

## 5 Diskussion

Eutererkrankungen zählen neben Fruchtbarkeitsstörungen zu den wesentlichsten Ursachen wirtschaftlicher Verluste in der Milchviehhaltung. Die bedeutsamsten Erreger der Mastitis des Rindes stellen Bakterien dar. Unterstützend zu der körpereigenen Abwehr des Wirtstieres werden im allgemeinen Antibiotika zur Behandlung verwendet. Diese sollten nach Isolierung des Erregers und nach Anfertigung eines Antibiogramms gezielt eingesetzt werden (BTK, 2000). Leider ist dieses nicht in allen Fällen möglich, da in etwa 10 bis 40 % der zu untersuchenden Milchproben aus entzündeten Eutervierteln keine Erreger isoliert werden können (Robinson und Harwood, 1998; Shpigel et al., 1998). Mit 25,9 % klinischen Mastitiden ohne Nachweis von Erregern im Versuchsteil 1 liegt der Anteil der unspezifischen Mastitiden etwa in der Mitte der in der Literatur angegebenen Werte. Die 45,5 % klinischen Mastitiden mit fehlendem Erregernachweis des zweiten Versuchsabschnitts liegen etwas höher, sind aber mit dem Ergebnis von Morin und Constable (1998) vergleichbar.

### 5.1 Versuchsabschnitt 1

#### 5.1.1 Klinische Heilung

Bei Einsatz von Oxacillin in der Therapie klinischer Mastitiden betrug die klinische Heilungsrate 60,8 % am Tag 14 und 48,1 % am Tag 21. Die Tiere wurden im Durchschnitt 3,4-mal mit 1000 mg Oxacillin im Abstand von 24 Stunden intrazisternal behandelt.

Die klinische Heilungsrate am Tag 14 bei Mastitiden durch *Sc. agalactiae* lag bei 66,6 % von insgesamt sechs Tieren. Bei Mastitiden ausgelöst durch *S. aureus* wurden vier von neun Tieren (44,4 %) geheilt. Andere Untersucher erzielten vergleichbare Ergebnisse. Blood und Radostitis (1989) beschreiben für *S. aureus* Mastitiden bei Behandlung mit Cloxacillin (500 mg) eine Heilung von 30 bis 60 % bzw. bei Behandlung mit Penicillin G 40 bis 70 %. Die Heilung von Mastitiden durch Streptokokken wird bei ihnen mit nahezu 100 % beschrieben. Morin et al. (1998) behandelten 172 Mastitiden mit Cephapirin. Sie erreichten damit eine klinische Heilung von 59 % bezogen auf alle Mastitiden. Bei ausschließlicher Betrachtung der klinischen Heilung von Streptokokken Mastitiden ergab sich eine Heilungsrate von 72 %. Guterbock et al. (1993) stellten in ihren Arbeiten eine mittlere klinische Heilung bezogen auf alle klinischen Mastitiden von ca. 67 % fest. Dieses galt sowohl bei dreimaliger Behandlung mit 62,5 mg Amoxicillin (im Abstand von 12 Stunden) als auch bei zweimaliger Behandlung mit 200 mg Cephapirin (im Abstand von 12 Stunden).

Bezüglich der Heilungsraten von Antibiotika bei klinischen Mastitiden ist zu beachten, dass es sich hierbei um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Die Heilung ist unter anderem von weiteren unterstützenden Maßnahmen, dem Management und der Schwere der klinischen Erscheinungen abhängig.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die klinischen Heilungsraten unspezifischer Mastitiden keinen Unterschied zu den klinischen Heilungsraten von Mastitiden bei denen Erreger in der bakteriologischen Untersuchung isoliert wurden.

### **5.1.2 Bakteriologische Heilung**

Die bakteriologische Heilung des Euterviertels lag vor, wenn die in der Milchprobe am Tag 0 diagnostizierte Bakterienspezies am Tag 14 und Tag 21 nicht mehr isoliert werden konnte. In die Auswertung wurden nur Tiere einbezogen, die auch klinisch geheilt worden waren, da bei klinisch nicht geheilten Tieren ein Therapiewechsel vorgenommen werden musste.

