

Aus dem Institut für Tierernährung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Einfluss der Anwendung eines
probiotischen Dippmittels mit *Lactococcus lactis* bei Milchkühen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Annett Walpuski
Tierärztin aus Lutherstadt Wittenberg

Berlin 2014
Journal-Nr.: 3742

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek
Zweiter Gutachter: PD Dr. med. vet. Sebastian Arlt
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Johannes Handler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dairy cows, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, mastitis, probiotics,
teat dip, dips, in vitro, photometry, polymerase chain reaction, clinical trials

Tag der Promotion: 13.07.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-639-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Carola Schubbel - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....	IV
VERZEICHNIS DER TABELLEN.....	V
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	VI
1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1 Milchdrüse.....	2
2.1.1 Morphologie der Milchdrüse.....	2
2.1.1.1 Anatomie.....	2
2.1.1.2 Histologie.....	3
2.1.2 Abwehrmechanismen der Milchdrüse.....	3
2.1.2.1 Zitzenkanal und Fürstenberg'sche Rosette.....	3
2.1.2.2 Zelluläre Abwehr.....	4
2.1.2.3 Humorale Abwehr.....	5
2.1.3 Mikrobielle Besiedlung des Zitzenkanals und der Zitzenhaut laktierender Rinder.....	6
2.2 Eutergesundheitsstörungen.....	10
2.2.1 Mastitiserreger und deren Nachweismöglichkeiten.....	10
2.3 Dippmittel.....	14
2.3.1 Dippmittel zur Mastitisprophylaxe.....	14
2.3.2 Inhaltsstoffe von Dippmitteln.....	15
2.4 Probiotika.....	17
2.4.1 Definition.....	17
2.4.2. Wirkmechanismus und Anwendungsgebiete.....	17
2.4.3 <i>Lactococcus lactis</i> und das Bacteriocin Nisin im Einsatz am und im Euter.....	18
2.5 Fragestellung dieser Arbeit.....	20
3. MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1 Dem Feldversuch vorangegangene <i>in-vitro</i> Untersuchungen.....	21
3.1.1 Kokultivierung zur Beurteilung der Wachstumsbeeinflussung von <i>Lactococcus lactis</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.1.1.1 Stämme und Inkubationsbedingungen.....	21
3.1.1.2 DNA-Extraktion.....	22
3.1.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22

3.1.1.4 Herstellung von Kalibrierreihen zur Quantifizierung der Kopienzahlen der Zielgene.....	23
3.1.1.5 Auswertung	23
3.1.2 PathoProof™ Mastitis PCR Assays	24
3.1.2.1 Quantifizierung der Ergebnisse mit dem PathoProof™ Mastitis PCR Assay..	25
3.1.3 Weitere verwendete Geräte und Chemikalien der <i>in-vitro</i> Untersuchungen	25
3.2 Anwendung eines <i>L. lactis</i> -haltigen Dippmittels im Feldversuch	26
3.2.1 Versuchsbetrieb.....	26
3.2.2 Studientiere.....	28
3.2.3 Dippmittel.....	29
3.2.4 Versuchsanordnung.....	29
3.2.5 Aufnahme klinischer Parameter und sonstige Datenerfassung.....	30
3.2.6 Probenahme.....	30
3.2.7 Mikrobiologische Untersuchung.....	31
3.2.8 Molekularbiologische Untersuchungen der Tupferproben	31
3.2.8.1 Detektion des NisinA-Gens in den Tupferproben.....	31
3.2.8.2 Auswertung der Tupferproben mit dem PathoProof™ Mastitis PCR Assay...	32
3.2.9 Verwendete Geräte und Chemikalien für den Feldversuch	32
3.3 Statistische Auswertung erhobener Daten.....	32
4. ERGEBNISSE.....	33
4.1 Dem Feldversuch vorausgegangene <i>in-vitro</i> Untersuchungen.....	33
4.1.1 Kokultivierung zur Beurteilung der Wachstumsbeeinflussung von <i>Lactococcus lactis</i> LAC 0125 und <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4.1.2 Quantifizierung des PathoProof™ Mastitis PCR Assays.....	35
4.2 Anwendung eines Dippmittels auf Basis von <i>Lactococcus lactis</i> im Feldversuch	38
4.2.1 Klinische Parameter	38
4.2.1.1 Hygiene Score	38
4.2.1.2 Befunde der Milchdrüse und Zitzen.....	40
4.2.1.3 Krankheitstage.....	42
4.2.2 Daten der MLP-Berichte	44
4.2.2.1 Zellzahlen der Milch	44
4.2.2.2 Milchleistung.....	47
4.2.3 Nachweis Nisin-resistenter Bakterien als Indiz für die Kolonisierung mit dem Nisin-resistenten <i>L. lactis</i> -Stamm	48
4.2.4 Molekularbiologische Untersuchungen.....	49
4.2.4.1 Detektion des NisinA-Gens in den Tupferproben.....	49
4.2.4.2 Auswertung der Tupferproben mit dem PathoProof™ Mastitis PCR Assay...	49

