

## 2 Literatur

### 2.1 Mastitis

Durch Erkrankungen des Euters werden in der Milchviehhaltung enorme Verluste verursacht. Diese setzen sich zusammen aus einer Minderleistung der Milchdrüse mit Abnahme der Milchmenge und/ oder –qualität, Abgabeverbot der Milch aufgrund des notwendigen Einsatzes von wartezeitpflichtigen Arzneimitteln, Behandlungskosten und des frühzeitigen Abganges an Euterentzündung erkrankter Tiere.

Als Mastitis wird die Entzündungen der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden, speichernden und ableitenden Abschnitte bezeichnet. Sie kann akut oder chronisch mit klinisch manifesten Anzeichen (klinische Mastitis) bzw. mit klinisch nicht nachweisbaren Symptomen (subklinische Mastitis) verlaufen (Wendt et al., 1994).

Zur Klassifizierung der Eutergesundheit wurden von der International Dairy Federation (1999) folgende Definitionen herausgegeben:

#### *gesundes Euter:*

Es sind keine äußerlichen Krankheitserscheinungen erkennbar, die Milch enthält keine pathogenen Mikroorganismen und der Zellgehalt sowie die Leitfähigkeit sind normal.

#### *latente Infektion:*

Eine latente Infektion liegt vor, wenn Erreger nachgewiesen werden, ohne dass sichtbare Krankheitserscheinungen vorliegen.

#### *subklinische Mastitis:*

Subklinische Mastitiden sind Entzündungen des Euters ohne äußerlich sichtbare Symptome, die diagnostische Tests, wie vor allem die Zellzahlbestimmung, erfordern.

#### *klinische Mastitis:*

Die klinische Mastitis ist charakterisiert durch sichtbare Veränderungen der Milch und/ oder des Euters. Sie kann akut, subakut oder chronisch verlaufen.

### *unspezifische Mastitis*

Euterentzündungen bei denen aus den Milchproben keine Mikroorganismen isoliert werden können, was nicht zwangsläufig bedeutet, dass die Mastitis nicht durch Mikroorganismen hervorgerufen wurde, werden als unspezifische Mastitis bezeichnet.

#### **2.1.1 Häufigkeit von Mastitiden**

Die meisten Euterentzündungen treten um den Geburtszeitpunkt und in der Frühlaktation auf (Schukken et al., 1989; Miltenburg et al., 1996; Fabre et al., 1997). So fanden Pearson und Mackie (1979), dass die meisten Mastitiden innerhalb der ersten zwei Monate der Laktation auftraten. Auch in einer neueren Arbeit wurden 51,4 % aller klinischen Mastitiden in der Frühlaktation festgestellt (Shpigel et al., 1998).

Elbers et al. (1998) stellten eine Inzidenz klinischer Mastitiden von durchschnittlich 12,7 Vierteln pro Jahr pro Hundert Kühe fest. Sie konnten Unterschiede in der Mastitisinzidenz zwischen Herden mit einem Zellgehalt in der Tankmilch von unter 150.000 Zellen/ml und Herden mit einem Zellgehalt von über 150.000 Zellen/ml feststellen. Herden mit einem Zellgehalt von unter 150.000 Zellen/ml zeigten eine höhere Mastitisrate. Für Herden deren Zellzahlen zwischen 150.000 und 250.000 Zellen/ml lagen und Herden, die über 250.000 Zellen/ml in der Tankmilch hatten, konnten keine unterschiedlichen Mastitisinzidenzen festgestellt werden. Erskine et al. (1988) unterschieden zwischen Herden mit niedrigem (im Mittel  $\leq 150.000$  Zellen/ml) und hohem (durchschnittlich  $> 700.000$  Zellen/ml)

Tankmilchzellgehalt. Sie stellten dabei eine höhere Mastitisinzidenz in Herden mit niedrigem Zellgehalt (4,23 Infektionen/100 Kühe/ Monat) als in denen mit hohem Zellgehalt (2,91 Infektionen/100 Kühe/ Monat) fest. In einer weiteren Untersuchung wurden Herden in Gruppen nach ihrem durchschnittlichen Zellgehalt in der Tankmilch eingeteilt in niedrig  $\leq 150.000$  Zellen/ml, mittel = 151.000 bis 250.000 Zellen/ml und hoch  $> 250.000$  Zellen/ml. Die mittlere Mastitisinzidenz dieser Herden lag bei 0,26 Euterentzündungen pro 365 Kuhtagen. Hierbei war kein Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen (Barkema et al., 1998).

In den Untersuchungen von Elbers et al. (1998) zeigte sich ein erhöhtes Mastitisrisiko durch Milchaustritte zwischen den Melkzeiten, Zitzenverletzungen, fehlender Desinfektion des Abkalbebereiches nach der Kalbung und einheitlich beständiger Zitzendesinfektion. Die konsequente Zitzendesinfektion nach dem Melkvorgang führte zu einer Steigerung coliformer Mastitiden. Barkema et al. (1999) bestätigten diese Beobachtung. Sie stellten jedoch fest, dass

das nur für Herden mit niedrigem Tankmilchzellgehalt galt und es neben coliformen Keimen auch zu einer Erhöhung der Mastitisrate durch kontagiöse Mastitiserreger kam.

Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen der Milchleistung und der Häufung von Mastitiden. So zeigten Herden mit höherer Milchleistung auch eine höhere Mastitisrate (Schukken et al., 1990).

Zu den auf die Entstehung und den Ausbruch einer Mastitis Einfluss nehmenden technischen Faktoren gehören einerseits die Melktechnik andererseits die Melkarbeit. Vermehrtes Auftreten von Mängeln im Vakuumsystem der Melkanlage führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl der von Euterentzündungen betroffenen Viertel (Bour, 1995). In Bezug auf die Melkarbeit zeigten Betriebe ohne Fehler in der Melkhygiene signifikant weniger Euterinfektionen (Matzke et al., 1992).

Neben den natürlichen Abwehrmechanismen der Tiere spielen auch die Haltungs- und Fütterungsbedingungen für die Eutergesundheit eine wichtige Rolle. Die einzelnen Faktoren nehmen jedoch unterschiedlichen Einfluss auf die Entstehung von Mastitiden durch die einzelnen Erreger. Für die Entstehung von Mastitiden durch coliforme Keime spielte vor allem die Haltungs- und Melkhygiene eine wichtige Rolle. Mastitiden ausgelöst durch *Sc. dysgalactiae* oder *Sc. uberis* waren eher von Fütterungsfaktoren abhängig. Mastitiden durch *S. aureus* zeigten eine hohe Korrelation zu Infektionen mit *Sc. dysgalactiae* (Barkema et al., 1999).

Der Charakter und die Ausprägung klinischer Symptome sowie der klinische Verlauf der Mastitiden unterliegt in komplexer Weise überwiegend folgenden Einflüssen (Merck, 2000):

- Art, Menge und Pathogenität des Erregers
- Art und Ausmaß des Einwirkens sogenannter prädisponierender Faktoren
- Abwehrlage des Euterviertels und des gesamten Organismus
- Funktionszustand der Milchdrüse
- Ausmaß der pathologischen Veränderungen zu Beginn der Behandlung

### 2.1.2 Mastitiserreger

Mastitiserreger zeigen unterschiedliche epidemiologische Eigenschaften. Man unterscheidet zwischen kontagiösen und umweltassoziierten Mastitiserregern (Smith und Hogan, 1995). Zu den kontagiösen Erregern zählen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.* sowie *Streptococcus dysgalactiae*. Die umweltassoziierten Mastitiserreger sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Umweltassoziierte Mastitiserreger (nach Smith und Hogan, 1995)

Grampositive Erreger	Gramnegative Erreger	Sonstige Erreger
<i>Sc. uberis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
<i>Sc. dysgalactiae</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Nocardia spp.</i>
<i>Sc. equinus</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Serratia spp.</i>	Hefen
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus spp.</i>	Pilze
	<i>Citrobacter spp.</i>	Algen
	<i>Pseudomonas spp.</i>	

Die Zuordnung von *Sc. dysgalactiae* ist umstritten, da der Erreger in verschiedenen Herden sowohl umweltassoziierte als auch kontagiöse Mastitiden hervorrufen kann (Smith und Hogan, 1995).

*Corynebacterium bovis* und koagulase-negative Staphylokokken (KNS) werden auch als „minor pathogens“ bezeichnet, während die übrigen als „major pathogens“ gelten (Smith und Hogan, 1995). Weiterhin können auch noch andere Erreger für das Auftreten von Mastitiden verantwortlich sein. So wurden Chlamydien und Mykoplasmen als Mastitiserreger beschrieben (Ronsholt und Basse, 1981; Gonzales et al., 1992; Byrne et al., 2000). Kaltenböck (1986) konnte in 235 (86,4%) von 272 Milchproben von Tieren mit Euterentzündungen „Elementarkörperchen“ aber weder Mykoplasmen, Acholeplasmen, Ureaplasmen noch Chlamydien feststellen. Er nannte diese Organismen Chlamydien- oder Mykoplasmen – ähnliche Erreger und sah sie als Ursache unspezifischer steriler Mastitiden und Grundlage vieler bakterieller Erkrankungen des Rindereuters.

