärt werden (GÜNTHER et al., 2011; SCHUKKEN et al., 2011; GÜNTHER et al., 2017). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass wie erwartet, die Auswertungen im Bayesischen Modell eine signifikant höhere Körpertemperatur in der *E.-coli*-Gruppe als in der *S.-aureus*-Gruppe ergaben. Bei einer experimentellen *S.-aureus*-Mastitis konnten jedoch zum ersten Mal signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Haplotypen bei der Analyse mittels Bayesischer Modelle aufgezeigt werden, wobei initial Kühe vom unvorteilhaften Haplotyp q eine signifikant höhere Körpertemperatur als Kühe vom vorteilhaften Haplotyp Q aufwiesen, was sich 48 Stunden nach Versuchsbeginn signifikant umkehrte.

5. Pathogen- und Haplotyp-spezifischer Effekt auf die Milchinhaltsstoffe

Die Analyse der Milchinhaltsstoffe und des pH-Wertes wird routinemäßig z.B. im Rahmen der Milchleistungsprüfung durchgeführt. Dabei werden die Parameter Fett, Protein, Laktose und pH neben einigen weiteren Parametern wie beispielsweise der Keimzahl und der somatischen Zellzahl (SCC) untersucht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Milchinhaltsstoffe zeigte punktuelle Haplotyp- und Pathogen-spezifische Unterschiede auf. In der mit *E. coli* infizierten Gruppe wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Haplotypen detektiert. Haplotypen-abhängige Unterschiede bei den Milchinhaltsstoffen beziehen sich im Folgenden daher nur auf die *S.-aureus*-Gruppe. Bisher liegen keine anderen Studienergebnisse vor, welche Unterschiede zwischen den divergierenden BTA18-Haplotypen im Hinblick auf die Milchinhaltsstoffe untersuchten.

Hinsichtlich des Fettanteils in der Milch konnten zum Zeitpunkt 84 h nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* signifikant höhere Werte in Q-Kühen als in q-Kühen gemessen werden (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 5, Figure 2). Da die Milchzusammensetzung stark mit dem Metabolismus verknüpft ist, wird angenommen, dass der Energiehaushalt der Kuh einen großen Einfluss auf den Milchfettanteil hat. Aufgrund eines geringeren *de novo* synthetisierten Gehaltes an Fettsäuren müssen Kühe mit einer hohen Milchleistung in der frühen Laktation schneller Fettreserven mobilisieren können, um das vorliegende Energiedefizit auszugleichen (BASTIN et al., 2011). Schon länger ist bekannt, dass signifikante Veränderungen in Höhe und Zusammensetzung des Milchfetts durch die betriebsindividuelle Fütterung erreicht werden können (GRUMMER, 1991). Im vorliegenden Fall wurden zwar alle Versuchstiere entsprechend gleich gefüttert, allerdings ist nicht auszuschließen, dass neben bereits beschriebenen metabolischen Unterschieden der beiden Haplotypen (MEYERHOLZ et al., 2019) auch die individuelle Futteraufnahme während des Versuches ein Erklärungsansatz für den unterschiedlichen Milchfettgehalt sein könnte. Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Milchfettgehalt durch genetische Selektion beeinflusst werden kann (STOOP et al., 2008; BASTIN et al., 2013).

Im Hinblick auf die divergenten BTA18-Haplotypen dieser Studie wurden bei vorangegangenen Arbeiten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Schlüsselgene, welche am Stoffwechsel von (kurzkettigen) Fettsäuren beteiligt sind, gefunden (HEIMES et al., 2020).

Es konnte allerdings ein signifikant niedrigerer Fettanteil in der Milch von mit *E. coli* infizierten Vierteln im Vergleich zu mit *S. aureus* infizierten Vierteln zum Zeitpunkt 0 h und 24 h nach Versuchsbeginn aufgezeigt werden (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 4). Auch KAYANO et al. (2018) fanden einen signifikanten Anstieg der prozentualen Anteile von Fett und Protein bei mit *S. aureus* infizierten Tieren. Der signifikante Unterschied beider Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 0 h kann jedoch nicht als Pathogen-spezifisch bewertet werden, da die Pathogen-Inokulation erst unmittelbar nach der Entnahme der Milchproben stattfand. Allerdings ist ein negativer Zusammenhang zwischen der Replikation von *S. aureus* und *E. coli* mit dem Milchfettgehalt bekannt (EISENBERG et al., 2016) was den Unterschied 24 h nach Versuchsbeginn erklären könnte.

Auch auf den Milchproteingehalt hat die Fütterung einen großen Einfluss, da die Aminosäuren hauptsächlich im Pansen gebildet werden und über die Blutbahn ins Euter gelangen (BRADE & FLACHOWSKY, 2005). In der Datenanalyse, welche alle Parameter in einem Bayesischen Modell beinhaltete (beide Haplotypen und beide Pathogene), lag der Proteinanteil in der Milch von Q- im Vergleich zu q-Kühen bereits zum Zeitpunkt 0 h signifikant höher. In der *S.-aureus*-Gruppe hatten Q-Kühe im Vergleich zu q-Kühen zum Zeitpunkt 60 h einen signifikant höheren Proteinanteil (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 5, Figure 2). Obwohl diese punktuellen Unterschiede Nebenergebnisse sein könnten, ist es bemerkenswert, dass in beiden Versuchsgruppen numerisch betrachtet zu allen anderen Zeitpunkten der Proteinprozentsatz bei Q- im Vergleich zu q-Kühen zahlenmäßig höher war und daher vermutlich genetisch bedingt ist. Eine Erhöhung des Proteingehaltes wird in der Literatur darüber hinaus in Zusammenhang mit einer Schädigung der Blut-Milch-Schranke bei akuten klinischen Mastitiden beschrieben, da es zum Einstrom von Serumalbumin aus dem Blut ins Euter kommt (BANNERMAN et al., 2004).

Zum Zeitpunkt 24 h nach Versuchsbeginn war der Laktose-Gehalt in der Milch der mit *E. coli* infizierten Viertel im Vergleich zu den mit *S. aureus* infizierten Vierteln signifikant niedriger (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, S. 4). Eine verminderte Produktion und Ausschüttung von Laktose ist ein bereits bekanntes Phänomen und kann durch mehrere Aspekte erklärt werden: in anderen Studien wurde aufgezeigt, dass eine subklinische Mastitis zu einer höheren Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in der Milch führt und der pH-Wert ebenfalls deutlich höher war als in der Milch gesunder Kühe (BATAVANI et al., 2007). Darüber hinaus verändern IMI die Durchlässigkeit der Blut-Milch-Schranke, was zu einem gleichzeitigen Ausstrom von Laktose und Kalium in den Blutkreislauf und zeitgleich zu einem Anstieg von Natrium, Chlorid und Proteinen aus dem Blutkreislauf in die Milch führt (MARTINS et al., 2020). Was den Vergleich zwischen den beiden Krankheitserregern angeht, stehen die Ergebnisse dieser Studie somit im Einklang mit der aktuellen Literatur: in der *E.-coli*-Gruppe ist die Entzündung stärker ausgefallen, durch die vergleichsweise starke Vermehrung von *E. coli* kam es vermutlich zu einer stärkeren Metabolisierung der vorhandenen Laktose, was wiederum zu einem niedrigeren Laktoseanteil führte. Diese Ergebnisse stimmen auch mit einer Studie von COULON et al. (2002) überein. Die Autoren zeigten, dass klinische Anzeichen einer Mastitis bei Kühen mit IMI, verursacht durch *S. aureus*, *Strep. uberis* und *E. coli*, mit niedrigeren Laktosekonzentrationen einhergingen, wobei der Rückgang bei den mit *E. coli* infizierten Tieren am stärksten war. Auch die Lockerung der ‚tight junctions‘ bei einer IMI und der dadurch folgende Verlust an Laktose als Ursache für die detektierten Unterschiede kann in diesem Zusammenhang diskutiert werden (STELWAGEN et al., 1997). Zwischen den Haplotypen Q und q lagen jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des prozentualen Laktose-Gehaltes vor.