5. DISKUSSION	51
5.1 Kritik der Methoden	51
5.1.1 Wachstumsbeeinflussung von <i>Lactococcus lactis</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>	53
5.1.2 Quantifizierung mittels des PathoProof™ Mastitis PCR Assays.....	54
5.2 Diskussion der Ergebnisse	55
5.2.1 Vergleich klinischer Parameter bei Anwendung eines Dippmittels auf Iodbasis und des <i>Lactococcus lactis</i> -Dippmittels	55
5.2.2 Etablierung des als Dippmittel eingesetzten <i>Lactococcus lactis</i> -Stammes im Strichkanal und weiterführende molekularbiologische Untersuchungen.....	56
5.3 Perspektive	58
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	59
7. SUMMARY	60
8. LITERATURVERZEICHNIS	61
9. ANHANG.....	74
10. DANKSAGUNG.....	77
11. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	78

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1 Darstellung der lag-Zeit nach 9 Stunden Kokultivierung von <i>L. lactis</i> und <i>S. aureus</i>	34
Abbildung 2 Einfluss von <i>L. lactis</i> auf das Wachstum von <i>S. aureus</i> anhand der Kopienzahl pro μ l DNA-Extrakt des nuc-Gens von <i>S. aureus</i>	35
Abbildung 3 Entwicklung des Zitzen Condition Scores der Viertel in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchsverlauf	41
Abbildung 4 Anzahl der aufgrund einer akuten Mastitis behandelten Viertel in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum	43
Abbildung 5 Vergleich der logarithmierten Mittelwerte der Zellzahlen der MLP in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum	44
Abbildung 6 Entwicklung der logarithmierten Mittelwerte der Zellzahlen der MLP der gesamten Herde, sowie der Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum	47