Aufgrund des hohen Anteils an bakteriologisch negativen Proben (25,9 %), Proben mit unspezifischem Keimgehalt (16,5 %) und nicht näher differenzierten unspezifischen Streptokokken (25,9 %) ist die bakteriologische Heilungsrate in der vorliegenden Arbeit statistisch nicht aussagefähig.

Im einschlägigen Schrifttum waren keine Angaben über die bakteriologische Heilung von 1000 mg Oxacillin bei der Behandlung klinischer Mastitiden zu finden.

## **5.2 Versuchsabschnitt 2**

Die antibakterielle Eigenschaft von Milch wurde bereits von vielen Autoren beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die drei unspezifischen Abwehrfaktoren der Milch Lysozym, Laktoferrin und das Laktoperoxidase–Thiozyanat–Hydrogenperoxid System (LPS) Ursache bakteriologisch negativer Befunde einiger Mastitiden sein können.

Die Milchproben von an Mastitis erkrankten Tieren zum Nachweis von Laktoferrin, Lysozym und dem Laktoperoxidase–Thiozyanat–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> System stammten ausschließlich von einem Betrieb. Der Zeitraum, in dem die Proben gesammelt wurden, betrug zweieinhalb Monate. Als Proben wurden Anfangsviertelgemelksproben morgens immer zur gleichen Zeit genommen und unmittelbar nach der Probennahme aufbereitet und untersucht bzw. eingefroren. Alle Versuchstiere gehörten zur Rasse Deutsche Schwarzbunte. Somit konnten die in der Literatur

beschriebenen Einflüsse des Futters, der Haltung, Rasse, Melkfraktion, Probennahme und –aufbewahrung sowie der Jahreszeit auf ein Minimum reduziert werden.

In Vorversuchen zeigten Milchproben, von denen ein Teil direkt nach Probennahme und weitere Teile nach mehrwöchiger Lagerung bei  $-25^{\circ}\text{C}$  untersucht wurden, keinen Unterschied in den Laktoferrin- und Lysozymkonzentrationen. Deshalb wurden für den Nachweis der Laktoferrin- und Lysozymkonzentrationen alle Milchproben gesammelt, bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert und in Gruppen untersucht. In gleicher Weise wurde auch in den Arbeiten von Harmon et al. (1975), Sanchez et al. (1988), Desmazeaud (1993), Wang und Hurley (1998), Neumeister (1989), Hatzipanagiotou et al., (1998 ) verfahren. Der Nachweis der Laktoperoxidaseaktivität wurde ausschließlich direkt nach Probennahme durchgeführt.

### 5.2.1 Laktoferrin

Laktoferrin ist gegen die meisten grampositiven und gramnegativen Bakterien wirksam, wobei es Unterschiede in der Sensitivität bei den Bakterienspezies geben kann (Bishop et al., 1976; Arnold et al., 1980; Bellamy et al., 1992; Jones et al., 1994). Gramnegative Keime zeigten sich empfindlicher gegen Laktoferrin als Grampositive (Nonnecke und Smith, 1984). Die Wirkung des Laktoferrins ist sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid (Masson et al., 1966; Bullen et al., 1978; Finkelstein et al., 1983; Ellison et al., 1988; Ellison et al., 1990a,b; Ellison und Giehl, 1991; Yamauchi et al., 1993). Demnach besteht die Möglichkeit der Keimhemmung und damit die Möglichkeit einer Erklärung von „unspezifischen Mastitiden“. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen aber keinen Unterschied in der Laktoferrinkonzentration der Viertel mit Mastitis aus denen pathogene Keime isoliert werden konnten und den Vierteln mit Mastitis ohne Erregernachweis.