Zum Nachweis von Mastitiserregern ist die kulturell-bakteriologische Untersuchung nach wie vor die Methode der Wahl, auch wenn molekularbiologische Verfahren wie die Polymerase Chain Reaction (PCR) zum Nachweis schwer kultivierbarer Erreger und zur Speziesidentifizierung in absehbarer Zeit Einzug in die Diagnostik finden (Zschöck, 1999). Zorah et al. (1993) wandten eine immunchemische Methode zum besseren Nachweis von Mastitisantigenen bei unspezifischen Mastitiden an. Sie konnten so in 67,9 % der Milchproben

aus denen bakteriologisch kein Erreger isoliert werden konnte, Antigene von Mastitiserregern nachweisen.

Die meisten Mastitiserreger gelangen über den Strichkanal in das Euter. Die Übertragung der Erreger findet hauptsächlich während des Melkens statt. Von Bedeutung sind hierbei Melkmaschine, Melkerhände und Euterlappen. Es können aber auch Personen, Einstreu und Stalleinrichtung als Vektoren dienen.

In den letzten 25 Jahren ist der Zellzahlgehalt der Herden immer weiter gesunken. Hierdurch hat sich auch das Mastitisgeschehen geändert. Während früher als Mastitisauslöser hauptsächlich kontagiöse Mastitiserreger auftraten, sind es heute eher umweltassoziierte Erreger (Erskine et al., 1988; Smith und Hogan, 1993; Schukken et al., 1998). Barkema et al. (1998) fanden dagegen in ihren Untersuchungen insgesamt *S. aureus* als häufigsten Mastitiserreger. In Herden mit niedrigem Zellgehalt in der Tankmilch herrschten durch gramnegative Keime (v.a. *E. coli*) ausgelöste Mastitiden vor, aber auch *S. aureus* war hier ein wichtiger Keim. In Herden mit hohem Tankmilchzellgehalt war *S. aureus* dagegen der bedeutendste Mastitiserreger. Gleiches zeigte sich in den Untersuchungen von Erskine et al. (1988). Die Verbreitung kontagiöser Mastitiserreger wie *Sc. agalactiae* und *S. aureus* war in Herden mit niedriger Zellzahl deutlich geringer. Dagegen kamen hier mehr Mastitiden ausgelöst durch Umweltkeime vor als in Herden mit hoher Zellzahl in der Tankmilch. Auch trat in Herden mit niedriger Zellzahl der Tankmilch ein deutlich höherer Anteil an Mastitiden auf, aus denen keine Mikroorganismen isoliert werden konnten, als in den Herden mit hohen Tankmilchzellgehalten (Barkema et al., 1998). Erskine et al. (1988) konnten in Herden mit niedrigem Tankmilchzellgehalt in  $28,6 \pm 3,8$  % der klinischen Mastitiden und in Herden mit hohem Tankmilchzellgehalt in  $8,8 \pm 3,0$  % der klinischen Mastitiden keine Erreger aus den Milchproben isolieren.

Weitere Angaben zu bakteriologisch negativen Milchproben in Untersuchungen über klinische Mastitiden sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Vorkommen unspezifischer Mastitiden (bakteriologisch negative Ergebnisse klinischer Mastitiden)

Autor	Zahl der untersuchten klin. Mastitiden	Unspezifische Mastitiden in %
Pearson und Mackie (1979)	477	18,0
Pyörälä und Syväjärvi (1987)	423	17,0
Schukken et al. (1989)	1140	22,9
Dinsmore et al. (1992)	354	15,5
Fabre et al. (1997)	293	31,0
Morin und Constable (1998)	234	42,7
Robinson und Harwood (1998)	94	36,0
Sargeant et al. (1998)	2840	17,7
Shpigel et al. (1998)	978	8,1

Es gibt verschiedene Erklärungen für den fehlenden Nachweis von Erregern bei Mastitiden. So kann die zum Zeitpunkt der Probenentnahme ausgeschiedene Keimmenge zu gering für einen Nachweis sein, die Bakterienvermehrung wird durch exogene (z. B. Antibiotika) oder endogene (Milchenzyme) Substanzen in der Milch gehemmt, die Probenaufbewahrung bis zur Untersuchung hat zu einer Keimreduzierung geführt oder es handelt sich um Organismen, die spezielle Anzüchtungsverfahren benötigen. Ein bakteriologisch negativer Befund einer Mastitismilchprobe ist somit kein Beweis, dass tatsächlich kein Erreger vorhanden ist (Hanley und Lippman-Hand, 1983).

Zorah et al. (1993) entwickelten Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs), um Antigene (AG) von *S. aureus*, *E. coli*, *Sc. agalactiae*, *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis* in Milchproben von an Mastitis erkrankten Eutern, bei denen keine Erreger isoliert werden konnten, nach zu weisen. In 84 Milchproben ohne Erregerisolierung wurden in 57 Fällen ( 67,9 %) mit den ELISAs entsprechende AG entdeckt. Allein 43 Proben (51,2 %) beinhalteten *E. coli*-AG.

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung von unspezifischen Mastitiden sind Keime, die nicht in der Routinediagnostik erfasst werden. So fand Kaltenböck (1986) in 235 von 272 an Mastitis

erkrankten Tieren Chlamydien-oder Mykoplasmen – ähnliche Keime. 54,4 % (148) dieser Mastitiden zeigten keine weiteren Erregerbefunde, waren also „steril“.

In einigen Arbeiten wurde versucht, anhand der klinischen Symptome die unspezifischen Mastitiden als eher zu den grampositiven oder gramnegativen Mastitiden zugehörig einzustufen, um eine gezieltere Behandlung vornehmen zu können. Die Aussagen variieren hier aber beachtlich. So fanden White und Montgomery (1987) eine hohe Übereinstimmung zu klinischen Symptomen von grampositiven Mastitiden und signifikante Unterschiede zu gramnegativen Mastitiden, während Morin und Constable (1998) zu dem umgekehrten Ergebnis kamen. Weiterhin kann es sich bei den unspezifischen Mastitiden um Spontanheilungen handeln, die sowohl für grampositive (Chamings, 1984; Smith et al., 1985) als auch für gramnegative (Hill et al., 1978; Eberhart, 1984) Mastitiden beschrieben wurden.

### 2.1.3 Abwehrmechanismen des Euters

Zusätzlich zum Abwehrsystem des Körpers spielen die lokalen Abwehrmechanismen der Milchdrüse des Rindes eine große Rolle zur Verhinderung des Eindringens von Erregern und Toxinen über den Zitzenkanal in das Hohlraumssystem.

Sie setzen sich zusammen aus mechanischen Faktoren wie den Mechanismen der Zitzenbarriere und des Epithels der Milchzisterne, der Milchgänge sowie der Alveolen und den humoralen und zellulären Abwehrfaktoren.

Die Zitzenbarriere wird gebildet durch einen den Zitzenkanal verschließenden Schließmuskel, einen nach außen gerichteten Sekretstrom, eines nach außen gerichteten Wachstums der Epithelzellen, einer intensiven Verhornung des Zitzenkanalepithels sowie der bakteriziden Wirkung des Laktosebums und durch die Funktionen der Fürstenbergschen Rosette.

Im Bindegewebe als auch in der Milch sind neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen als zelluläre Abwehrfaktoren anzutreffen.

Die humoralen Faktoren bilden Immunglobuline, das Laktoperoxidase–Thiozyanat–Wasserstoffperoxid System (LPS), Laktoferrin und Lysozym (Heeschen et al., 1974; Wendt et al., 1994).

Die Bakterizidie der Milch kann nicht an einem bestimmten Faktor festgemacht werden sondern ist das Zusammenwirken verschiedener Mechanismen. So wurde einerseits das sekretorische Immunglobulin A als besonders wichtig erachtet (Heeschen et al., 1974), in anderen Arbeiten dagegen wurde die Eliminierung von Erregern durch neutrophile Granulozyten hervorgehoben

(Hill et al., 1978, Hill, 1981). In einer Untersuchung über die immunologischen Vorgänge der Milchdrüse im peripartalen Zeitraum wurde eine verminderte Phagozytoseleistung der polymorphkernigen Granulozyten und eine damit in Zusammenhang stehende höhere Mastitiswahrscheinlichkeit festgestellt (Cai et al., 1994).

In Arbeiten über Lysozym und Laktoferrin konnte deren synergistisches Zusammenwirken bzw. deren Zusammenhänge mit weiteren Abwehrfaktoren festgestellt werden (siehe Kapitel 2.2 und 2.3).

In anderen Arbeiten wurde ein nach intrazisternalen Infektionen auftretender Anstieg an Plasmazellen und spezifischen Antikörpern (AK) gefunden. Das Ausmaß des Anstiegs war aber bei den untersuchten Tieren sehr unterschiedlich, was auf einen genetischen Einfluss schließen lässt. Tiere mit hohen Antikörperspiegeln zeigten eine geringere Erkrankungsanfälligkeit an Mastitiden (Wagter et al., 1996; Mallard et al., 1997).

Neben den bereits erwähnten Abwehrfaktoren treten immunverstärkende Faktoren wie Cytokine (Interleukin 2 und Interferon), Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  sowie der Granulozyten–Makrophagen–Kolonie–Stimulationsfaktor auf, die die spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen verstärken (Mallard et al., 1998).