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 1 Mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesene Besiedlung des Zitzenkanals und der Zitzenhaut von Milchkühen	7
Tabelle 2 Einteilung häufiger Mastitiserreger nach Winter (2009) und DeKruif et al. (2014)10	
Tabelle 3 Vorteile und Nachteile des Einsatzes der PCR in der Mastitisiagnostik, nach DVG (2010)	12
Tabelle 4 Beispiele gebräuchlicher Desinfektionsmittel zum Zitzendippen.....	16
Tabelle 5: Wirkmechanismen von Probiotika, modifiziert nach Ohashi und Ushida (2009) und Görke und Liebler-Tenorio (2001).....	17
Tabelle 6 Pipettierschema Co-Kultivierung [Zellen/mL]	22
Tabelle 7 Verwendete PCR –Primersequenzen und Zielgene	22
Tabelle 8 Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter	23
Tabelle 9 Zuordnung der Bakterien und Primer-Mixe laut PathoProof™ Mastitis PCR Assay-Handbuch	24
Tabelle 10 Anzuchtbedingungen der zur Quantifizierung des PathoProof™ Mastitis Assays eingesetzten Bakterien-Stämme	24
Tabelle 11 Kalkulierte Futteraufnahme pro Kuh und Tag [kg]	27
Tabelle 12 Kraftfutterzusammensetzung	26
Tabelle 13 Kennzahlen der TMR	26
Tabelle 14: Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen und Behandlungen.....	29
Tabelle 15 Verwendete PCR – Primersequenzen und Zielgene	31
Tabelle 16 Identifikation von 10 DSM-Stämmen mittels PathoProof™ Mastitis PCR Assay	36
Tabelle 17 Zuordnung der eingesetzten Stämme zu Primer-Mix und Fluoreszenz	37
Tabelle 18 Bewertung der Euterhygiene in Kontroll- (KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum [Anzahl der Tiere (%)]	39
Tabelle 19 Zitzenhautläsionen in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) [Anzahl der Tiere (%)].....	40
Tabelle 20 Zustand des Euterdrüsen Gewebes in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum [% der Viertel].....	42
Tabelle 21 Verteilung der Zellzahlen der MLP von Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum [Anzahl der Tiere und prozentualer Anteil (%)]	46
Tabelle 22 Mittelwerte und Standardabweichung σ der Milchleistungen in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) an den Tagen der MLP [kg].....	48
Tabelle 23 Vergleich der Positivkontrollen bei Direktausstrich/Tupferausstrich [kBE/Platte]	48
Tabelle 24 Nachweis Nisin-resistenter Bakterien auf Selektivmedium von Tieren aus Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) [Anzahl der Viertel (%)].....	49
Tabelle 25 Nachweis des NisinA-Gens in Tupferproben in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) [Geometrischer Mittelwert der logarithmierten Kopienanzahl/Tupfer (Anzahl positiver Proben)]	49
Tabelle 26 Nachweis von Mastitiserregern mittels PathoProof™ Mastitis Assay in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) [geometrischer Mittelwert ng/mL Tupferextrakt (Anzahl positiver Tiere)].....	50
Tabelle 27 Befundschlüssel zur klinischen Untersuchung des Euters, der Zitzen- und Euterhaut nach Rosenberger und Dirksen (1990)	74
Tabelle 28 Zitzen Condition Score nach Mein (2001).....	74

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
DDBSA	Dodecylbenzolsulfonsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
KBE	Koloniebildende Einheit
KNS	koagulasenegative Staphylokokken
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MLP	Milchleistungsprüfung
NMC	National Mastitis Council
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
TMR	Totale Mischration
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
u. a.	unter anderem
uS	ursprüngliche Substanz

1. EINLEITUNG

Intramammäre Infektionen stellen einen wesentlichen wirtschaftlichen Faktor in der Milchproduktion dar. Subklinische wie auch klinische Mastitiden gehen mit erhöhten Zellzahlen einher und verursachen Kosten durch verringerte Milchleistung, geringere Abnahmepreise durch die Molkereien und gegebenenfalls Ablieferungssperre der Milch, Behandlungen der betroffenen Tiere und Abgänge (Halasa et al 2007).

Mastitiden entstehen vorwiegend durch das Eindringen von Keimen über den Strichkanal. Präventive Maßnahmen, wie beispielsweise das Dippen der Zitzen nach dem Melken, werden daher weltweit erfolgreich eingesetzt (Hansen und Hamann 2003).