Zum Zeitpunkt 72 h nach Versuchsbeginn gab es einen Trend, dass der pH-Wert in der Milch von q-Kühen höher war als in der Milch von Q-Kühen. Zwischen den Pathogengruppen zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede im pH-Wert. Bei genauerem Betrachten fällt jedoch ein numerischer Abfall des pH-Wertes in der *E.-coli*-Gruppe zum Zeitpunkt 24 h nach Versuchsbeginn auf (MÜLLER-LANGHANS et al., 2024, Seite 4 und Figure 2).

Bei der Fermentation der Laktose durch *E. coli* kommt es zur Zunahme saurer Stoffwechselprodukte wie Ameisensäure, Milchsäure und Essigsäure, die das Absinken des Milch-pH-Wertes bedingen (MEHNE, 2010). In einem Mastitis-Infektionsversuch mit *E. coli* kam es 12 Stunden nach der Inokulation zu einem Absinken des pH-Wertes, einer Reduktion im Fett-, Laktose- und auch im Harnstoffgehalt, was der Autor v. a. auf die verminderte Syntheseleistung der MEC zurückführte (MEHNE, 2010).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Milchinhaltsstoffe zeigte punktuelle Haplotyp- und Pathogen-spezifische Unterschiede auf. Die beobachteten signifikanten Veränderungen im DMCC und SCC traten allerdings früher auf als bei den Milchinhaltsstoffen, was deren Eignung zur Mastitis-Früherkennung schmälert.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mastitiden verursachen in der Milchwirtschaft hohe finanzielle Verluste und beeinträchtigen das Wohlbefinden der betroffenen Tiere. Mithilfe moderner molekular-genetischer Verfahren können Kühe mit geringerer Mastitisanfälligkeit selektiert werden, und Diagnostikverfahren wie die Durchflusszytometrie können die Früherkennung von Mastitiden verbessern. Das Milchdifferentialzellbild gilt hierbei als ein vielversprechender Kandidat, entzündliche Veränderungen im Euter möglichst frühzeitig zu erkennen.

Im Rahmen dieser Studie wurden Milchproben aus einem hochstandardisierten *In-vivo*-Infektionsmodell mit 36 Kühen untersucht, welche auf divergente paternale BTA18-Haplotypen (Q vs. q) selektiert worden waren. Diese primiparen Kühe wurden entweder auf einem Euterviertel mit *E. coli* oder auf zwei Eutervierteln mit *S. aureus* inokuliert und anschließend wurden alle 12 Stunden Viertelgesamtgemelksproben genommen. Die Versuchsdauer betrug 24 Stunden für die *E.-coli*-Gruppe und 96 Stunden für die *S.-aureus*-Gruppe. Neben dem Gehalt somatischer Zellen in der Milch (SCC) wurde das Milchdifferentialzellbild (DMCC; vitale und nicht-vitale Zellen, PMN, lymphoide Zellen und große Zellen) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Milchparameter (Fett %, Protein %, Laktose %, pH) wurden mittels MilkoScanTM FT+ analysiert. Während des gesamten Experimentes wurde außerdem alle drei Minuten die Vaginaltemperatur (VT) mittels Vaginalloggern aufgezeichnet. Ziel der Studie war es, das Milchdifferentialzellbild, die Milchinhaltsstoffe und die Vaginaltemperatur zwischen Kühen mit vorteilhaftem (Q) und unvorteilhaftem (q) Haplotypen unter Anwendung von Bayesischen Modellen zu vergleichen, um das Potential dieser Parameter als frühe Indikatoren für eine unterschiedliche Mastitisanfälligkeit zu evaluieren.

In der Milch aus infizierten Vierteln wurden im Vergleich zu nicht infizierten Vierteln, signifikant höhere Werte für alle Zellpopulationen ab dem Zeitpunkt 12 h nach experimenteller Infektion mit *E. coli* ($p < 0,01$; Ausnahme lymphoide Zellen erst zum Zeitpunkt 24 h) und ab dem Zeitpunkt 24 h nach experimenteller Infektion mit *S. aureus* beobachtet ($p < 0,001$).

Bezüglich der Haplotypen zeigte der DMCC in der Milch von q im Vergleich zu Q höhere PMN-Werte (24 h, $p < 0,001$), einen höheren SCC (24 h, $p < 0,01$; 36 h, $p < 0,05$), eine höhere Anzahl großer Zellen (24 h, $p < 0,05$) sowie vitaler (24 h, $p < 0,01$) und nicht-vitaler Zellen (36 h, $p < 0,001$) nach experimenteller *S.-aureus*-Infektion. Die Analyse der Milchinhaltstoffe ergab, dass der Proteinanteil in der Milch von Q bereits vor Beginn des Infektionsversuches signifikant höher war als in der Milch von q (0 h, $p = 0,025$). In der *S.-aureus*-Gruppe hatten Q-Kühe einen höheren Proteinanteil (60 h, $p = 0,048$) und Fettanteil (84 h, $p = 0,022$) als q-Kühe. Die initial beobachtete höhere VT von *S. aureus* infizierten q-Kühen (0 h und 12-24 h, $p = 0,013$ und $p = 0,029$) kehrte sich in eine niedrigere VT von q als Q (48–60 h $p = 0,011$) um.

Es wurden hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Pathogengruppen (*E. coli* vs. *S. aureus*) in Bezug auf DMCC, Milchinhaltstoffe und VT festgestellt: zum Zeitpunkt 12 h waren die mit *E. coli* infizierten Viertel von Q-Kühen in allen DMCC-Subpopulationen signifikant höher als die mit *S. aureus* infizierten Viertel ($p < 0,05$; exkl. q-Kühen nur PMN $p < 0,05$ zum Zeitpunkt 12 h). Zum Zeitpunkt 24 h waren alle Zellpopulationen in den mit *E. coli* infizierten Vierteln signifikant höher ($p < 0,05$; exkl. PMN bei q-Kühen: $p = 0,061$) als in den mit *S. aureus* infizierten Vierteln, unabhängig vom Haplotypen der Kuh. Der Laktoseanteil war in der Milch aus *E. coli* infizierten Vierteln im Vergleich zu *S. aureus* infizierten Vierteln signifikant niedriger (24 h, $p < 0,001$), ebenso der Fettanteil (0 h, $p < 0,01$ und 24 h, $p < 0,5$). Zwischen 12 und 18 Stunden nach Versuchsbeginn war die VT bei Kühen, die mit *E. coli* infiziert wurden, signifikant höher als bei Kühen, die mit *S. aureus* infiziert wurden (3-Stunden-Intervalle, $p < 0,001$). Diese Ergebnisse belegen die Validität des hochstandardisierten Pathogen-spezifischen *In-vivo*-Infektionsmodells, das bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurde und die Grundlage für die vorliegende Arbeit bildet.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass es mit einem hochstandardisierten intramammären Infektionsmodell in Kombination mit modernen und robusten statistischen Analysen möglich war, Unterschiede zwischen primiparen Kühen mit unterschiedlichen väterlichen Haplotypen bezüglich Mastitisempfindlichkeit aufzuzeigen. Im Rahmen des *In-vivo*-Infektionsmodells konnten punktuelle Unterschiede zwischen Q- und q-Kühen in Bezug auf DMCC, Milchparameter und Vaginaltemperatur nach

S. aureus-Inokulation aufgedeckt werden. Überraschenderweise wurden keine Unterschiede zwischen den Haplotypen für mit *E. coli* infizierte Kühe festgestellt. Solche Unterschiede zwischen den Haplotypen könnten im akuten Mastitis-Modell von der hochgradigen Immunreaktion gegenüber *E. coli* überlagert worden sein oder konnten aufgrund des Versuchsaufbaus mit einer sehr begrenzten Versuchsdauer nicht aufgezeigt werden.