#### **2.1.4 Therapie**

Neben den unterstützenden therapeutischen Maßnahmen gilt die Behandlung mit Antibiotika als Mittel der Wahl zur Mastitistherapie.

Als unterstützende Maßnahmen gelten neben Abstellen auslösender und prädisponierender Faktoren wie z. B. Fehler in der Melktechnik v. a. das häufige gründliche Ausmelken des erkrankten Viertels. Physikalische Therapien wie das Berieseln des Euters mit kaltem Wasser und osmotische Therapien wie das Einbringen hypertoner Lösungen führen zu Vasokonstriktion, Anschwellen der Milchgangwände, Sekretverdünnung und Entzündungshemmung. Weiterhin unterstützend wirkt die Gabe von Vitamin A zur schnelleren Regeneration geschädigter Epithelien, sowie eine symptomatische Allgemeintherapie bei das Allgemeinbefinden beeinflussenden Mastitiden (Wendt et al., 1994).

Die Behandlung von Mastitiden erfolgt unter zwei Zielsetzungen:

1. Verkürzung der Erkrankungsdauer
2. Verringerung der Neuinfektionsrate.

Die Verkürzung der Dauer von Mastitiden beinhaltet die Therapie während der Laktation, während die Applikation von Antibiotika zur Verringerung der Neuinfektionsrate sich auf die



prophylaktische antibiotische Versorgung in der Trockenphase konzentriert. Klinische Mastitiden sind in jedem Falle mit Antibiotika zu behandeln, solange der klinische Befund des Eutergewebes eine Behandlung rechtfertigt (DVG, 1994).

Je kürzer das Zeitintervall zwischen dem Auftreten der Infektion und der Behandlung ist, umso höher sind die Erfolgchancen für die Mastitistherapie (Hamann, 1992).

Durch *Sc. agalactiae* ausgelöste Mastitiden können allein durch eine intrazisternale Applikation von Antibiotika erfolgreich behandelt werden. Eine Kombinationstherapie von systemischer und lokaler Applikation kann zu einer Erhöhung der Heilungsraten der anderen Kokkenmastitiden (insbesondere *S. aureus*) führen (Nickerson, 1993).

Vor Einleitung therapeutischer Maßnahmen ist neben der klinischen Untersuchung auch eine euterviertelbezogene zytologisch–mikrobiologische Untersuchung durchzuführen (DVG, 1994).

### 2.1.4.1 Oxacillin

Oxacillin ist ein halbsynthetisches Penicillin (Isoxazolympenicillin) und als solches zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehörig. Der Wirkmechanismus dieser Antibiotika beruht auf der Hemmung der Synthese von Murein. Murein ist ein Mukopeptid, das in bakterielle Zellwände eingebaut wird und ihnen Formbeständigkeit verleiht. Durch Hemmung der aktiven Transpeptidase durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wird die Quervernetzung innerhalb des Mureins verhindert und der Aufbau der bakteriellen Zellwand gestört.

Einer Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterien ist es möglich, Enzyme zu bilden, sogenannte  $\beta$ -Lactamasen, die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hydrolysieren können. Oxacillin ist ein lactamasestabiles Penicillin und als solches besitzt es besondere Bedeutung in der Mastitistherapie gegenüber  $\beta$ -lactamasebildenden Staphylokokken (Löscher et al., 1994).

Tabelle 3: Anteil resistenter *S. aureus* Stämme gegenüber Oxacillin (in %)

Literatur	Gebiet	Jahr	Resistenz %
Lotthammer und Klarmann 1999	Weser-Ems	1994	4,7
		1996	6,7
		1997	11,4
	Deutschland	1997	4,0
Bleckmann und Hoedemaker 1996	Niedersachsen	1990-1994	0
Trolldenier 1999	Deutschland	1997	4,0
Sobiraj et al. 1997	Deutschland	k. A.	10
Myllys et al. 1998	Finnland	1988	1,5
		1995	0
Lange und Bleckmann 1999	Niedersachsen	1990-1997	0

Ehinger und Kietzmann (1999) stellten in ihren Untersuchungen über die Gewebsverteilung von Oxacillin am perfundierten Rindereuter fest, dass sich die Konzentration von Oxacillin im Drüsengewebe mit zunehmender vertikaler Entfernung von der Zitze verringert. Es gab in Bezug auf das Verteilungsmuster keinen Unterschied zwischen Vorder- und Hinterviertel. Mit den meisten Formulierungen wurden im Drüsengewebe die minimalen Wirkstoffkonzentrationen für *in vitro* sensible Keime erreicht.

#### 2.1.4.2 Heilungsraten

Blood und Radostitis (1989) beschreiben für *S. aureus* Mastitiden bei Behandlung mit Cloxacillin (500 mg) eine Heilungsrate von 30-60 % und bei Behandlung mit Penicillin G 40–70 %. Die Heilungsrate von Mastitiden, die durch Streptokokken verursacht wurden, wird bei ihnen mit nahezu 100 % beschrieben. Morin et al. (1998) behandelten 172 Mastitiden mit Cephapirin. Sie erreichten damit eine klinische Heilungsrate von 59 % bezogen auf alle Mastitiden. Bei ausschließlicher Betrachtung der klinischen Heilungsrate von Streptokokken Mastitiden ergab sich eine Heilungsrate von 72 %. Guterbock et al. (1993) stellten in ihren

Arbeiten eine mittlere klinische Heilungsrate bezogen auf alle klinischen Mastitiden von 67 % fest. Dieses galt sowohl bei dreimaliger Behandlung mit 62,5 mg Amoxicillin (alle 12 Stunden) als auch bei zweimaliger Behandlung mit 200 mg Cephapirin (alle 12 Stunden). Die bakteriologischen Heilungsraten für Streptokokken betragen mit Amoxicillin 46,2 % und für Cephapirin 73,3 %.

Owens et al. (1997) erzielten bei Behandlung mit Albacillin<sup>®</sup>, einem Kombinationspräparat mit 100.000 U Procain-Penicillin und 150 mg Novobiocin, in ihrem Versuch eine bakteriologische Heilungsrate je nach Keim zwischen 40 und 90 % (*S.aureus* 35 %, *Sc. agalactiae*, *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis* 90 %, andere Streptokokken 77 %) bei der Untersuchung vier Wochen nach Behandlungsbeginn. Auch Wilson et al. (1998) berichten über vergleichbare Ergebnisse. Im Rahmen einer retrospektiven Auswertung ermittelten sie bei 273 klinischen Mastitiden mit unterschiedlichem Erregerbefund und unterschiedlicher Therapie eine durchschnittliche bakteriologische Heilungsrate von 70 %. Mit Cloxacillin wurde eine bakteriologische Heilungsrate von insgesamt 80 % (21 von 26 klinischen Mastitiden geheilt) erreicht. Wilson et al. (1972) untersuchten 321 klinische Mastitiden. Nach Behandlung mit Natrium-Cloxacillin erreichten sie eine bakteriologische Heilungsrate für *S. aureus* von 60 %, für *Sc. agalactiae* und *Sc. dysgalactiae* von nahezu 100 % und für andere Streptokokken zwischen 80 – 90 %.

In der Untersuchung von Sol et al. (2000) wurde bei fünf unterschiedlichen Behandlungsstrategien eine durchschnittliche bakteriologische Heilungsrate von *S. aureus* Mastitiden von 52 % 14 Tage nach der letzten Behandlung erzielt. Hierbei war die Heilungsrate für lactamasenegative Stämme höher (58 %) als für lactamasepositive Stämme (41 %). Durch eine Verlängerung der Therapie um zwei Tage (Behandlung alle 12 h) konnte die bakteriologische Heilungsrate signifikant von 44 % auf 67 % erhöht werden.

## **2.2 Laktoferrin**

### **2.2.1 Struktur und chemisch–physikalische Eigenschaften**

Laktoferrin ist ein einkettiges, basisches Glykoprotein, welches zwei Eisen– und zwei Bikarbonationen binden kann. Es besteht aus ca. 700 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 77.000 Dalton (Querinjean et al., 1971; Weiner und Szuchet, 1975). Das einkettige Glykoprotein besitzt zwei Ausbuchtungen, die die N – terminale und C – terminale Hälfte repräsentieren. Jede Hälfte ist aufgeteilt in zwei verschiedene Domänen (alpha und beta) in deren Zwischenraum sich die Eisenbindungsstelle befindet (Anderson et al., 1989).

### **2.2.2 Herkunft und Vorkommen**

Laktoferrin wird von den neutrophilen Granulozyten sowie vermutlich von Epithelzellen (Alveolarepithelien der Milchdrüse) synthetisiert (Masson et al., 1969; Harmon und Newbould, 1980; Persson et al., 1992).

Außer in der Milch wurde es noch in den meisten anderen Sekreten des Körpers wie Tränenflüssigkeit, Speichel, Nasen– und Bronchialsekret, Galle, Seminalplasma und Zervikalschleim nachgewiesen (Masson et al., 1966).

Die höchsten Laktoferrinkonzentrationen der Milch wurden im Trockenstehersekret (TSS) gefunden (Hurley, 1989; Rejman et al., 1989). Im Kolostrum lagen die Konzentrationen schon deutlich niedriger, verringerten sich in der reifen Milch nochmal auf etwa ein Viertel der Kolostrumwerte und behielten diese bis zum Ende der Laktation in etwa bei (Sanchez et al., 1988).