Der Median der Konzentrationen an Laktoferrin in der Milch der Kontrollviertel betrug  $0,065\text{ mg/ml}$ , der der Versuchsviertel betrug  $0,11\text{ mg/ml}$ . Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liegen damit im unteren Bereich der Laktoferrinkonzentrationen, die andere Autoren nachgewiesen haben (Tabelle 4). Nach Meyer et al. (1988) nimmt die Laktoferrinkonzentration mit steigender Milchleistung ab. Das könnte ein Grund für die niedrigen Werte sein, da die größten Unterschiede zu den Arbeiten von vor 1993 bestehen und in dieser Zeit die Milchleistung der Versuchstiere niedriger war als bei den Tieren der vorliegenden Arbeit. Weiterhin besteht ein großer Schwankungsbereich, der auch mit den unterschiedlichen Nachweistechiken zusammenhängen kann. Hinsichtlich der Korrelation mit der Milchleistung konnte in der vorliegenden Arbeit für Laktoferrin kein Zusammenhang festgestellt werden.

Weiterhin hatten die Euterviertel keinen Einfluss auf die Laktoferrinkonzentration. Der Einfluss der klinischen Mastitis war signifikant. An klinischer Mastitis erkrankte Viertel zeigten höhere Laktoferrinkonzentrationen als klinisch gesunde Viertel. Dieses war auch von anderen Autoren festgestellt worden (Harmon et al., 1975; Harmon et al., 1976; Harmon und Newbould, 1980; Wang und Hurley, 1998). In der vorliegenden Untersuchung bestand zwischen der Laktoferrinkonzentration und dem Laktationsstadium bzw. der Laktationsnummer im Gegensatz zu den Arbeiten von Harmon et al. (1975) und Meyer et al. (1988) kein Zusammenhang.

### 5.2.2 Lysozym

Lysozym ist ein wichtiger humoraler Faktor des unspezifischen Abwehrsystems. Es katalysiert die hydrolytische Spaltung von  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen der N-Acetylaminopolysaccharide (N-Acetylmuraminsäure, N-Acetylglucosamin). Dadurch kommt es bei Bakterien zur Zerstörung ihrer Zellwand (Phillips, 1966; Blake et al., 1967). Die bakteriolytische Wirkung erstreckt sich hauptsächlich auf grampositive Bakterien (Götze, 1977). Hohe Milchlysozymgehalte führten zu einer Verringerung der Keimzahl und teilweise zu einer Verhinderung einer Erkrankung des Euters (Erhardt et al., 1981; Meyer et al., 1981; Grün, 1985). Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergaben für Viertel mit Mastitis und positivem Erregernachweis höhere Lysozymkonzentrationen als für Viertel mit Mastitis ohne Erregernachweis. Diese Beobachtung könnte mit den stärkeren klinischen Erscheinungen der Viertel mit Mastitiden, bei denen Erreger in der bakteriologischen Untersuchung nachgewiesen wurden, zusammenhängen. Die Lysozymkonzentrationen der Versuchsviertel waren bei starken palpatorischen Veränderungen des Euterdrüsengewebes höher als in den Vierteln mit geringen Veränderungen und stiegen mit Zunahme der Veränderungen des Eutersekrets an. In einigen Arbeiten wurde eine Zunahme des Lysozymgehaltes in der Milch von Kuh, Büffel und Ziege bei Anstieg des Keimgehaltes festgestellt (Götze et al., 1977; Farid et al., 1984; Radwan und Elmarimi, 1987). Reinhold (1975) stellte dagegen bei einem hohen Keimgehalt der Milch eine schnelle Abnahme des Lysozymgehaltes fest. Dieses Ergebnis erklärte er durch eine Bindung des Lysozyms an Bakterien und eine daraus folgende Aktivitätsreduzierung.

Der Median der Lysozymkonzentrationen der Kontrollviertel betrug 0,34  $\mu\text{g/ml}$  und der der Versuchsviertel 0,63  $\mu\text{g/ml}$ . Die Ergebnisse dieser Arbeit liegen damit im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte, die eine weite Streuung aufweisen (Tabelle 5).

Über die Beziehung zwischen Lysozym und Zellgehalt sind die Angaben in der Literatur 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), wurde dieses von anderen Autoren nicht bestätigt werden (Weaver und Kroger, 1978; Zörkler et al., 1982). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Erhebung des Zellzahlstatus der semiquantitative California – Mastitis – Test angewendet. Zwischen den CMT–Befunden und den Lysozymkonzentrationen konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Weiterhin konnte, entgegen den Aussagen anderer Autoren (Götze et al., 1977; Senft et al., 1981; Meyer et al., 1988) kein Zusammenhang mit dem Laktationsstadium festgestellt werden.