Der hypothetisierte Nutzen von DMCC für die exaktere Identifizierung früher Unterschiede in der Wirtsreaktion gegenüber Mastitiserregern konnte im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die erzielten Ergebnisse zeigen jedoch auf, dass die frühe Immunantwort divergenter Haplotypen für Mastitisresistenz sich im Tiermodell auch z.B. anhand der Milchzellendifferenzierung untersuchen lassen. Diese Erkenntnisse sind von wissenschaftlicher Relevanz für das Fachgebiet, da sie weitere Informationen über den Zusammenhang zwischen Genetik und Immunfunktionen im Hinblick auf Mastitisanfälligkeit liefern.

VI. SUMMARY

In the dairy industry, mastitis causes high financial losses and impairs animal wellbeing. Modern genetic procedures can be used to select cows with reduced mastitis susceptibility and modern diagnostic tools like flow cytometry may improve early mastitis diagnostics. With regard to mastitis detection, it is of high interest to detect changes in the milk as early as possible, to allow for early and effective treatment strategies.

In this study, full quarter milk samples from a highly standardized *in vivo* infection model with 36 cows selected for two divergent *bos taurus autosome* 18 (BTA18) haplotypes (Q vs. q, n= 18 in each group) were analyzed. These primiparous cows had been inoculated with either *E. coli* in one udder quarter or *S. aureus* in two udder quarters and full quarter milk samples of every quarter were collected every 12 hours. The duration of the experiment was 24 hours for the *E. coli* group and 96 hours for the *S. aureus* group. The differential milk cell count (DMCC; SCC, vital and non-vital cells, PMN, lymphoid cells and large cells) was analyzed using flow cytometry and the milk components (fat%, protein%, lactose%, pH) were analyzed via MilkoScan™ FT+. Vaginal temperature (VT) was recorded every three minutes throughout the challenge trial using vaginal logger. The objective of the study was to compare DMCC, milk components and VT between the favorable (Q) and unfavorable (q) haplotype cows using Bayesian models to evaluate their potential as improved early indicators of differential susceptibility of mastitis.

In the milk from infected quarters, compared to non-infected quarters, significantly higher values were found for all cell populations beginning at timepoint 12 h during the *E. coli* challenge ($p < 0.01$; with the exception of lymphoid cells only at the timepoint 24h) and from the timepoint 24 h during the *S. aureus* challenge ($p < 0.001$).

Concerning the two haplotypes, DMCC showed higher numbers of PMN in milk of q compared to Q (24 h, $p < 0.001$), greater SCC (24 h, $p < 0.01$; 36 h, $p < 0.05$), greater numbers of large cells (24 h, $p < 0.05$), vital (24 h, $p < 0.01$) and non-vital cells (36 h, $p < 0.001$) after *S. aureus*-challenge. Milk component analysis revealed that protein % was already significantly greater in milk from Q compared to q before the challenge (0 h, $p = 0.025$). In the *S. aureus* group, Q cows had greater

protein % (60 h, $p = 0.048$) and fat % (84 h, $p = 0.022$) than q. Initially higher VT of *S. aureus* challenged q cows (0 and 12-24 h, $p = 0,013$ and $p = 0.029$) reversed into lower VT of q than Q (48-60 h, $p = 0.011$).

Highly significant differences were detected between the two pathogen groups concerning DMCC, milk components and VT: at timepoint 12 h milk from *E. coli* challenged quarters from Q-cows showed significantly greater values for all DMCC-subpopulations than milk from *S. aureus* challenged quarters ($p < 0.05$), but in q-cows this can only be reported for PMN ($p < 0.05$). At timepoint 24 h, all cell populations were significantly greater in milk from *E. coli* challenged quarters ($p < 0.05$; except PMNs between haplotypes q: $p = 0.061$) than in milk from *S. aureus* challenged quarters, independent of the cow haplotype. Lactose % was significantly lower in milk of *E. coli* challenged quarters compared to *S. aureus* challenged quarters (24 h, $p < 0.001$), as well as fat % (0 h, $p < 0.01$ and 24 h, $p < 0.5$). Between 12 and 18 h after start of the challenge, VT was significantly higher in cows challenged with *E. coli* compared to cows challenged with *S. aureus* (3 h interval approach, $p < 0.001$). These findings emphasize the validity of the highly-defined *in vivo* infection model, that has been described in earlier studies before and builds the basis for the present study.

Taken together, this study showed, that with a highly standardized intramammary challenge experiment combined with modern and robust statistical analyses it was possible to display differences between primiparous cows inheriting divergent paternal haplotypes. The *in vivo* infection model revealed punctual differences between Q and q cows in DMCC, milk components and vaginal temperature after *S. aureus* inoculation. Surprisingly, no differences were detected between the haplotypes for *E. coli* challenged cows. Such differences might have been superimposed in the acute mastitis model or could not be shown due to the experimental setup with a limited period of observation for *E. coli* challenged cows. Yet, the expected merit of DMCC for refined identification of early response differences to mastitis pathogens could not be confirmed. The results implicate, that haplotype selection for mastitis susceptibility works, but is far more complex than expected. These findings are relevant to the field, as they provide more information about the connection between genetics and immune functions, leading to mastitis susceptibility.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adkins PR, Middleton JR. Methods for diagnosing mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2018; 34: 479-91.

Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2011; 16: 291-304.

Alhussien M, Kaur M, Manjari P, Kimothi SP, Mohanty AK, Dang AK. A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. *Veterinary world* 2015; 8: 685.

Allison JP, Havran WL. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annual review of immunology* 1991; 9: 679-705.

Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 1996; 79: 1021-6.

Arruda A, Godden S, Rapnicki P, Gorden P, Timms L, Aly S, Lehenbauer T, Champagne J. Randomized noninferiority clinical trial evaluating 3 commercial dry cow mastitis preparations: I. Quarter-level outcomes. *Journal of Dairy Science* 2013; 96: 4419-35.

Baggiolini M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions. *Enzyme* 2017; 13: 132-60.

Bagri D, Pandey R, Bagri G, Kumari R, Bagdi D. Effect of subclinical mastitis on milk composition in lactating cows. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2018; 6: 231-6.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 463-72.

Bansal BK, Grabowski NT, Hamann J, Singh KB. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal of Dairy Research* 2005; 72: 144-52.

Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG, Ote I. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary microbiology* 2014; 169: 74-9.

Barkema H, Schukken Y, Lam T, Beiboer M, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* 1998; 81: 411-9.

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science* 2006; 89: 1877-95.

Bastin C, Gengler N, Soyeurt H. Phenotypic and genetic variability of production traits and milk fatty acid contents across days in milk for Walloon Holstein first-parity cows. *J Dairy Sci* 2011; 94: 4152-63.

Bastin C, Soyeurt H, Gengler N. Genetic parameters of milk production traits and fatty acid contents in milk for Holstein cows in parity 1 – 3. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 2013; 130: 118-27.

Batavani R, Asri S, Naebzadeh H. The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2007; 8: 205-11

Bewley JM, Einstein ME, Grott MW, Schutz MM. Comparison of Reticular and Rectal Core Body Temperatures in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 2008; 91: 4661-72.

Bludau MJ, Maeschli A, Leiber F, Steiner A, Klocke P. Mastitis in dairy heifers: Prevalence and risk factors. *The Veterinary Journal* 2014; 202: 566-72.

Bogin E. Rapid testing in the evaluation of milk quality using dry chemistry technology. Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar Tel-Aviv, Israel, 28 May - 1 June 1995. Book 1 1995.

Brade W, Flachowsky G. Rinderzucht und Milcherzeugung: Empfehlungen für die Praxis. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung 2005.

Brand B, Baes C, Mayer M, Reinsch N, Kühn C. Identification of a two-marker-haplotype on *Bos taurus* autosome 18 associated with somatic cell score in German Holstein cattle. *BMC genetics* 2009; 10: 1-13.

Brand B, Baes C, Mayer M, Reinsch N, Seidenspinner T, Thaller G, Kühn C. Quantitative trait loci mapping of calving and conformation traits on *Bos taurus* autosome 18 in the German Holstein population. *Journal of Dairy Science* 2010; 93: 1205-15.