Tabelle 4: Laktoferrinkonzentrationen in Kuhmilch

Autor	Laktationsstadium	Konzentration	Maßeinheit
Hui (1993)		20-350	mg/l
Sanchez et al. (1988)	1 Tag p. p.	830	mg/l
	3 Wo.p. p.	90±30	mg/l
	Mastitis	1220±1190	mg/l
Wendt et al. (1994)	reife Kuhmilch	100–1000	mg/l
	Kolostralmilch	2000–5000	mg/l
	TSS	30.000	mg/l
Harmon et al. (1975)	reife Kuhmilch	350	mg/l
	Mastitis 1. Tag	550	mg/l
	Mastitis 3. Tag	1890	mg/l
Rejman et al. (1989)	letzte Melkung	820±350	mg/l
	30. Tag TSS	78.500±12.430	mg/l
Ye und Yoshida (1995)	1. Tag p. p.	495	mg/l
	2. Tag p. p.	256	mg/l
	4. Tag p. p.	104,1	mg/l
	8. Tag p. p.	51,8	mg/l
	reife Kuhmilch	36,2	mg/l
	akute Mastitis	300,2	mg/l

Wang und Hurley (1998) stellten fest, dass Laktoferrin im Trockenstehersekret hauptsächlich in Komplexen mit Casein oder Immunglobulinen vorlag. Bei ihren Untersuchungen lagen nach dem Trockenstellen etwa 97 % des Laktoferrins in Komplexen mit hohem Molekulargewicht (57 % in Komplexen mit Immunglobulinen, Rest hauptsächlich mit Casein) und nicht frei vor. Auch bildeten mehrere Laktoferrinmoleküle Komplexe untereinander, bei denen zusätzlich ein Immunglobulinmolekül mit eingelagert sein konnte. Die Bindung basiert vermutlich auf Ionenbindung (z. B. zum Casein und Immunglobulin) und hydrophoben Wechselwirkungen (z.

B. zum Lysozym). Die Funktion dieser Komplexe ist noch unklar. Eine Modulation der antibakteriellen Wirkung des Laktoferrins wird vermutet.

Die Laktoferrinkonzentration in der Milch ist signifikant korreliert mit Zellzahl, Konzentration von bovinem Serumalbumin (BSA), Laktationsstadium und Milchleistung (Harmon et al., 1975). Meyer et al. (1988) bestätigten das und fanden zudem signifikante Zusammenhänge zu Jahreszeit und Laktationsnummer. Mit steigender Milchleistung nahm die Konzentration an Laktoferrin ab. Bei Mastitis stieg die Konzentration im Mittel von 0,55 mg/ml an Tag 1 der Infektion auf 1,89 mg/ml an Tag 3 an. Dabei war der Anstieg bei Infektionen mit coliformen Keimen nahezu doppelt so hoch wie bei Infektionen mit grampositiven Keimen. Nicht infizierte Viertel blieben bei Infektionen mit grampositiven Keimen unverändert. Bei Colimastitiden wurde ein leichter Anstieg in den Kontrollvierteln festgestellt (Harmon et al., 1975). Der Anstieg der Laktoferrinkonzentration war weder auf eine Konzentrationserhöhung durch Milchreduzierung noch auf das Einwandern von Leukozyten in die Milchdrüse zurückzuführen. Als Quelle für die massive Laktoferrinerhöhung wurde das Drüsenepithel oder die Bereitstellung des Laktoferrins aus Komplexen angesehen (Harmon et al., 1976; Harmon und Newbould, 1980; Wang und Hurley, 1998).

Weiterhin ist bei Milchproben mit einem erhöhten Zellgehalt die Laktoferrinkonzentration abhängig von der Melkfraktion. So war bei Milchproben mit einer Zellzahl von über 200.000/ml die Laktoferrinkonzentration im Vorgemelk (746 µg/ml) signifikant höher als in der ersten Fraktion (bis 20% des Gesamtgemelks) (415 µg/ml). Die Variationskoeffizienten für die Laktoferrinkonzentration waren mit 47 % und 90 % höher als bei den Milchproben mit einer Zellzahl unter 200.000/ml. In gesunden Eutervierteln bestand kein Unterschied in den Laktoferrinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen (Meyer und Senft, 1979).

### **2.2.3 Wirkungsweise und Wirkungsspektrum**

Die Wirkung des Laktoferrins auf verschiedene Keime wurde in mehreren Arbeiten untersucht. Dabei war das Laktoferrin gegen die meisten grampositiven und gramnegativen Bakterien wirksam (Bishop et al., 1976; Arnold et al., 1980; Bellamy et al., 1992). Gramnegative Keime zeigten sich empfindlicher gegen Laktoferrin als Grampositive (Nonnecke und Smith, 1984). Lange Zeit wurde dem Laktoferrin eine ausschließlich bakteriostatische Wirkung zugeschrieben. Das Eisen steht den Bakterien nicht zur Verfügung durch Bindung an ein Laktoferrinmolekül. Dadurch werden sie in ihrem Wachstum gehemmt (Masson et al., 1966; Bullen et al., 1978; Finkelstein et al., 1983). Die Wirkung der Bakteriostase war in Mastitismilch höher als in

unveränderter reifer Milch. Dabei wurde ein Zusammenhang mit den bei Euterentzündungen freiwerdenden Bikarbonationen festgestellt (Rainard, 1987; Ellison et al. 1988).

Zusätzlich zu der bakteriostatischen Wirkung wurde schon in den siebziger Jahren eine bakterizide Wirkung vermutet (Arnold et al., 1977). Sie ist durch mehrere Arbeiten bestätigt worden. Laktoferrin bindet dabei an die Zellmembran der Bakterien. Durch die Chelatwirkung des Laktoferrins werden stabilisierende Kationen aus der Membran gelöst und Lipopolysaccharide freigesetzt. Es kommt zu einer Zerstörung der Zellmembran des Bakteriums, die durch synergistisches Zusammenwirken mit z. B. Lysozym oder Cefotaxime noch verstärkt werden kann (Ellison et al., 1988; Ellison et al., 1990a; Ellison et al., 1990b; Ellison und Giehl, 1991; Yamauchi et al., 1993). Die Verstärkung der bakteriziden Wirkung des Laktoferrins durch Lysozym konnte durch Dionysius et al. (1993) nicht bestätigt werden. Sie stellten fest, dass die bakterizide Wirkung des Laktoferrins abhängig ist von der Dosis des Laktoferrins, von Subtypen der Bakterien und der Keimmenge.

Für diese bakterizide Wirkung des Laktoferrins ist das Laktoferricin B verantwortlich.

Laktoferricin B wurde als aktives Peptid aus Laktoferrin in mehreren Untersuchungen isoliert. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl Laktoferrin als auch Laktoferricin B bakterizid gegenüber verschiedenen Keimen wirkten. Die Wirkung des isolierten Laktoferricin B war jedoch deutlich höher (Yamauchi et al., 1993; Dionysius und Milne, 1997). Tomita et al. (1991) stellten eine achtfach höhere Aktivität des Laktoferricin B gegenüber Laktoferrin fest. Weiterhin wurde auch eine Wirkung des Laktoferricin B gegen *Candida albicans* festgestellt (Tomita et al., 1991; Bellamy et al., 1992; Jones et al., 1994).

In vivo wird Laktoferricin B aus Laktoferrin in der Milchdrüse durch proteolytische Enzyme freigesetzt. Diese Enzyme reichern sich verstärkt während des Trockenstehens an. Aslam und Hurley (1997) begründeten so eine erhöhte Schutzwirkung in dieser Zeit.

Sowohl die bakteriostatische und bakterizide Wirkung des Laktoferrins als auch die bakterizide Wirkung des isolierten Laktoferricins B wird durch Zugabe von Eisenionen und anderer zweiwertiger Kationen gehemmt (Anderson et al., 1990; Bellamy et al., 1992; Yamauchi et al., 1993). Verstärkt werden konnte die Wirkung durch Zugabe von Bikarbonationen (Ellison et al., 1988). Jones et al. (1994) stellten für Laktoferricin B eine Aktivitätsreduzierung in vitro durch einen sauren pH-Wert, Zugabe wechselnder Ionenkonzentrationen, von Kuhmilch, Muzin oder bovinem Serumalbumin (BSA) sowie durch hohe Keimkonzentrationen fest.

#### 2.2.4 Nachweis des Laktoferrins

Immunochemische Nachweise gelten als sichere Methoden zur Bestimmung von Proteinen und anderen Komponenten mit antigenen Eigenschaften. Ihre Entwicklung ist jedoch aufwändig und teuer, was vor allem die Produktion von entsprechenden Antikörpern betrifft. Der von Meisel (1990) entwickelte ELISA besitzt eine hohe Empfindlichkeit und erlaubt eine Laktoferrinbestimmung im Konzentrationsbereich von 5-4000 ng/ml. Andere Nachweismethoden umfassen die radiale Immunodiffusion in Agarosegel oder die Elektroimmunodiffusion. Beide Methoden weisen jedoch nicht eine so hohe Empfindlichkeit auf und sind sehr arbeitsaufwändig.