Meyer et al. (1988) stellten für die Lysozymkonzentration in Milch einen signifikanten Einfluss der Laktationsnummer, der Euterviertel und der Milchleistung fest. Keiner dieser Einflüsse konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit bestätigt werden.

### 5.2.3 Laktoperoxidase–Thiozyanat–Hydrogenperoxid Systems

Das Enzym Laktoperoxidase bildet mit  $H_2O_2$  einen Komplex und oxidiert  $SCN^-$ , wobei ein kurzlebige intermediäres Oxidationsprodukt, Hypothiozyanat ( $OSCN^-$ ), entsteht (Hoogendorn et al., 1977; Thomas und Aune, 1978). Das Hypothiozyanat ist neben weiteren Oxidationsstufen des Thiozyanats hauptsächlich für die antibakterielle Wirkung verantwortlich (Björck und Claesson, 1980).

Bei grampositiven Bakterien kommt es zeitweilig zu einer Wachstumshemmung (bakteriostatischer Effekt), bei gramnegativen Keimen eher zum Zelluntergang (bakterizider Effekt) (Björck, 1978; Reiter, 1978a, b; Korhonen, 1980; Kangumba et al., 1998).

Der Median der Aktivität des Laktoperoxidase–Thiozyanat–Hydrogenperoxid Systems lag für die Kontrollviertel bei 1185,0 Units/l und für die Versuchsviertel bei 1320,0 Units/l. Die Ergebnisse der Untersuchung stimmen mit den Angaben aus der Literatur überein, die auch wie die Ergebnisse dieser Arbeit eine weite Streuung aufweisen (Tabelle 7). Allerdings lagen die ermittelten Werte aus den Proben der erkrankten Euterviertel deutlich höher als die aus den Kontrollvierteln. Das stimmt mit den Ergebnissen von Korhonen (1973) überein und steht im Gegensatz zu der Aussage von Vobis et al. (1995). Der Unterschied zu den Untersuchungen von Vobis et al. liegt darin, dass dieser nicht gesunde und kranke Viertel eines Tieres sondern verschiedener Tiere miteinander verglichen hat. Dieses kann aufgrund der hohen Schwankungsbreite der LPS-Aktivitäten zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit konnte entgegen der Ergebnisse von Grün (1984a) kein Zusammenhang zum Laktationsstadium festgestellt werden. Der dort beschriebene Zusammenhang bezog sich jedoch auf die unterschiedlichen Enzymaktivitäten des Sekrets der

Trockenstehphase (TSS), der Milch innerhalb der ersten Woche p. p. und der reifen Milch. In der vorliegenden Arbeit waren diese Zeitabschnitte nicht Gegenstand der Untersuchung und Trockenstehersekret wurde nicht gesammelt.

### 5.2.4 Unspezifische Mastitiden

Spontanheilungen sind sowohl für grampositive (Chamings, 1984; Smith et al., 1985) als auch für gramnegative (Hill et al., 1978; Eberhart, 1984) Mastitiden beschrieben worden. Maßgeblich beteiligt an der bakteriziden und bakteriostatischen Wirkung der Milch sind die in dieser Arbeit untersuchten drei Komponenten der Milch. Die Untersuchung der drei Faktoren des Abwehrsystems der Milchdrüse in dieser Arbeit ergab keine Hinweise auf eine Erklärung des Auftretens unspezifischer Mastitiden. Es wurden keine Unterschiede in den Laktoferrinkonzentrationen bzw. LPS-Aktivitäten der Mastitiden mit positivem und negativem Erregernachweis festgestellt. Die Lysozymkonzentrationen der erkrankten Viertel aus denen Erreger isoliert wurden, waren sogar signifikant höher als in den erkrankten Vierteln ohne Erregernachweis ( $p \leq 0,05$ ).