Brand B, Hartmann A, Repsilber D, Griesbeck-Zilch B, Wellnitz O, Kühn C, Ponsuksili S, Meyer HH, Schwerin M. Comparative expression profiling of *E. coli* and *S. aureus* inoculated primary mammary gland cells sampled from cows with different genetic predispositions for somatic cell score. *Genet Sel Evol* 2011; 43: 24.

Bruckmaier RM, Gross JJ. Review: Metabolic challenges in lactating dairy cows and their assessment via established and novel indicators in milk. *animal* 2019; 13: s75-s81.

Burfeind O, Von Keyserlingk M, Weary D, Veira D, Heuwieser W. Repeatability of measures of rectal temperature in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2010; 93: 624-7.

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.

Cobirka M, Tancin V, Slama P. Epidemiology and classification of mastitis. *Animals* 2020; 10: 2212.

Cole JB, VanRaden PM, O'Connell JR, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Schnabel RD, Taylor JF, Wiggans GR. Distribution and location of genetic effects for dairy traits. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 2931-46.

Cole JB, Wiggans GR, Ma L, Sonstegard TS, Lawlor TJ, Crooker BA, Van Tassell CP, Yang J, Wang S, Matukumalli LK. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary US Holstein cows. *BMC Genomics* 2011; 12: 1-17.

Coulon J-B, Gasquib P, Barnouin J, Ollier A, Pradel P, Pomiès D. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Research* 2002; 51: 383-93.

Coulon JB, Rémond B. Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply to the dairy cow: A review. *Livestock Production Science* 1991; 29: 31-47.

Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Kronfeld DS. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 1985; 68: 2347-60.

Damm M, Holm C, Blaabjerg M, Bro MN, Schwarz D. Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science* 2017; 100: 4926-40.

De Haas Y, Veerkamp R, Barkema H, Gröhn Y, Schukken Y. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 95-105.

De Vliegher S, Fox L, Piepers S, McDougall S, Barkema H. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 1025-40.

Degen S, Knorr N, Paduch J-H, Zoche-Golob V, Hoedemaker M, Krömker V. Cell differentiation assisting in evaluating mastitis treatment prognosis. *Milk Science International-Milchwissenschaft* 2015; 68: 2-9.

Dosogne H, Vangroenweghe F, Mehrzad J, Massart-Leën AM, Burvenich C. Differential Leukocyte Count Method for Bovine Low Somatic Cell Count Milk. *Journal of Dairy Science* 2003; 86: 828-34.

DVG. Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Fachgruppe Milchhygiene. Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis. Gießen 2002; 5. Auflage.

Eisenberg S, Boerhout E, Ravesloot L, Daemen A, Benedictus L, Rutten V, Koets A. Diurnal differences in milk composition and its influence on in vitro growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in bovine quarter milk. *Journal of Dairy Science* 2016; 99: 5690-700.

Elazar S, Gonen E, Livneh-Kol A, Rosenshine I, Shpigel NY. Neutrophil recruitment in endotoxin-induced murine mastitis is strictly dependent on mammary alveolar macrophages. *Veterinary research* 2010; 41.

Ezzat Alnakip M, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of veterinary medicine* 2014; 2014.

Farschtschi S, Mattes M, Pfaffl MW. Advantages and Challenges of Differential Immune Cell Count Determination in Blood and Milk for Monitoring the Health and Well-Being of Dairy Cows. *Veterinary Sciences* 2022; 9: 255.

Fischer-Tenhagen C, Arlt SP. Messung der Körpertemperatur beim Rind–eine altbewährte Methode kritisch hinterfragt. Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere 2020; 48: 262-7.

Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy 2005; 4: 281-6.

Fulwyler MJ. Flow cytometry and cell sorting. Automation in Hematology 1981: 69-80.

Ghavi Hossein-Zadeh N, Ardalan M. Cow-specific risk factors for retained placenta, metritis and clinical mastitis in Holstein cows. Veterinary Research Communications 2011; 35: 345-54.

Green M, Green L, Medley G, Schukken Y, Bradley A. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. Journal of Dairy Science 2002; 85: 2589-99.

Green MJ, Bradley AJ, Medley GF, Browne WJ. Cow, Farm, and Management Factors During the Dry Period that Determine the Rate of Clinical Mastitis After Calving. Journal of Dairy Science 2007; 90: 3764-76.

Griesbeck-Zilch B, Osman M, Kühn C, Schwerin M, Bruckmaier RH, Pfaffl MW, Hammerle-Fickinger A, Meyer HHD, Wellnitz O. Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. Journal of Dairy Science 2009; 92: 4621-33.

Grummer RR. Effect of feed on the composition of milk fat. Journal of Dairy Science 1991; 74: 3244-57.

Grunert E, Ahlers D. Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung. Grunert, Eberhard und Ahlers, Dirk, Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 1996.

Günther J, Liu S, Esch K, Schuberth H-J, Seyfert H-M. Stimulated expression of TNF- α and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. *Veterinary immunology and immunopathology* 2010; 135: 152-7.

Günther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert H-M. Comparative Kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* - Specific Activation of Key Immune Pathways in Mammary Epithelial Cells Demonstrates That *S. aureus* Elicits a Delayed Response Dominated by Interleukin-6 (IL-6) but Not by IL-1A or Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infection and Immunity* 2011; 79: 695-707.

Günther J, Petzl W, Bauer I, Ponsuksili S, Zerbe H, Schuberth H-J, Brunner RM, Seyfert H-M. Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific Reports* 2017; 7: 4811.

Hagnestam C, Emanuelson U, Berglund B. Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. *Journal of Dairy Science* 2007; 90: 2260-70.

Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly* 2007; 29: 18-31.

Hamann J, Krömker V. Potential of specific milk composition variables for cow health management. *Livestock Production Science* 1997; 48: 201-8.

Hamel J, Zhang Y, Wente N, Krömker V. Heat stress and cow factors affect bacteria shedding pattern from naturally infected mammary gland quarters in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2021; 104: 786-94.

Harp JA, Waters TE, Goff JP. Lymphocyte subsets and adhesion molecule expression in milk and blood of periparturient dairy cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* 2004; 102: 9-17.

Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *Journal of applied microbiology* 2007; 103: 993-1000.

Heikkilä AM, Liski E, Pyörälä S, Taponen S. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 9493-504.

Heimes A, Brodhagen J, Weikard R, Hammon H, Meyerholz M, Petzl W, Zerbe H, Engelmann S, Schmicke M, Hoedemaker M. Characterization of functional traits with focus on udder health in heifers with divergent paternally inherited haplotypes on BTA18. *BMC veterinary research* 2019; 15: 1-11.

Heimes A, Brodhagen J, Weikard R, Becker D, Meyerholz M, Petzl W, Zerbe H, Schuberth H-J, Hoedemaker M, Schmicke M. Cows selected for divergent mastitis susceptibility display a differential liver transcriptome profile after experimental *Staphylococcus aureus* mammary gland inoculation. *Journal of Dairy Science* 2020; 103: 6364-73.

Hillerton J, Berry E. A review. Treating mastitis in the cow—a tradition or an archaism. *Journal of applied microbiology* 2005; 98: 1250-5.

Hoffmann G, Schmidt M, Ammon C, Rose-Meierhöfer S, Burfeind O, Heuwieser W, Berg W. Monitoring the body temperature of cows and calves using video recordings from an infrared thermography camera. *Veterinary Research Communications* 2013; 37: 91-9.

Hogan J, Weiss W, Smith K. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *Journal of Dairy Science* 1993; 76: 2795-803.

Hogan J, Smith KL. Coliform mastitis. *Veterinary research* 2003; 34: 507-19.

Hogeveen H, Huijps K, Lam T. Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal* 2011; 59: 16-23.

Hohmann M-F, Wentz N, Zhang Y, Krömker V. Bacterial load of the teat apex skin and associated factors at herd level. *Animals* 2020; 10: 1647.

Inoue T, Asano Y, Matsuoka S, Furutani-Seiki M, Aizawa S, Nishimura H, Shirai T, Tada T. Distinction of mouse CD8⁺ suppressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 1993; 150: 2121-8.

Janzen JJ. Economic Losses Resulting from Mastitis. A Review¹. *Journal of Dairy Science* 1970; 53: 1151-60.