Für den ELISA eignen sich am besten mit Polyethylenphthalat-Glykol beschichtete Platten, da sie die höchste Bindung und niedrigste Hintergrundaktivität aufweisen. Die Ultrazentrifugation der Milch zur Molkeaufbereitung erwies sich einfacher als die Säurebehandlung. Allerdings lagen die Laktoferrinkonzentrationen dadurch 10-40 % niedriger. Bei der Verwendung von Borosilikatglasröhrchen kann es zur Laktoferrinabsorption kommen, daher sind Polypropylenröhrchen zu benutzen. Die Lösungen und Puffer müssen Raumtemperatur haben, da Temperaturschwankungen störend wirken können. Die Lagerung der Proben bis zur Untersuchung kann bei  $-25^{\circ}\text{C}$  erfolgen (Harmon et al., 1975; Sanchez et al., 1988; Desmazeaud, 1993; Wang und Hurley, 1998).



## 2.3 Lysozym

### 2.3.1 Struktur und chemisch–physikalische Eigenschaften

Beim Lysozym handelt es sich um eine basische, kationische Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 15.000 Dalton. Mittels verschiedener Isolierungs- und Reinigungsverfahren konnten strukturelle Unterschiede zwischen Lysozymen verschiedener Spezies nachgewiesen werden. Die biologisch aktiven Aminosäuresequenzen waren aber identisch (Jolles, 1964; Blake et al., 1965; Eitenmiller et al., 1976).

Ito et al. (1993) kamen in ihrer Untersuchung zu dem Ergebnis, dass das Rind mindestens drei verschiedene Lysozyme besitzt, die sie aufgrund ihrer Unterschiede nach ihrem Vorkommen in Magen-, Milch- und Nierenlysozym unterteilten. In anderen Arbeiten wurden hauptsächlich zwei Gruppen von Lysozym unterschieden, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit entweder dem „goose-type“ (isoliert aus Gänseeiweiß) oder dem „chicken-type“ (isoliert aus Hühnereiweiß) zugeordnet wurden. Die verschiedenen Lysozyme unterschieden sich u. a. in ihrer Aminosäuresequenz, dem Molekulargewicht und ihrem Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (Arnheim et al., 1973; Attassi und Habeeb, 1977; Dobson et al., 1984; Jolles und Jolles, 1984; Ito et al., 1993).

Beim Lysozym aus der Kuhmilch handelt es sich um eine Polypeptidkette, bestehend aus 154 Aminosäuren, deren Faltung durch vier Disulfidbrücken der acht Cysteinreste aufrechterhalten wird (Jolles, 1964; Blake et al., 1965; Eitenmiller et al., 1976).

Jolles (1964) bezeichnete Proteine mit folgenden Eigenschaften als Lysozym:

- basisches Protein,
- ein geringes Molekulargewicht von etwa 15.000 Dalton,
- thermostabil in sauren Medien,
- thermolabil in alkalischen Medien,
- Lysis einer *Micrococcus lysodeikticus* Suspension und
- Freisetzen von Bruchstücken bei der Bakteriolyse, die mit Reagenzien für reduzierende Zucker und Aminosucker reagieren und sich von Glucosamin- oder Muraminsäure ableiten.

Diese Eigenschaften wurden auch von Lie und Syed (1986) bestätigt.

### 2.3.2 Herkunft und Vorkommen

Lysozym wurde in Speichel, Nasensekret, Tränenflüssigkeit, Cervikalschleim, Blutserum, Milch, Liquor cerebrospinalis, Lunge, Milz, Niere, Magen, Plazenta und Knochen gefunden (Bügener, 1982; Dobson et al., 1984; Müller et al., 1990; Ito et al., 1993).

Es wurde bei vielen Spezies in der Milch nachgewiesen, allerdings in sehr unterschiedlichen Konzentrationen. Die Milch des Menschen, des Pferdes und der Katze besitzt eine außergewöhnlich hohe Lysozymaktivität, während die Lysozymaktivität in der Milch von Rindern, Schweinen und Kamelen um ein vielfaches niedriger ist. Eine Übersicht dazu geben Hatzipanagiotou et al. (1998).

Als Produktionsort des Lysozyms im Organismus werden in erster Linie Leukozyten und Gewebszellen angesehen (Cohn und Wiener, 1963; Gordon et al. 1974; Götze et al., 1977; Degorski und Lechowski 1982; Müller et al., 1990; Pellegrini et al., 1991; Steinhoff et al., 1994). Leukozyten scheinen auch die Hauptquelle des Lysozyms in der Milch bei Euterinfektionen zu sein (Persson et al., 1992). Andererseits behaupteten andere Autoren in Rinderleukozyten sei kein Lysozym enthalten (Padgett und Hirsch, 1967; Reinhold, 1975). Hiermit begründeten sie den niedrigen Lysozymgehalt in der Kuhmilch.

Tabelle 5: Konzentrationen von Lysozym in der Milch verschiedener Spezies

Autor	Spezies	Laktationsstadium bzw. Gesundheitsstatus	Lysozym $\mu\text{g/ml}$
Wendt et al. (1994)	Kuh	reife Milch	0,1-1
		Kolostralmilch	6-40
Fox (1992)	Kuh		<3
Hui (1993)	Kuh		0,13
McKenzie und White (1986)	Kuh	alle Stadien	0-1,12
Farid et al. (1984)	Kuh	unveränderte Milch	0-55
		subklin. Mastitis	100-255
		klin. Mastitis	250-850
Radwan und Elmarimi (1987)	Kuh	unveränderte Milch	0-50
		subklin. Mastitis	100-450
		klin. Mastitis	450-750
Shahani et al. (1962)	Kuh		0,07–0,27
Goudswaard et al. (1978)	Kuh	reife Milch	Spuren-3,6
		Kolostralmilch	~3,6
		klin. Mastitis	3,6-4,5
Carlsson et al. (1989)	Kuh	reife Milch	0–0,055
		klin. Mastitis	0,7–2,74
Lunau (1991)	Färsen	Eutersekret	4-340
		Eutersekret	Ø 63,9
Hatzipanagiotou et al., (1998)	Pferd	reife Milch	0,51
Fox (1992)	Pferd		bis 790
Farid et al. (1984)	Büffel	unveränderte Milch	0-100
		subklin. Mastitis	250-850
		klin. Mastitis	505-1000

Es bestehen signifikante Unterschiede in den Konzentrationen von Lysozym in der Milch zwischen verschiedenen Milchviehrassen (Shahani et al., 1962; Meyer und Senft, 1979; Senft et al., 1981; Lie et al., 1986b), wobei ein Heretabilitätskoeffizient von  $h^2 = 0,13$  ermittelt wurde (Meyer et al., 1981).

Tabelle 6: Konzentrationen von Lysozym in der Milch verschiedener Rinderrassen mit einer Zellzahl  $< 500.000/\text{ml}$  Milch (Meyer et al., 1981)

Rasse	Laktationsstadium Tage	Konzentration von Lysozym $\mu\text{g/ml}$
Schwarzbunt	156	0,18
Rotbunt	170	0,20
Jersey	179	0,45
Rotvieh	142	0,34
Fleckvieh	163	0,18

Bei Abwesenheit von Lysozym wurden saprophytäre Staphylokokken, die im gesunden Euter vorkommen, virulent. Bei hohen Konzentrationen von Lysozym in der Milch kam es trotz des Vorkommens von pathogenen Keimen nicht zu einer Erkrankung des Euters (Grün, 1985). Wie Infektionsversuche mit *S. aureus* zeigten, übt die Konzentration von Lysozym in der Milch vor der Infektion einen hemmenden Einfluss auf dessen Vermehrung aus. So besaß Milch mit einem hohem Anfangsgehalt an Lysozym trotz einer Zellzahl von unter  $250.000/\text{ml}$  nach der Infektion eine geringere Keimzahl als Milch mit einem niedrigeren Anfangsgehalt an Lysozym (Erhardt et al., 1981; Meyer et al., 1981).

Ein Anstieg des Keimgehaltes führte bei einigen Untersuchungen zu einer Zunahme des Lysozymgehaltes in der Milch von Kuh, Büffel und Ziege (Götze et al., 1977; Farid et al., 1984; Radwan und Elmarimi, 1987). Dagegen stellte Reinhold (1975) bei einem hohen Keimgehalt der Milch eine schnelle Abnahme des Lysozymgehaltes fest. Dies erklärte er durch eine Bindung des Lysozyms an Bakterien und eine daraus folgende Aktivitätsreduzierung. Müller (1972) konnte durch künstliche Euterinfektionen mit Streptokokken den Gehalt an Lysozym nicht beeinflussen. Über die Beziehung zwischen Lysozym und Zellgehalt der Milch sind die Angaben unterschiedlich. Während zahlreiche Autoren eine positive Beziehung zwischen Lysozym und Zellgehalt in der Kuhmilch fanden (Korhonen, 1973; Götze et al., 1977; Goudswaard et al.,

1978; Meyer et al., 1988; Perrson et al., 1992), konnte dieses von anderen Autoren nicht bestätigt werden (Weaver und Kroger, 1978; Zörkler et al., 1982).

Ein weiterer Einflussfaktor auf den Lysozymgehalt der Milch ist das Laktationsstadium (Meyer et al., 1988). Die Lysozymkonzentration stieg mit zunehmender Dauer der Laktation bis etwa zur 13. Woche p. p. (Götze et al., 1977) bzw. kontinuierlich vom 10. bis 300. Laktationstag (Senft et al., 1981) an.