Dippmittel kommen in Deutschland bisher vorwiegend als Desinfektionsmittel direkt nach dem Melkvorgang zum Einsatz. So eliminieren bzw. reduzieren sie Keime, die andernfalls zwischen den Melkzeiten durch den Strichkanal in das Euter eindringen könnten. Handelsübliche Dippmittel beinhalten als Desinfektionskomponente vorwiegend Iod und zudem oftmals einen Pflegestoff, der zur Geschmeidigkeit der Zitzenhaut beitragen und so die Erregeranheftung erschweren soll (Winter 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *Lactococcus lactis*-Stamm auf die Fähigkeit zur Wachstumshemmung des bedeutenden Mastitiserregers *Staphylococcus aureus in-vitro* untersucht. Weiterhin beschäftigte sie sich mit der Frage, ob es möglich ist, dieses Milchsäurebakterium im Strichkanal von Milchkühen durch Anwendung als Dippmittel zu etablieren. Hierdurch wird eine Veränderung der Mikrobiota von Zitzenhaut und Strichkanal angestrebt, um die Besiedlung mit potentiellen Mastitiserregern, beispielsweise durch Konkurrenz um Anheftungsstellen, zu erschweren. Weiterhin ist der verwendete *Lactococcus lactis*-Stamm nach Angaben der Herstellerfirma zur Bildung von Nisin fähig, womit Gram-positive Erreger antagonisiert werden könnten. In einer Untersuchung an Milchkühen wurde das Testpräparat im Vergleich zu einem konventionellen jodhaltigen Dippmittel untersucht. Neben der Auswertung der Zellzahlen über den Versuchszeitraum wurden auch Parameter wie der Zitzen-Condition-Score und weitere Eutergesundheitskennwerte zwischen einer Versuchs- und Kontrollgruppe verglichen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Milchdrüse

Die Milchdrüse, *Glandula mammaria*, stellt eine modifizierte apokrine Hautdrüse dar (Dahme 2007). Dem Sekretionsprodukt Milch kommt beim Rind, wie bei allen Säugetieren, die Funktion der Ernährung der Neugeborenen zu. Aufgrund ihrer Zusammensetzung ist die Milch des Rindes auch für den Menschen ein hochwertiges Nahrungsmittel. Dies ist einer der Gründe für die große wirtschaftliche Bedeutung der Milch für den Landwirtschaftssektor.

Neben Fruchtbarkeitsproblemen und Erkrankungen der Klauen und Gliedmaßen stehen Erkrankungen der Milchdrüse an vorderster Stelle der Abgangsursachen bei Milchkühen (Naumann und Brungs 2014).

Im folgenden Kapitel wird eine kurze Übersicht über die Anatomie und Histologie der Milchdrüse gegeben. Außerdem werden Abwehrmechanismen erläutert und ein Einblick in die mikrobielle Besiedlung des Zitzenkanals gegeben.

2.1.1 Morphologie der Milchdrüse

2.1.1.1 Anatomie

Die vier Mammarkomplexe des Rindes sind an der ventralen Körperwand in der *Regio inguinalis* durch ihren Aufhängeapparat, den *Apparatus suspensorius mammaria*, befestigt. Jeder Mammarkomplex besteht aus einem Drüsenkörper (*Corpus mammae*) und zugehöriger Zitze (*Papilla mammae*), wobei die Größe vom Funktionszustand abhängig und auch individuell verschieden ist (Budras 2002).

Im Gegensatz zum Euter der Stute besteht der einzelne Mammarkomplex des Rindes aus nur einem Drüsenkörper mit zugehörigem Bindegewebe, Nerven-, Blut- und Lymphgefäßen. Im Bereich des Drüsenkörpers ist die Haut des Euters mit spärlicher Behaarung bedeckt, welche an den Zitzen gänzlich fehlt.

Der Drüsenkörper besteht aus einem Ausführungsgangsystem und dem milchsynthetisierenden und -sezernierenden Drüsengewebe. Das Drüsenparenchym wird in verschiedene Abschnitte unterteilt, wobei man von einer blattartigen Anordnung sprechen kann. Hierbei bilden mehrere Drüsenalveolen Drüsenläppchen. Mehrere Drüsenläppchen werden durch breitere Bindegewebszüge zu Milchdrüsenlappen versammelt. Entsprechend setzt sich das Ausführungsgangsystem aus *Ductus alveolares lactiferi*, *Ductus lactiferi* und *Ductus lactiferi colligentes* zusammen, die durch ihre sinusartigen Ausbuchtungen die große Speicherkapazität der Milchdrüse begründen und letztendlich in die Milchzisterne (*Sinus lactifer*) münden. Diese ist durch eine Falte, die *Plica anularis mucosae*, und den Fürstenberg'schen Venenring in Zitzen- und Drüsenteil unterteilt (Wendt 1994).