Jensen K, Günther J, Talbot R, Petzl W, Zerbe H, Schuberth H-J, Seyfert H-M, Glass EJ. *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC Genomics* 2013; 14: 36.

Johnston Jr RB. Monocytes and macrophages. *New England Journal of Medicine* 1988; 318: 747-52.

Kandeel S, Megahed A, Arnaout F, Constable P. Evaluation and Comparison of 2 On-Farm Tests for Estimating Somatic Cell Count in Quarter Milk Samples from Lactating Dairy Cattle. *Journal of veterinary internal medicine* 2018; 32: 506-15.

Kandeel SA, Megahed AA, Ebeid MH, Constable PD. Ability of milk pH to predict subclinical mastitis and intramammary infection in quarters from lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2019; 102: 1417-27.

Karell J, Petzl W, Gangl A, Huber-Schlenstedt R, Sorge U. Changes in antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in bovine quarter milk samples from southern Germany between 2012 and 2022. *Journal of Dairy Science* 2024; 107: 3802-12.

Kayano M, Itoh M, Kusaba N, Hayashiguchi O, Kida K, Tanaka Y, Kawamoto K, Gröhn YT. Associations of the first occurrence of pathogen-specific clinical mastitis with milk yield and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 2018; 85: 309-16.

Kennelly JJ, Glimm DR, Ozimek L. Milk composition in the cow. Faculty of Extension, University of Alberta, Edmonton, Alberta 2000: 1-20.

Khan MZ, Ma Y, Xiao J, Chen T, Ma J, Liu S, Wang Y, Khan A, Alugongo GM, Cao Z. Role of Selenium and Vitamins E and B9 in the Alleviation of Bovine Mastitis during the Periparturient Period. *Antioxidants* 2022; 11: 657.

Kim H, Min Y, Choi B. Real-time temperature monitoring for the early detection of mastitis in dairy cattle: Methods and case researches. *Computers and Electronics in Agriculture* 2019; 162: 119-25.

Koess C, Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research* 2008; 75: 225-32.

Kraus RF, Gruber MA. Neutrophils—From bone marrow to first-line defense of the innate immune system. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 767175.

Kroemker V. Strategies against mastitis due to cow-associated pathogens as a herd problem. *Archiv für Lebensmittelhygiene, Sonderausgabe zum 1. Hannoverschen Milchtag* 2012; No. 3: 61-64.

- Krömker V. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Parey Verlag 2006.
- Krömker V, Paduch J-H, Bormann A, Friedrich J, Zinke C. Nachweisverfahren zur Beurteilung der Keimbelastung in Einstreumaterialien und des daraus resultierenden Mastitisrisikos. Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere 2010; 38: 73-8.
- Kühn C, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, Brockmann G, Schwerin M, Weimann C, Hiendleder S. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. Journal of Dairy Science 2003; 86: 360-8.
- Kühn C, Reinhardt F, Schwerin M. Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. Arch. Anim. Breed. 2008; 51: 23-32.
- Le Roux Y, Laurent F, Moussaoui F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. Veterinary research 2003; 34: 629-45.
- Legates JE, Grinnells CD. Genetic Relationships in Resistance to Mastitis in Dairy Cattle1. Journal of Dairy Science 1952; 35: 829-33.
- Leino L, Paape MJ. Comparison of the chemiluminescence responses of bovine neutrophils to differently opsonized zymosan particles. American Journal of Veterinary Research 1993; 54: 1055-9.
- Leitner G, Chaffer M, Krifucks O, Glickman A, Ezra E, Saran A. Milk leucocyte populations in heifers free of udder infection. Journal of Veterinary Medicine, Series B 2000a; 47: 133-8.
- Leitner G, Yadlin B, Glickman A, Chaffer M, Saran A. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. Research in veterinary science 2000b; 69: 181-4.

Linzell J, Peaker M. The permeability of mammary ducts. *The Journal of physiology* 1971; 216: 701-16.

Lopes HF, West M. Bayesian model assessment in factor analysis. *Statistica Sinica* 2004: 41-67.

Lopes Júnior JEF, Lange CC, Brito MAVP, Santos FR, Silva MAS, Moraes LCDd, Souza GNd. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. *Ciência Rural* 2012; 42: 691-6.

Malek dos Reis CB, Barreiro JR, Mestieri L, Porcionato MAdF, dos Santos MV. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC veterinary research* 2013; 9: 1-7.

Mao X, Kadri N, Thomasen J, De Koning D, Sahana G, Guldbbrandtsen B. Fine mapping of a calving QTL on *Bos taurus* autosome 18 in Holstein cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 2016; 133: 207-18.

Marouf A, Sara IE. Monitoring pH during pasteurization of raw cow's milk using Nd: YAG laser. *International Journal of Advanced Research in Physical Science (IJARPS)* 2018; 4: 1-4.

Martins L, Barcelos MM, Cue RI, Anderson KL, Dos Santos MV, Gonçalves JL. Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. *Journal of Dairy Research* 2020; 87: 298-305.

Matos J, White D, Harmon R, Langlois B. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science* 1991; 74: 1544-9.

McKinnon KM. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology* 2018; 120: 5.1. -5.1. 11.

Meglia G, Johannisson A, Petersson L, Waller KP. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2001; 42: 1-12.

Mehne D. Modellhafte Untersuchungen zur Frühphase der Mastitis beim Rind. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Diss. med. vet., 2010; <https://d-nb.info/1001451198/34>.

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* 65 (3) 2010.

Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 4150-62.

Meyerholz M, Heimes A, Brodhagen J, Rohmeier L, Eickhoff T, Jander S, Hülsebusch A, Weikard R, Günther J, Seyfert H. ChronMast-a model to study functional genetic variation of mastitis susceptibility. Proceedings of the world congress on genetics applied to livestock production. Auckland, 2018.

Meyerholz M, Rohmeier L, Eickhoff T, Hülsebusch A, Jander S, Linden M, Macias L, Koy M, Heimes A, Gorriz-Martin L. Genetic selection for bovine chromosome 18 haplotypes associated with divergent somatic cell score affects postpartum reproductive and metabolic performance. *Journal of Dairy Science* 2019; 102: 9983-94.

Miles AM, McArt JA, Yepes FAL, Stambuk CR, Virkler PD, Huson HJ. Udder and teat conformational risk factors for elevated somatic cell count and clinical mastitis in New York Holsteins. *Preventive veterinary medicine* 2019; 163: 7-13.

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.

Müller-Langhans K, Oberberger L, Zablotzki Y, Engelmann S, Hoedemaker M, Kühn C, Schubert H-J, Zerbe H, Petzl W, Meyerholz-Wohllebe MM. Cows with diverging haplotypes show differences in differential milk cell count, milk parameters and vaginal temperature after *S. aureus* challenge but not after *E. coli* challenge. BMC veterinary research 2024; 20: 200.

Newbould F. The effect of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. Canadian journal of comparative medicine 1973; 37: 189.

Nguyen D-AD, Neville MC. Tight junction regulation in the mammary gland. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 1998; 3: 233-46.

Nitz J, Wentz N, Zhang Y, Klocke D, Tho Seeth M, Krömker V. Dry period or early lactation—Time of onset and associated risk factors for intramammary infections in dairy cows. Pathogens 2021; 10: 224.

Oliveira L, Ruegg P. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. Journal of Dairy Science 2014; 97: 5426-36.

Opdebeeck J, Frost A, O'Boyle D. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. Veterinary microbiology 1988; 16: 77-86.

Ormerod M. An introduction to fluorescence technology. Flow cytometry: a practical approach. IRL Press, Oxford 1990: 29-44.

Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. Journal of Infection 2007; 54: 399-409.

Paape M, Wergin W, Guidry A, Schultze W. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* 1981; 137: 555-578.

Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2002; 7: 109-21.

Paape MJ, Tucker HA. Somatic Cell Content Variation in Fraction-Collected Milk1. *Journal of Dairy Science* 1966; 49: 265-7.

Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003; 34: 597-627.

Palmquist D, Beaulieu AD, Barbano D. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science* 1993; 76: 1753-71.