Hinsichtlich des Einflusses des Alters der Tiere und der Euterviertel differieren die Beobachtungen im einschlägigen Schrifttum. Meyer und Senft (1979) konnten keine Unterschiede in den Konzentrationen an Lysozym-, Laktoferrin- und BSA gesunder Euterviertel feststellen. Dagegen bestand in der Arbeit von Meyer et al. (1988) ein hochsignifikanter Einfluss der Euterviertel. Gleichzeitig stellten sie einen signifikanten Abfall der Lysozymkonzentrationen mit zunehmender Milchleistung fest. Weiterhin hatte in ihren Untersuchungen das Alter und die Laktationsnummer einen signifikanten Einfluss auf den Lysozymgehalt. Das wurde in den Untersuchungen von Götze et al. (1977) nicht festgestellt, obwohl in ihrer Arbeit Färsen eine niedrigere Lysozymkonzentration zeigten als Kühe.

Keine Korrelation besteht zwischen dem Lysozymgehalt im Blut und in der Milch (Götze et al., 1977).

Die Trächtigkeit verursacht keine Unterschiede im Lysozymgehalt der Milch (Senft et al., 1981).

### 2.3.3 Wirkungsweise und Wirkungsspektrum

Lysozym ist ein wichtiger humoraler Faktor des unspezifischen Abwehrsystems. Es wird unter der Enzym-Nomenklatur-Nr. E. C. 3.2.1.17. registriert. Es katalysiert die hydrolytische Spaltung von  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen der N-Acetylaminopolysaccharide (N-Acetylmuraminsäure, N-Acetylglucosamin). Dabei wird das Substrat mittels Wasserstoffbrücken im Spalt zwischen den beiden Teilen der Peptidkette des Lysozyms gebunden und nach Konfigurationsänderung hydrolytisch gespalten. Dadurch kommt es bei Bakterien zur Zerstörung ihrer Zellwand (Phillips, 1966; Blake et al., 1967). Die bakteriolytische Wirkung erstreckt sich hauptsächlich auf grampositive Bakterien, da das spezifische Substrat des Lysozyms Hauptbestandteil (Mureinanteil 10 – 50 %) der Zellwände dieser Bakterien ist (Götze, 1977). Eine Ausnahme bildet *S. aureus*, der sich gegenüber der Lyse durch Lysozym nahezu resistent zeigte (Grossgebauer et al., 1968; Götze, 1977; Pellegrini et al., 1991).

Bei gramnegativen Erregern bilden oberflächliche Lipoprotein-Lipopolysaccharidschichten eine Permeabilitätsbarriere, wodurch diese Bakterien unter natürlichen Bedingungen resistent

gegenüber der Lyse durch Lysozym sind (Leive, 1974). Erst durch Vorbehandlung mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA), NaCl, spezifischen Antikörpern oder Komplement, die zu einer Auflösung der Lipoprotein-Lipopolysaccharidschichten führen, kann Lysozym an die tieferen, Mukopolysaccharide enthaltenden Schichten gelangen und eine Bakteriolyse bewirken (Vakil et al., 1969). In vivo wird durch Antikörper und Komplement die äußere Schicht der Zellwand gramnegativer Bakterien zerstört. In der Folge kann Lysozym seine lytische Wirkung an der Mukopeptidschicht entfalten (Glynn und Milne, 1967; Glynn, 1969; Großgebauer und Langmaack, 1968; Donaldson et al., 1974).

In Untersuchungen von Hill und Porter (1974) waren nur Komplement, Lysozym und IgA zusammen in der Lage *E. coli* zu lysieren. Nach neueren Untersuchungen ist Lysozym auch alleine gegen gramnegativer Keime wirksam (Pellegrini et al., 1991).

Weiterhin wurde in Untersuchungen festgestellt, dass Laktoferrin und Transferrin die Zellmembran gramnegativer Bakterien schädigen und im synergistischen Zusammenwirken mit Lysozym gramnegative Bakterien zerstören können (Ellison et al., 1988; Ellison et al., 1990a; Ellison et al., 1990b; Ellison und Giehl, 1991). Für das Lysozym des Pferdes ist von Pellegrini et al. (1991) eine hemmende Wirkung u.a. auf das Wachstum von *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Bordetella bronchiseptica* festgestellt worden.

Auch ein erhöhter O – Acetylierungsgrad der Glykanstränge im Mureingerüst (Mangel an N – Acetylgruppen), das Vorhandensein anderer als  $\beta$ -1,4 – glykosidischer Bindungen oder ein erhöhter Vernetzungsgrad der Peptidoglykanstruktur durch Querverbindungen führen zu einer natürlichen Resistenz von Bakterien gegenüber Lysozym (Strominger und Tipper, 1974; Zipperle und John, 1984; Johanssen, 1986).

Neben dem direkten enzymatischen Effekt besitzt das Lysozym auch noch einen indirekten Effekt. Durch die Spaltung von Peptidoglykanen in der Bakterienzellwand werden Muramyldipeptide gebildet, die als Immunstimulantien oder Adjuvantien wirken können. Sie fördern die Aktivität von Immunzellen und die Bildung von sIgA (Jolles, 1976). Weiterhin besitzt das Lysozym eine kationische Wirkung. Als positiv geladenes und kleines Protein kann Lysozym viele der negativ geladenen Gruppen der Membranen von Bakterien-, Epithel- und Blutzellen neutralisieren. Hierdurch nehmen die abstoßenden Kräfte zwischen den Zellen ab, wodurch die Phagozytose oder Adhäsion von Immunzellen stimuliert werden (Glynn und Parkman, 1964; Klockars und Roberts, 1976; Ekstrand, 1989). Lysozym wirkt modulierend, indem es die Chemotaxis und die Bildung der Sauerstoffradikale von stimulierten neutrophilen Granulozyten hemmt (Gordon et al., 1979). Neben der Stimulation der Phagozytose fördert Lysozym die Wundheilung und Regression von degenerativen und nekrotischen Prozessen

(Klockars und Roberts, 1976). Es bewirkt weiterhin eine Verminderung der Mastzelldegranulation mit nachfolgender Reduktion der Histaminausschüttung und somit der Ödembildung (Verhamme et al., 1988). Bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien bindet Lysozym über hydrophobe Wechselwirkungen an die Lipopolysaccharide dieser Bakterien. Hierdurch wird die Wirkung der Endotoxine sowie die enzymatische Aktivität des Lysozyms vermindert (Ohno und Morrison, 1988).

Lysozym zeigt auch ausgeprägte antivirale und fungizide Effekte (Cisiani et al., 1981; Marquis et al., 1982; Jolles und Jolles, 1984; Ganz et al., 1990) sowie eine Wirkung gegen Bakteriensporen (Götze, 1977).

### 2.3.4 Nachweis von Lysozym

Der Nachweis des Lysozyms durch die sogenannte Lysoplate – Technik basiert auf der Lyse des im Agargel suspendierten Bakteriums *Micrococcus lysodeicticus*. Dieser Keim gilt als besonders empfindlich hinsichtlich der Lyse durch Lysozym (Fleming, 1922, Stelzner et al., 1982). Er wurde in verschiedenen Nachweisverfahren zur Lysozymbestimmung genutzt (Goldbach und Herzog, 1962; Ossermann und Lawlor, 1966; Götze et al., 1977; Dobson et al., 1984; Farid et al., 1984; Lie et al., 1986a,b; Lunau, 1991; Hatzipanagiotou et al., 1998).

Bei dieser Methode erfolgt die Berechnung der Konzentration von Lysozym in dem zu untersuchenden Medium unter Verwendung einer auf jeder Platte mitgeführten Eichreihe anhand der Grösse der radialen Lysishöfe. Deren Durchmesser und Schärfe verhalten sich proportional zum Logarithmus der Lysozymkonzentration (Goldbach und Herzog, 1962; Ossermann und Lawlor, 1966). Als optimale Bedingung für die Lyse durch Lysozym wird eine Temperatur von 45°C und ein pH-Wert von 6 bis 7 bei einer Salzkonzentration von 0,5 bis 1% angegeben (Schumacher, 1958).

Die Lagerung der zu untersuchenden Milchproben kann bei –20°C erfolgen, wobei nach 14 Tagen kein Aktivitätsverlust des Lysozyms nachweisbar war. Mehrmaliges Auftauen und erneutes Wiedereinfrieren führte jedoch zum signifikanten Abfall der Lysozymaktivität (Neumeister, 1989; Hatzipanagiotou et al., 1998).

## **2.4 Laktoperoxidase–Thiozyanat–Hydrogenperoxid–System (LPS)**

### **2.4.1 Struktur und chemisch–physikalische Eigenschaften**

Die Laktoperoxidase (POD) stellt ein aus zwei Untereinheiten bestehendes basisches Glykoprotein dar mit einem Molekulargewicht von 77.000 Dalton. Es besteht aus einer Polypeptidkette mit 612 Aminosäureresten und einer hämoprosthetischen Gruppe (Groves, 1971; Dull et al., 1990; Cals et al., 1991), deren Struktur heute weitestgehend bestimmt ist (Rae und Goff, 1998). POD ist ein thermostabiles Enzym mit der höchsten Aktivität im sauren Bereich (Reiter et al., 1976). Durch Pasteurisation konnte die Laktoperoxidase nicht gänzlich inaktiviert werden. Bei Temperaturen über 80°C wurde die Laktoperoxidaseaktivität jedoch vollständig zerstört (Korhonen, 1980; Hui, 1993). Sie zeigte sich resistent gegenüber niedrigem pH und Proteolyse (Reiter und Härnolv, 1982).