Als Zitzenkanal (auch Strichkanal) wird der Bereich zwischen der Öffnung auf der Zitzenspitze, dem *Ostium papillare*, und der Zitzenzisterne bezeichnet (Budras 2002). Abgegrenzt sind die Zitzenzisterne und der Strichkanal durch die als Fürstenberg'sche Rosette bezeichneten Schleimhautlängsfalten.

2.1.1.2 Histologie

Die Milchdrüse stellt nach König eine zusammengesetzte tubulöse Drüse mit verzweigten, alveolären Endstücken dar (König 2005). Die Alveolen liegen hier allerdings nicht nur am Drüsenendstück vor, sondern auch an den kleinen Gängen. Durch die *Membrana propria* (Basalmembran) werden die Alveolen in das Läppchensystem eingebaut und über die in ihr verlaufenden Kapillarnetze mit für die Milchbildung essentiellen Nährstoffen versorgt (Wendt 1994). Ein aus sogenannten Korbzellen bestehendes Myoepithel liegt der Basalmembran direkt an und führt nach Aktivierung seiner Oxytocin-Rezeptoren und dank kontraktile Filamente zur Kontraktion und somit zur Verengung der Alveole.

Das für die Bildung der Milchinhaltstoffe verantwortliche, einschichtige Drüsenepithel unterliegt einem kontinuierlichen Umbauprozess, sowohl zwischen den Melkzeiten als auch während des Laktationszyklus. Diese Umbauprozesse umfassen die Zellform sowie den Ausbildungsgrad der Zellorganellen. So schwankt die Form beispielsweise von niedrig über isoprismatisch hin zu hochprismatisch bei der Sekretabgabe, was auch die Form des Zellkernes von abgeplattet über rund bis längsoval verändert. Der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum vergrößern sich während der Synthesephase, da sie für die Bildung der Albumin granula bzw. des Milcheiweißes verantwortlich sind (Wendt 1994).

Die Ausführungsgänge der Milchdrüse sind proximal von einem einschichtigen, mit deutlichen Sekretionsmerkmalen ausgestatteten Epithel, distal von einem zweischichtigen iso- bis hochprismatischen Epithel ausgekleidet (Hewicker-Trautwein 2007).

Die Milchzisterne wird von einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet, welches durch die Fürstenberg'sche Rosette vom mehrschichtigen, stark verhornenden Epithel des Zitzenkanals abgegrenzt wird (Wendt 1994).

2.1.2 Abwehrmechanismen der Milchdrüse

Das Hohlraumssystem der Milchdrüse wird als ein aseptischer Bereich beschrieben, welcher durch vielfältige Abwehrmechanismen geschützt ist (Rainard und Riollot 2006). Mikroorganismen treffen zunächst auf physikalische Barrieren, die ihr Eindringen verhindern sollen. Ist dies dennoch gelungen, entscheiden die Effektivität des angeborenen und erworbenen Immunsystems und die Pathogenität der Erreger über einen möglichen Krankheitsausbruch.

2.1.2.1 Zitzenkanal und Fürstenberg'sche Rosette

Der Zitzenkanal wird in der Trockenstehperiode zum einen durch den *Musculus sphincter papillae* verschlossen. Hierfür sorgt der sympathische Tonus, der auch zwischen den Melkzeiten eine Kontraktion hervorruft und somit den Zitzenkanalschluss bedingt (Lefcourt und Akers 1983). Kraftmessungen zur Prüfung des Zitzenkanalschlusses ergaben deutlich höhere Werte vor als nach dem Melken (Müller et al. 2006). Ein erneuter Verschluss des Zitzenkanals ist frühestens zwei Stunden nach dem Milchentzug gegeben (Schultze und Bright 1983). Dieser mechanische Verschluss wird durch einen Keratinfropf verstärkt, der durch das mehrschichtige, stark verhornende Plattenepithel des Strichkanals gebildet wird und der im Mittel eine Masse von 3,8 mg bis 12,3 mg aufweist (Paduch und Krömker 2011). Es konnte sogar eine höhere Inzidenz von Infektionen mit *Streptococcus uberis* von Zitzen festgestellt werden, die über weniger als 1,8 mg entfernbare Zitzenkanalkeratin verfügen (Lacy-Hulbert und Hillerton 1995). Als wachsähnliches Material kann das Keratin Erreger adsorbieren und ihr Eindringen in die Zisterne verhindern. Ein Großteil der Keratinschicht wird während des Milchentzuges samt anhaftender Mikroorganismen ausgeschwemmt, weshalb sie sich in der Laktation ständig erneuert. Neben der mechanischen Barriere wird die