Park YH, Joo YS, Park JY, San Moon J, Kim SH, Kwon NH, Ahn JS, Davis WC, Davies CJ. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *Journal of veterinary science* 2004; 5: 29-39.

Petzl W. Untersuchungen zur frühen Erreger-Wirts-Interaktion bei der Mastitis des Rindes. Tierärztliche Fakultät, Tierärztliche Hochschule Hannover und Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss. med. vet., 2005; https://elib.tiho-hannover.de/servlets/MCRFileNodeServlet/etd_derivate_00002209/petzlw_ws05.pdf.

Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Yang W, Seyfert HM, Nurnberg 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, Gunther 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 Immunology* 2012; 18: 467-77.

Petzl W, Gunther J, Muhlbauer K, Seyfert HM, Schuberth HJ, Hussen J, Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Zerbe H. Early transcriptional events in the udder and teat after intra-mammary *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge. *Innate Immunology* 2016; 22: 294-304.

Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Seyfert HM, Hussen J, Schuberth HJ. Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Res Vet Sci* 2018; 116: 55-61.

Pfister T. Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der akuten Mastitis des Rindes. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Diss. *Vet. med.*; 2009; https://edoc.ub.uni-muenchen.de/10632/1/Pfister_Tobias.pdf.

Pfützner M, Ivanyos D, Ózsvari L. Wirtschaftliche Verluste in deutschen Milchviehbetrieben durch subklinische Mastitiden. *Researchgate* 2019; KTP 27 2019; 9: 110-5.

Pieper J, Hoedemaker M, Krömker V. Zur Bedeutung der Trockenperiode für die Entstehung und Vorbeugung von Neuinfektionen der bovinen Milchdrüse. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere* 2013; 41: 315-24.

Pilla R, Schwarz D, König S, Piccinini R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 4410-20.

Pilla R, Malvisi M, Snel G, Schwarz D, König S, Czerny C-P, Piccinini R. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science* 2013; 96: 1653-60.

Pillai SR, Kunze E, Sordillo LM, Jayarao BM. Application of Differential Inflammatory Cell Count as a Tool to Monitor Udder Health. *Journal of Dairy Science* 2001; 84: 1413-20.

Pinzón-Sánchez C, Ruegg P. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 2011; 94: 3397-410.

Pinzón-Sánchez C, Cabrera V, Ruegg P. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. *Journal of Dairy Science* 2011; 94: 1873-92.

Pohl A, Heuwieser W, Burfeind O. Assessment of milk temperature measured by automatic milking systems as an indicator of body temperature and fever in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2014; 97: 4333-9.

Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature immunology* 2012; 13: 170-80.

Pyörälä S. New Strategies to Prevent Mastitis. *Reproduction in Domestic Animals* 2002; 37: 211-6.

Radostits OM, Gay C, Hinchcliff KW, Constable PD. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. *Vet. Med* 2007; 10: 2045-50.

Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem cells* 2008; 26: 151-62.

Raftery AE. Bayesian model selection in social research. *Sociological methodology* 1995: 111-63.

Rainard P, Riollot C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction nutrition development* 2003; 43: 439-57.

Rainard P, Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary research* 2006; 37: 369-400.

Rainard P, Cunha P, Martins RP, Gilbert FB, Germon P, Foucras G. Type 3 immunity: A perspective for the defense of the mammary gland against infections. *Veterinary research* 2020; 51: 1-8.

Rasmussen MD, Blom JY, Nielsen LAH, Justesen P. Udder health of cows milked automatically. *Livestock Production Science* 2001; 72: 147-56.

Rausch PG, Moore TG. Granule Enzymes of Polymorphonuclear Neutrophils: A Phylogenetic Comparison. *Blood* 1975; 46: 913-9.

Riollot C, Rainard P, Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 161-7.

Rivas AL, Quimby FW, Blue J, Coksaygan O. Longitudinal Evaluation of Bovine Mammary Gland Health Status by Somatic Cell Counting, Flow Cytometry, and Cytology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2001; 13: 399-407.

Robles I, Kelton DF, Barkema HW, Keefe GP, Roy JP, von Keyserlingk MAG, DeVries TJ. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. *animal* 2020; 14: 1052-66.

Rohmeier L Etablierung eines Mastitisinfektionsmodells zur Untersuchung vorteilhafter Wirtsdeterminanten bei der Kuh. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Diss. med. vet., 2018; https://edoc.ub.uni-muenchen.de/23171/1/Rohmeier_Laura.pdf.

Rohmeier L, Petzl W, Koy M, Eickhoff T, Hulsebusch A, Jander S, Macias L, Heimes A, Engelmann S, Hoedemaker M, Seyfert HM, Kuhn C, Schuberth HJ, Zerbe H, Meyerholz MM. In vivo model to study the impact of genetic variation on clinical outcome of mastitis in uniparous dairy cows. *BMC Vet Res* 2020; 16: 33.

Ruegg PL, Reinemann DJ. Milk quality and mastitis tests. *The Bovine Practitioner* 2002; 41-54.

Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science* 2017; 100: 10381-97.

Rupp R, Boichard D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary research* 2003; 34: 671-88.

Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology* 2011; 32: 452-60.

Samková E, Špička J, Pešek M, Pelikánová T, Hanuš O. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. *South African Journal of Animal Science* 2012; 42: 83-100.

Santos J, Cerri R, Ballou M, Higginbotham G, Kirk J. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal reproduction science* 2004; 80: 31-45.

Schalm O. Bovine Mastitis and a Program for Its Control in California. *The Canadian Veterinary Journal* 1962; 3: 90.

Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DGE, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology* 2011; 144: 270-89.

Schwarz D, Diesterbeck US, König S, Brügemann K, Schlez K, Zschöck M, Wolter W, Czerny CP. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* 2011; 94: 5033-44.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 2003; 34: 475-91.

Seykora A, McDaniel B. Udder and teat morphology related to mastitis resistance: a review. *Journal of Dairy Science* 1985; 68: 2087-93.

Shapiro HM. Practical flow cytometry. John Wiley & Sons, Wiley Online Library. 681 2005.

Sharma N, Mukherjee R, Ingale S, Jadhav R. Therapeutic and anti-oxidant activity of vitamin E and selenium in bovine Staphylococcal mastitis. *The Indian Journal of Veterinary Research* 2010; 19: 25-31.

Sipka A, Pomeroy B, Klaessig S, Schukken Y. Bovine natural killer cells are present in *Escherichia coli* infected mammary gland tissue and show antimicrobial activity in vitro. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 2016; 48: 54-60.

Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 1851-65.

Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2002; 7: 135-46.

Steeneveld W, Hogeveen H, Barkema HW, van den Broek J, Huirne RB. The influence of cow factors on the incidence of clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2008; 91: 1391-402.

Stelwagen K, Farr VC, McFadden HA, Prosser CG, Davis SR. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1997; 273: R379-R86.

Stephan KE, Penny WD, Daunizeau J, Moran RJ, Friston KJ. Bayesian model selection for group studies. *NeuroImage* 2009; 46: 1004-17.

Stoop WM, van Arendonk JAM, Heck JML, van Valenberg HJF, Bovenhuis H. Genetic Parameters for Major Milk Fatty Acids and Milk Production Traits of Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science* 2008; 91: 385-94.

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology* 2010; 31: 318-24.

Sumon S, Parvin MS, Ehsan MA, Islam MT. Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Vet World* 2020; 13: 1709-13.

Sutra L, Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 1994; 40: 79-89.

Taponen S, Liski E, Heikkilä AM, Pyörälä S. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science* 2017; 100: 493-503.

Trevisi E, Zecconi A, Cogrossi S, Razzuoli E, Grossi P, Amadori M. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *Research in veterinary science* 2014; 96: 229-33.

Van Werven T, Noordhuizen-Stassen E, Daemen A, Schukken Y, Brand A, Burvenich C. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis induced in dairy cows with *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science* 1997; 80: 67-74.

Vickers L, Burfeind O, Von Keyserlingk M, Veira D, Weary D, Heuwieser W. Comparison of rectal and vaginal temperatures in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2010; 93: 5246-51.