### **2.4.2 Herkunft und Vorkommen**

Die Laktoperoxidase ist das Enzym mit dem höchsten Gehalt in der Kuhmilch. Es umfasst 1 % der gesamten Proteine des Milchserums (Molke), worin es sich in gelöster (freier) Form befindet (Grün, 1984a). Weiterhin ist Laktoperoxidase auch in anderen Sekreten des Körpers wie Speichel, Tränenflüssigkeit, Vaginalsehleim sowie in der Schilddrüse und den eosinophilen Granulozyten nachgewiesen worden (Reiter und Härnolv, 1982).

Die ermittelten Konzentrationen der Laktoperoxidase bzw. Aktivitäten des Laktoperoxidase–Thiozyanat–Hydrogenperoxid Systems (LPS) der Kuhmilch weisen erhebliche Schwankungen auf, wie aus der Zusammenstellung in Tabelle 7 sowie bei Vobis et al., (1995) ersichtlich ist. Es ist jedoch schwierig, die bestehenden Ergebnisse miteinander zu vergleichen, da keine Standards hinsichtlich Laktoperoxidaseeinheiten definiert sind (Björck und Mullan, 1993).



Tabelle 7: Konzentrationen bzw. Aktivitäten von Laktoperoxidase in Kuhmilch

Autor	Laktationsstadium	Menge	Maßeinheit
Hui (1993)	reife Milch	10-30	mg/l
Wendt et al. (1994)		800-3500	Units/l
		2-150	mg/l
	>3 p. p.	2-35	mg/l
Björck (1992)	Kuhmilch	30	mg/l
Ye und Yoshida (1995)	2. Tag p. p.	46,9	Units/l
	4. Tag p. p.	314,1	Units/l
	8. Tag p. p.	498,1	Units/l
	reife Milch	141,4-804,8	Units/l
Brown und Mickelson (1979)	1 Woche a. p.	2200-8000	Units/l
	Abkalbung	1100-2900	Units/l
	1 Woche p. p.	3600–5500	Units/l
Reiter et al. (1976)	reife Milch	750-3000	Units/l

Die weite Schwankungsbreite resultiert aus jahreszeitlichen, fütterungsbedingten und rasseabhängigen Einflüssen. Im Sommer war die Laktoperoxidasekonzentration 25 % höher als im Winter. Die Umstellung von Mais– auf Rübenfütterung führte zu einer 20 % Abnahme, der Übergang von Rüben– zu Maisfütterung zur Zunahme des Gehaltes. Rotbuntes Niederungsvieh hatte unter gleichen Haltungsbedingungen einen fast doppelt so hohen Enzymgehalt in der Milch wie Höhenfleckvieh. Fettgehalt und Säuregrad der Milch sowie die Milchleistung waren von geringerer, das Laktationsstadium dagegen von größerer Bedeutung (Kiermeier und Kaiser, 1960; Wüthrich et al., 1964; Brown und Mickelson, 1979; Korhonen, 1980).

Nach dem Trockenstellen stieg der Enzymgehalt deutlich an und erreichte 7 bis 14 Tage nach dem letzten Melken ein Maximum. Im Trockenstehersekret lag die Konzentration von POD stets höher als in der Milch am Ende der Laktation. Zur Abkalbung reduzierte sich der Gehalt deutlich auf die Hälfte bis auf ein Fünftel, stieg dann steil an und erreichte sein Maximum am 3. bis 5. Tag post partum. Anschließend verringerte sich die Laktoperoxidasekonzentration und erreichte

innerhalb von ein bis zwei Wochen den Enzymgehalt reifer Milch. Dabei waren jedoch erhebliche tägliche Schwankungen zu beobachten (Grün, 1984a).

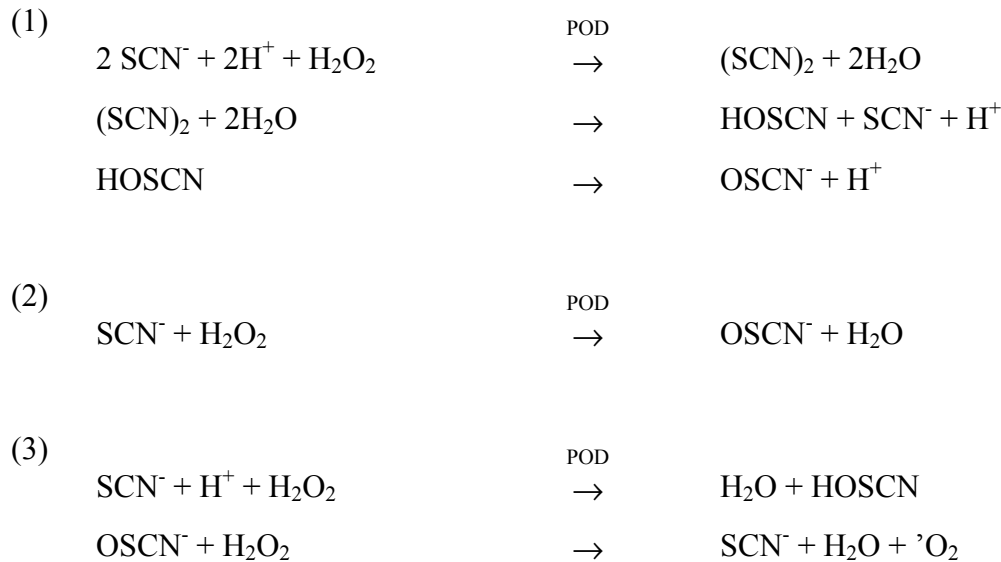
Das in der Milch vorkommende Thiozyanat ( $\text{SCN}^-$ ) stammt aus dem Blut, in dem es in zehnfach höherer Konzentration vorkommt. Auch der Thiozyanatgehalt der Kuhmilch weist erhebliche Schwankungen auf. Reife Milch aus der gesunden Milchdrüse enthielt zwischen 0,01–0,5 mmol/l Thiozyanat (Grün, 1984a). Die weite Schwankungsbreite ist hauptsächlich durch die Fütterung bedingt, da zahlreiche Pflanzen Vorstufen des  $\text{SCN}^-$  enthalten. Thiozyanat kann z.B. als Entgiftungsprodukt aus Zyanid entstehen, welches im Klee enthalten ist. Ebenso entsteht es durch enzymatische Hydrolyse von Glukosiden, die reichlich in Brassicaarten vorkommen. Aus den Glukosiden wird unter dem Einfluss der Thiosulfat-S-Transferase  $\text{SCN}^-$  gebildet, welches dann aus dem Blut in die Milch übertritt (Virtanen, 1961). Im Winter betrug der Thiozyanatgehalt der Milch ein Zehntel des Gehaltes bei Weidehaltung in den Sommermonaten (Boulangé, 1959).

Die bovine Milchdrüse kann kein Thiozyanat speichern. Die tatsächliche Ionenkonzentration ist eine Funktion der Nierenleistung und der Milchleistung der Kuh (Bibi und Bachmann, 1997).

### 2.4.3 Wirkungsweise und Wirkungsspektrum

Das Enzym Laktoperoxidase bildet mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  einen Komplex und oxidiert  $\text{SCN}^-$ , wobei ein kurzlebige intermediäres Oxidationsprodukt entsteht, welches bei 235 nm Licht absorbiert. Diese chemische Verbindung mit Hemmwirkung auf Bakterien wurde als Hypothiozyanat ( $\text{OSCN}^-$ ) identifiziert (Hoogendorn et al., 1977). Bestätigt wurde dieses von Thomas und Aune (1978). In ihrer Untersuchung stellten sie einen direkten Zusammenhang der antimikrobiellen Aktivität des LPS gegen *E. coli* in Form einer Oxidation bakterieller Sulfhydrylgruppen fest. Als Oxidans fungierte Hypothiozyanat, welches durch die Oxidation von Thiozyanat mit Hilfe der Laktoperoxidase und Hydrogenperoxid entsteht.

Folgende Reaktionswege wurden postuliert, wonach eine indirekte Bildung über Schwefeldizyanid (Reaktion 1) oder eine direkte Entstehung (Reaktion 2) möglich sind (Reiter, 1978a, b; Korhonen, 1980):



Björck und Claesson (1980) stellten in ihren Untersuchungen über die Wirkung des LPS auf *E. coli* fest, dass neben dem Hypothiozyanat als hauptsächlichem antibakteriellem Metaboliten weitere Oxidationsstufen des Thiozyanats für die antibakterielle Wirkung gegenüber *E. coli* verantwortlich waren. Hierbei handelte es sich um „cyanosulfurous acid“ und „cyanosulfuric acid“.