Als weitere Ursache für Mastitiden ohne Erregerisolierung in der bakteriologischen Untersuchung kommt unter anderem in Betracht, dass die momentan ausgeschiedene Keimmenge zu gering für einen Nachweis ist. Eine andere mögliche Erklärung ist der Einsatz von Antibiotika vor der Milchprobennahme. Das Vorhandensein von Antibiotika in den untersuchten Milchproben der vorliegenden Arbeit konnte ausgeschlossen werden. Vier (12,9 %) der 31 Tiere mit unspezifischen Mastitiden zeigten allerdings im Hemmstofftest ein fragliches bis positives Ergebnis. Zu vermuten ist hier ein Einfluss der unspezifischen Abwehrfaktoren der Milch. Zwei Tiere mit fraglichem bis positivem Hemmstoffergebnis zeigten sehr hohe ( $3,75 \mu\text{g/ml}$  und  $5,0 \mu\text{g/ml}$ ) Lysozymkonzentrationen. Schiffmann et al. (1992) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass Laktoferrin, Lysozym und das LPS zu falschpositiven Hemmstoffergebnissen führen können.

Weiterhin ist es möglich, dass der Erreger gar nicht mehr in der Milchdrüse vorhanden ist und die klinischen Symptome durch Endotoxine hervorgerufen werden oder die Probenaufbewahrung bis zur Untersuchung zu einer Keimreduzierung geführt hat.

In einigen Arbeiten wurde versucht, anhand der klinischen Symptome die unspezifischen Mastitiden als „eher zu den grampositiven“ oder „eher zu den 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) in ihrer Arbeit zu dem umgekehrten Ergebnis kamen. Die Untersuchungen von Zorah et al. (1993) unterstützen diese Aussage, da sie mit ihren ELISAs allein in 51,2 % der Mastitismilchproben ohne Erregernachweis Antigene von *E. coli* entdeckten. Beim Vergleich der klinischen Befunde in der vorliegenden Arbeit zeigten die Tiere bzw. Viertel, bei denen ein Erreger isoliert werden konnte, geringfügig stärkere klinische Erscheinungen als die Tiere mit unspezifischen Mastitiden. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ). Eine Zuordnung der unspezifischen Mastitiden aufgrund der klinischen Erscheinungen zu Mastitiden ausgelöst durch grampositive oder gramnegative Keime war nicht Gegenstand dieser Untersuchungen.

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung von unspezifischen Mastitiden sind nicht in die Mastitisroutinediagnostik gehörende Keime. So fand Kaltenböck (1986) in 235 von 272 an Mastitis erkrankten Tieren chlamydien- oder mykoplasmenähnliche Keime. 54,4 % (148) dieser Mastitiden zeigten keine weiteren Erregerbefunde, waren also „steril“.

### 5.3 Schlussfolgerungen

Die in der vorliegenden Untersuchung erzielten Heilungsraten von Oxacillin bei der Behandlung klinischer Mastitiden ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeiten.

Aus den vorliegenden Ergebnissen des zweiten Versuchsabschnitts wird die Schlussfolgerung gezogen, dass Laktoferrin, Lysozym und/ oder das Laktoperoxidase–Thiozyanat–Hydrogenperoxid System vermutlich nicht für die negativen Befunde der bakteriologischen Untersuchung von Milchproben aus klinisch erkrankten Eutervierteln verantwortlich sind. Es wurden keine Unterschiede in den Laktoferrinkonzentrationen bzw. LPS-Aktivitäten der Mastitiden mit positivem und den Mastitiden mit negativem Erregernachweis festgestellt. Die Lysozymkonzentrationen der erkrankten Viertel aus denen Erreger isoliert wurden, waren sogar signifikant höher als in den erkrankten Vierteln ohne Erregernachweis ( $p \leq 0,05$ ).

Die Tiere bzw. Viertel, bei denen ein Erreger isoliert werden konnte, zeigten beim Vergleich der klinischen Befunde geringfügig stärkere klinische Erscheinungen als die Tiere mit unspezifischen Mastitiden.

Als Grund für die Mastitiden mit negativem Erregernachweis ist zu vermuten, dass zum Zeitpunkt der Probennahme die Erregerausscheidung verringert ist oder die Erreger gar nicht mehr in der Milchdrüse vorhanden sind.