Vikova H, Babak V, Vrtkova I, Cervinkova D, Marosevic D, Moravkova M, Jaglic Z. Epidemiology of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* and mastitis streptococci in a dairy cattle herd with a history of recurrent clinical mastitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2017; 20.

Vukasinovic N, Bacciu N, Przybyla CA, Boddhireddy P, DeNise SK. Development of genetic and genomic evaluation for wellness traits in US Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 2017; 100: 428-38.

Wagner LA, Fritsche D, Gross JJ, Bruckmaier RM, Wellnitz O. Effects of different nutrient supply on metabolism and mammary immune response to an LPS challenge in early lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2023; 106: 2948-62.

Wahyu Harjanti D, Sambodho P. Effects of mastitis on milk production and composition in dairy cows. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2020; 518: 012032.

Wall SK, Wellnitz O, Bruckmaier RM, Schwarz D. Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 5362-73.

Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary microbiology* 1988; 16: 41-66.

Wellenberg GJ, van der Poel WHM, Van Oirschot JT. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary microbiology* 2002; 88: 27-45.

Wellnitz O, Bruckmaier RM. Invited review: The role of the blood–milk barrier and its manipulation for the efficacy of the mammary immune response and milk production. *Journal of Dairy Science* 2021; 104: 6376-88.

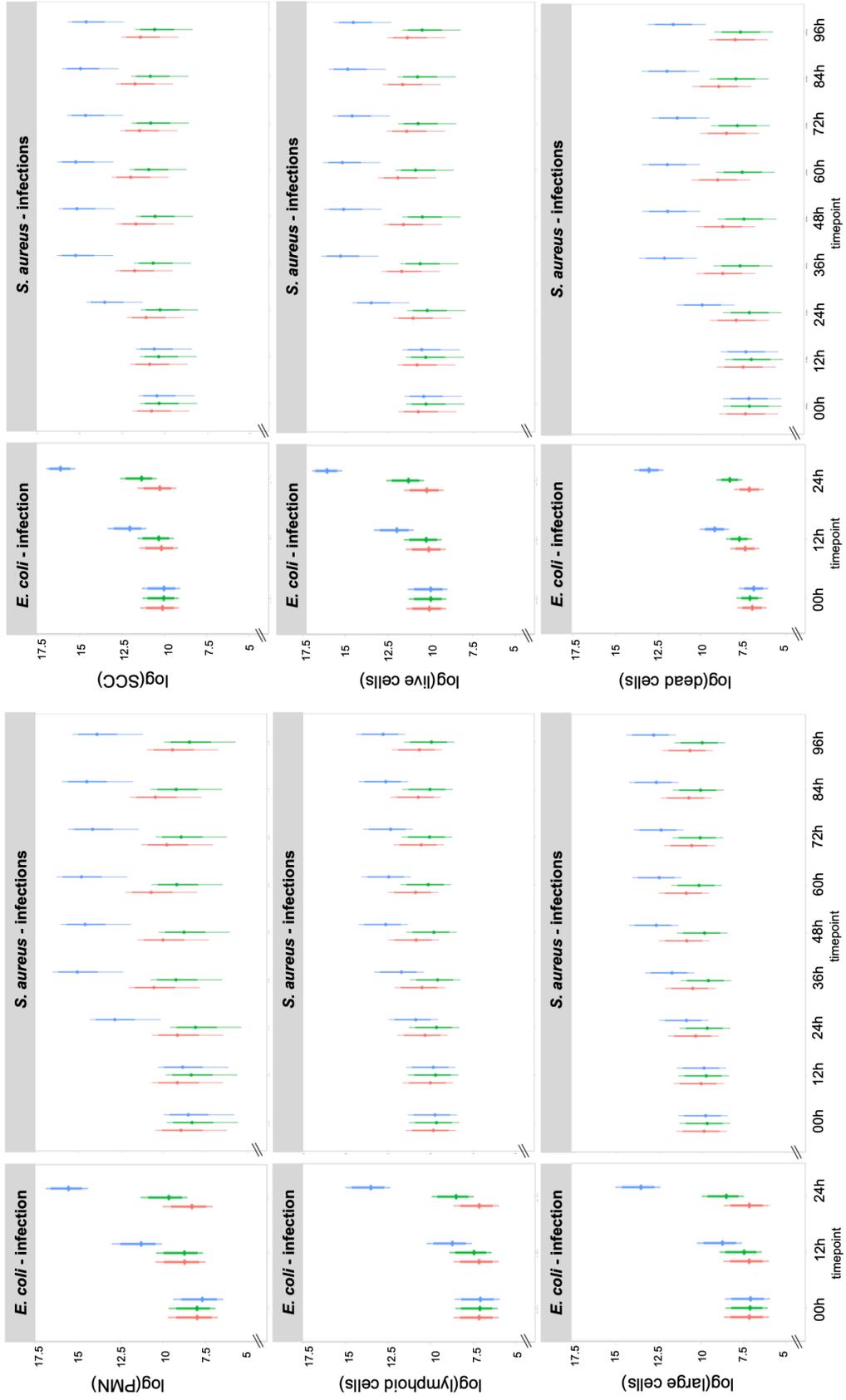
Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O’Farrelly C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary immunology and immunopathology* 2011; 140: 181-9.

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.

Zecconi A, Vairani D, Cipolla M, Rizzi N, Zanini L. Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. *Italian Journal of Animal Science* 2019; 18: 460-5.

VIII. ANHANG

1. Additional Figure 1



Additional Figure 1: DMCC of quarter milk samples of differentially challenged udder quarters

Additional Figure 1: Illustration of the Bayesian model including logarithmized number [cells/ml] of polymorphonuclear neutrophils (PMN), somatic cell count (SCC), lymphoid cells, large cells, vital and non-vital cells in milk of challenged (one/two quarter/s), *versus* non-infected (one quarter), *versus* control quarters (one quarter, treated with saline solution 0.9%) of uniparous cows challenged with *Escherichia coli* (*E. coli*) in one udder quarter for 24 hours or with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in two udder quarters for 96 hours. The dataset includes $n = 35$ cows, distributed as follows: *E. coli* challenge: $n = 11$ and *S. aureus* challenge: $n = 24$. Model predictions are presented as 80% and 95% confidence intervals of the mean.

2. R-Skripte

2.1. DMCC

Used packages

```
Tidyverse, ggstatsplot, knitr, broom, readxl, DataExplorer, janitor, performance, sjPlot, effects, dlookr, lme4, lmerTest, emmeans, effects, robustlmm, missRanger, magrittr, dplyr, purr, forcats, tidyr, modelr, ggdist, tidybayes, ggplot2, cowplot, rstan, brms, ggrepel, RColorBrewer, gganimate, posterior, bayestestR, PerformanceAnalytics
```

1. Differences between GQ and kq (Haplotype*Timepoint)

pmn_abs_perml (same with the other cell populations)

```
m = brm(pmn_abs_perml ~ haplotype * timepoint + (1|cow), data=d_imputet, iter = 10000)
```

2. Differences between infected and non-infected quarters:

2.1 E.coli

2.1.1 pmn_abs_perml (same with the other cell populations)

```
m = brm(pmn_abs_perml ~ treatment * timepoint + (1|cow), data =d_e_coli, iter = 20000)
```

2.2 S. aureus

2.2.1 pmn_abs_perml (same with the other cell populations)

```
m = brm(pmn_abs_perml ~ treatment * timepoint + (1|cow), data =d_s_aureus, iter = 20000)
```

3. Differences between GQ and kq: E.coli vs. S.aureus in first 24h

##haplotype*pathogene*timepoint (Only "infected" quarters)

3.1 pmn_abs_perml (same with the other cell populations)

```
m = brm(pmn_abs_perml ~ haplotype*pathogene*timepoint + (1|cow), data =infected, iter = 20000)
```

2.2. Milk parameters

1. fat_in_percent: Difference between haplotypes (Haplotype*Timepoint)