Da nach Kontakt von Bakterien mit dem LPS kein Eintritt von markiertem  $\text{SCN}^-$  in die Zelle festzustellen war, wird angenommen, dass die Hemmwirkung von  $\text{OSCN}^-$  indirekt entweder über die Bildung des Singulett- $\text{O}_2$  ( $\text{}^1\text{O}_2$ ) (gemäss Reaktion 3) oder nach Entstehung des Superoxid-Radikals ( $\text{O}_2^-$ ) unter Beteiligung NADH-abhängiger Systeme zustande kommt. Durch die starken Oxidationsmittel wird eine Schädigung vitaler Enzyme bewirkt, welche SH-Gruppen enthalten. Hieraus resultiert wiederum eine sofortige Hemmung der Zellatmung und anderer Stoffwechselprozesse, wie z.B. der Aufnahme von Aminosäuren und Glukose in die Zelle und der Proteinsynthese. In Abhängigkeit von der Bakterienart kommt es damit zeitweilig zu einer Wachstumshemmung (bakteriostatischer Effekt) oder zum Zelluntergang (bakterizider Effekt) (Reiter, 1978a, b; Korhonen, 1980). Die Bakterienart alleine ist allerdings nicht ausschlaggebend für den jeweiligen Effekt. Auch die Mengen bzw. das Verhältnis der drei Komponenten des Systems zueinander und auf das LPS einwirkende hemmende bzw. fördernde Einflüsse sind von Bedeutung.

Die für die antibakterielle Wirkung des LPS erforderliche Mindestmenge der Laktoperoxidase liegt bei 0,5 bis 1 mg/l. Die POD ist damit in der reifen Milch in beträchtlichem Überschuss enthalten. Damit werden Thiozyanat und  $H_2O_2$  zu den begrenzenden Faktoren. Der antibakterielle Effekt ist proportional zur Thiozyanatkonzentration, wobei die maximale Wirkung bei äquimolaren Mengen von Thiozyanat und  $H_2O_2$  eintritt (Reiter et al., 1976). Bei äquimolarem Verhältnis der beiden Substanzen wird eine maximale Bildung des inhibitorischen Zwischenproduktes über einen weiten Bereich der Thiozyanatkonzentration (0,19–1,49 mmol/l) erzielt. Der Thiozyanatgehalt der Milch schwankt jedoch beträchtlich, wobei unter 0,015 mmol/l (ca. 1 mg/l) kein antibakterieller Effekt, bei Konzentrationen von 0,2 bis 0,25 mmol/l eine starke bakterizide Wirkung festzustellen war (Björck, 1978; Grün, 1984a). Diese Konzentration liegt in dem Bereich, der von einigen Autoren in reifer Milch festgestellt wurde (Boulangue, 1959; Korhonen, 1973).

Abweichungen von den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen schränken die Wirksamkeit des LPS ein. So wirkt Katalase der Laktoperoxidase entgegen, da sie  $H_2O_2$  abbaut. Bei normalem Enzymgehalt der Milch trat keine Interferenz auf, sondern POD überwog aufgrund höherer Substrataffinität. Bei Eutererkrankungen, bei denen der POD-Gehalt unverändert bleibt, die Katalaseaktivität aber ansteigt, könnte die Wirksamkeit des LPS damit eingeschränkt werden. Dies war jedoch erst bei einer so hohen Katalaseaktivität der Fall, die selbst in Milch mit erhöhtem Zellgehalt nicht erreicht wurde (Reiter et al., 1976; Björck, 1978). Brown und Mickelson (1979) fanden heraus, dass freies Cystin dem LPS entgegen wirkt. Der Gehalt an freiem Cystin war mit einem mittleren Gehalt von 0,66  $\mu\text{mol/l}$  in der Milch vor dem Trockenstellen sehr niedrig. Im Trockensteherseekret war der Gehalt mit 6,66  $\mu\text{mol/l}$  dagegen deutlich höher. Cystin hemmte das LPS und förderte so deutlich das Wachstum von *Sc. agalactiae*. Sie sahen das unter anderem als eine Erklärung dafür, dass die Milchdrüse in der Trockenstehzeit eine höhere Empfänglichkeit für Galtinfektionen zeigt.

Generell hemmt das LPS das Wachstum von *Sc. agalactiae* und *Sc. uberis*. Auch die Vermehrung von *S. aureus* und *E. coli* in Kuhmilch konnte durch die Aktivität des LPS gehemmt werden. Die Wirkung auf *B. abortus* und *C. burnettii* konnte vernachlässigt werden (Kangumba et al., 1997). Gegenüber den gramnegativen Keimen gilt das LPS als bakterizid, was Untersuchungen über die bakterielle Aktivität des LPS gegenüber *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Ps. aeruginosa* zeigten (Björck et al., 1975; Reiter et al., 1976; Björck, 1978; Reiter und Härnulf, 1982). Auch *Campylobacter jejuni* zeigte sich empfindlich gegenüber dem LPS (Beumer et al., 1985).

Angriffspunkt des LPS ist die Zellwand, wodurch sich erklären lässt, dass entsprechend des unterschiedlichen Aufbaus der Zellwand gramnegative Bakterien abgetötet, grampositive Bakterien aber nur zeitweilig gehemmt und auf Sporen nur ein geringer Effekt ausgeübt wird (Zajak et al., 1981).

Bestimmte Streptokokkenarten, welche  $H_2O_2$  bilden, verstärken die Aktivität des LPS und bewirken so eine „Selbsthemmung“. LPS-resistente Stämme, die bei allen Bakterienarten auftreten können, besaßen ein  $NADH_2$ -oxydierendes System, welches das Zwischenprodukt Hypothiozyanat reduzierte, so dass es unwirksam wurde (Reiter, 1978a). Leigh et al. (1990) fanden eine unterschiedliche Infektiosität und ein unterschiedliches Resistenzverhalten von zwei *Sc. uberis* Stämmen gegenüber dem LPS. Sie vermuteten einen Zusammenhang mit der unterschiedlichen Hydrophilie der Stämme.

Bei Untersuchungen über die Auswirkung des LPS auf *Streptococcus mutans* konnte die antimikrobielle Wirkung durch sekretorisches IgA signifikant verstärkt werden. Auch Laktoferrin bewirkte eine Steigerung der Aktivität (Tenovuo et al., 1982).

Sandholm et al. (1988) haben die antibakterielle Wirkung der Glucose-Oxidase (GOD) in der Milch untersucht. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen an Glucose und GOD zusammengestellt, um die optimale antibakterielle Wirkung zu ermitteln. Diese Wirkung wurde bei einer GOD-Konzentration erreicht, bei der die Glucose während des Versuchs ständig verbraucht wurde. Hierbei entstand bei der Oxidation von Glucose Hydrogenperoxid, das das LPS aktivierte. Bei optimalem Glucose/GOD-Quotienten kam es zur vollkommenen Abtötung der Mastitiserreger, mit Ausnahme von *Ps. aeruginosa*. Unter suboptimalen Bedingungen wurde die bakterielle Vermehrung gehemmt.

Die Laktoperoxidaseaktivität der Milch der vier Euterviertel eines Tieres war bei gesunden Kühen unabhängig vom Laktationsstadium gleich. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Laktoperoxidaseaktivität der Milch aus gesunden und subklinisch erkrankten Eutervierteln in verschiedenen Laktationsstadien gab. Bei der Gegenüberstellung kranker und gesunder Euterviertel von Kühen, bei denen eine klinisch manifeste Mastitis diagnostiziert wurde, ergab sich bei Frisch- und Altmelkern, dass die Enzymaktivität in der Milch der gesunden Viertel signifikant höher lag als im Sekret des erkrankten Viertels. In der Mitte der Laktation ließ sich dieses nicht statistisch sichern. Allgemein war aber eine Abnahme in euterkranken Vierteln (75 % aller Fälle) zu beobachten. Dagegen lag der Thiozyanatgehalt der Milch in erkrankten Vierteln signifikant höher als in gesunden (Vobis et al., 1995).

Für das LPS konnte nachgewiesen werden, dass es einen wichtigen unspezifischen antibakteriellen Faktor der Milch darstellt, welcher für die Gesunderhaltung des Euters von Bedeutung ist. Die Verfütterung von Milch, zu welcher Thiozyanat und Hydrogenperoxid zugegeben wurde, führte bei Kälbern und Ferkeln zu einer Abnahme von Durchfallerkrankungen und verbesserte die Körpermasseentwicklung (Grün, 1984b).

#### **2.4.4 Nachweis der Laktoperoxidaseaktivität**

Zum Nachweis der antimikrobiellen Aktivität des LPS eignet sich besonders die auf einer kinetischen Messung basierende Spektrophotometrie. Hierbei wird die LPS-Aktivität durch die gemessene Extinktionsänderung pro Zeit berechnet.

Als Elektronendonator wurden dabei u. a. Pyrogallol und Guaiakol verwendet, die jedoch nicht sehr stabil in den Lösungen waren und als karzinogen gelten (Björck und Mullan, 1993). Ein neuerer Elektronendonator ohne diese Nachteile ist das ABTS (2,2-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic)-acid), welches bei den meisten diesbezüglichen Tests zum Einsatz kommt (Pruitt et al., 1990).

Laktoperoxidase haftet leicht an Glasflächen, daher sollten Glasküvetten zwischen den einzelnen Untersuchungen gründlich gereinigt oder Einmalküvetten benutzt werden (Björck und Mullan, 1993).