1.1 all quarters, all timepoints

```
m = brm(fett_in_percent ~ haplotype*timepoint, data =dada, iter = 20000)
```

1.2 fat_in_percent: Difference between haplotypes

#only infected quarters

```
m = brm(fett_in_percent ~ haplotype*timepoint, data =dada_infected, iter = 20000)
```

1.3 fat_in_percent: Difference between pathogens

#first 24h, all quarters

```
m = brm(fett_in_percent ~ pathogene*timepoint, data =dada_24h, iter = 20000)
```

1.4 fat_in_percent: Difference between Haplotypes

#only E.coli (prepare new data for only E. coli and only first 3 timepoints)

```
m = brm(fett_in_percent ~ haplotype * timepoint + (1|cow), data =dada_e_coli, iter = 20000)
```

1.5 fat_in_percent: Difference between haplotypes

#only S.aureus

```
m = brm(fett_in_percent ~ haplotype * timepoint + (1|cow), data =dada_s_aureus, iter = 20000)
```

2.3. Vaginal temperature

```
#####3h interval approach #####
## 1. Difference between GQ and kq (Haplotype*Timepoint)
### mean_VT
m = brm(mean ~ haplotype * zeit_new + (1|cow), data=data_all, iter = 10000)

## 2. Differences between GQ and kq, seperated for the two pathogens
### 2.1 E.coli
#### mean VT 3-hour Intervall
m = brm(mean ~ haplotype * zeit_new + (1|cow), data =data_e_coli, iter =
20000)

### 2.2 S. aureus
#### mean VT 3-Stunden Intervall
m = brm(mean ~ haplotype * zeit_new + (1|cow), data =data_s_aureus, iter =
20000)

### 3. Differences between the pathogens (pathogen*timepoint)
#### 3.1 GQ: S.aureus vs E.coli
m = brm(mean ~ pathogene * zeit_new + (1|cow), data =data_GQ, iter = 20000)

#### 3.2 kq: E.coli vs S.aureus
m = brm(mean ~ pathogene * zeit_new + (1|cow), data =data_kq, iter = 20000)

### 4. Differences between the pathogens and haplypes for only first 24h
(haplotype*pathogene*timepoint)
##-> same procedure, but filtered for first 24h
m = brm(mean ~ haplotype*pathogene*zeit_new, data =data_24h, iter = 20000)

### 4.1 only GQ:
##Difference between the pathogens in the first 24h
m = brm(mean ~ pathogene*zeit_new, data =data_24h_GQ, iter = 20000)

### 4.2 only kq:
##Difference between the pathogens in the first 24h (pathogen*timepoint)
m = brm(mean ~ pathogene*zeit_new, data =data_24h_kq, iter = 20000)
```

4.4 only E.coli:

##Difference between the haplotypes (haplotype*timepoint)

```
m = brm(mean ~ haplotype*zeit_new, data =data_24h_E.coli, iter = 20000)
```

###4.5 only S.aureus:

##Difference between the haplotypes (haplotype*timepoint)

```
m = brm(mean ~ haplotype*zeit_new, data =data_24h_S.aureus, iter = 20000)
```

#-> exact the same codes were used for analysis of the 12hour intervalls (different excel table)!

5. Unterschiede zwischen den Pathogenen und den Haplotypen (für die ersten 24h)

```
m = brm(vt_mean ~ haplotype*pathogene*timepoint)
```

```
m = brm(vt_mean ~ pathogene*timepoint)
```

```
m = brm(vt_mean ~ haplotype*timepoint)
```

(Codes siehe oben)

IX. DANKSAGUNG

Liebe Marie, lieber Wolfram, ein allergrößtes Dankeschön gilt erstmal euch, die ihr stets mit Rat und Tat zur Seite standet und immer an diese Arbeit geglaubt habt. Danke für euer Vertrauen und für eure fantastische Zusammenarbeit, die wohl die Effizienteste war, von der ich bislang ein Teil sein durfte!

Das allerherzlichste Dankeschön möchte ich Marie widmen, ohne die ich nie zu dieser Doktorarbeit gekommen wäre. Durch einen glücklichen Zufall während der Schwerpunkt-Klinik, haben wir unsere gemeinsame Liebe zur Statistik entdeckt und uns an den großen Datenberg gewagt! Vielen Dank für deinen Mut, dein Vertrauen und dein stets offenes Ohr. Gute 52.000 Zeilen einer Excel-Tabelle mit dir gemeinsam zu meistern hat unglaublich viel Spaß gemacht!

Für das immense geballte Fachwissen, die immer wieder neuen Ideen und Vorschläge und die viele aufgewendete Zeit möchte ich mich bei Wolfram bedanken! Wir haben uns zwar nicht oft in live gesehen, aber die gemeinsam besuchte Tagung mit Posterpräsentation in Schwäbisch Gmünd wird mir noch lange in Erinnerung bleiben. Bei der Liebe zum Detail das Große-Ganze nicht aus den Augen verlieren ist mit Sicherheit eins deiner großen Alleinstellungsmerkmale und wird mich auf meinem weiteren Lebensweg bestimmt noch oft begleiten!

Für die gesamte Statistische Betreuung schicke ich ein riesiges Dankeschön an den lieben Yury! So viele Stunden haben wir mit R-Codes und programmieren verbracht und am Ende waren es über 6.500 Zeilen R-Code: nicht immer einfach zu durchschauen, aber mit Sicherheit eine wunderbare Herausforderung für alle Beteiligten ;). Beim Ausprobieren, Vergleichen und Berechnen verschiedenster statistischer Modelle (Gemischte Effekte Modelle, Bayesische Modelle, Korrelationen, gepaarter und ungepaarter t-Test, Random Forest Modelle, ...) und auch verschiedenster Graphik-Varianten habe ich so viel wie nie zuvor in kurzer Zeit lernen und über mich hinauswachsen können.

Die Zusammenarbeit mit euch allen war einmalig und etwas ganz besonderes für mich! Nicht nur das liebe R, sondern vielmehr euch alle werde ich doch ein bisschen vermissen.

Ein weiteres Dankeschön geht an Alle, die beim ChronMast-Projekt mitgearbeitet haben. Da der Versuch in Hannover schon stattfand, während ich noch in den ersten Tiermedizin-Semestern in München war, möchte ich mich an dieser Stelle bei Allen bedanken, die an diesem Projekt mitgewirkt haben! Über die Planung und Vorarbeit dieses doch sehr aufwendigen und komplizierten Versuches, der Betreuung der Versuchstiere, dem Sammeln und Bearbeiten der Milchproben und Fieber-Daten bis hin zur Anlegung der Rohdaten in den Excel Tabellen haben etliche, mir (leider) unbekannte Personen, Professoren und Doktoranden mitgewirkt! Ohne Eure aufgewandte Zeit, Mühe und Vorarbeit hätte ich diese Arbeit gar nicht erst anfangen können.

Auch allen Koautoren unseres Papers möchte ich an dieser Stelle für das Mitdenken und Korrekturlesen danken! Eine so unkomplizierte und schnelle Zusammenarbeit verdient ein großes Lob.

Als letztes möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und Allen, die mich begleitet haben (Stallkollegen, Praxis-Team, Osteo's, hierzu gehören selbstverständlich auch alle meine Vierbeiner) bedanken! Ihr habt alle immer an mich geglaubt, auch wenn ich es selber nicht mehr getan habe und hattet stets ein paar aufmunternde Worte für mich parat. Ob ein entspannter Ausritt, eine herzliche Umarmung oder auch nur euer Dasein, es gab mir unheimlich viel Kraft, obwohl ich so viele Projekte gleichzeitig verfolgt habe.

Danke an meinen Mann Timmy für all deine Liebe! Auch wenn du nie ganz verstanden hast, warum man eigentlich diese zwei Buchstaben haben möchte, hast du doch bis in die Nacht mit mir diese Arbeit formatiert ☺. Du schaffst es immer im richtigen Moment für mich da zu sein und deine Geduld und Liebe sind für mich das Wertvollste. Ich freue mich sehr auf unsere gemeinsame Zukunft, gemeinsam schaffen wir (fast) alles!