Milchdrüse auch durch im Keratin enthaltene Bestandteile geschützt. Hierzu zählen kationische Proteine, die v.a. Gram-positive Erreger binden und lysieren, sowie die Xanthinoxidase und langkettige Fettsäuren mit bakteriostatischen Eigenschaften (Hogan et al. 1987, Collins et al. 1988, Senft et al. 1990). Im Kontrast hierzu stehen *in-vitro* Studien, in denen belegt wurde, dass das Zitzenkanalkeratin als alleinige Energiequelle für Mastitiserreger fungieren kann (Paulrud 2005).

Die Fürstenberg'sche Rosette stellt die Grenze zwischen Zitzenkanal und Zisterne dar, wobei sie durch die Schleimhautlängsfalten, die *Plicae longitudinales mucosae*, eine mechanische Erregerabwehr bildet. Zusätzlich fungiert sie als Ort immunzellulärer Abwehr, welche durch das Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen gekennzeichnet ist (Nickerson et al. 1983, Riedl et al. 2004).

2.1.2.2 Zelluläre Abwehr

Ist es Erregern gelungen in den Zitzenkanal einzudringen, treffen sie auf Zellen des Immunsystems in der Milch und dem Milchdrüsenewebe. Hierzu gehören vor allem Makrophagen, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), natürliche Killerzellen (NK), dendritische Zellen und Epithelzellen.

Generell hängt das Ausmaß des Zellzahlanstieges aufgrund eines Infektionsgeschehens vom verursachenden Erreger ab, wie eine Metaanalyse zeigen konnte (Djabri et al. 2002).

Zur Zusammensetzung der Abwehrzellen in der Milch finden sich in der Literatur stark variierende Angaben, was sich vor allem durch verschiedene Methoden der Aufarbeitung der Milch für die Zellzählung und die Methoden der Zellzählung selbst erklären lässt (Rainard und Riollot 2006).

Der Gehalt somatischer Zellen in der Milch wird zur Beurteilung des Funktions- und Gesundheitszustandes der Milchdrüse herangezogen (Winter 2009). Die bedeutendsten Zelltypen werden nachfolgend beschrieben.

Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und stellen einen dominanten Zelltyp in der laktierenden Milchdrüse dar. Sie sind zur Phagozytose und Antigen-Präsentation befähigt und somit an der Erkennung eingedrungener Erreger und der Auslösung einer Immunantwort beteiligt (Rainard und Riollot 2006).

Die Aktivierung von Makrophagen erfolgt durch Rezeptoren wie Toll-like receptors (TLRs), Mannose- und Scavenger-Rezeptoren, woraufhin die erkannten pathogenen Bakterien phagozytiert und durch die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickoxidverbindungen inaktiviert werden. Des Weiteren werden Effektormoleküle und Zytokine ausgeschüttet und eine Antigenpräsentation erfolgt auf *Major Histocompatibility Complex* (MHC) II-Molekülen. Dies sind Antigene auf Körperzellen, die der Identifikation körpereigener Zellen dienen.

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Als ein weiterer Zelltyp des angeborenen Immunsystems gelten die neutrophilen Granulozyten. Sie werden von Makrophagen und Epithelzellen durch chemische Lockstoffe rekrutiert und stellen zu Beginn einer Infektion der Milchdrüse bis zu 95% der Zellen der Milch und des Eutergewebes dar (Rainard und Riollot 2003). Ihre Fähigkeit zur Phagozytose opsonierter Erreger wird durch den ‚respiratory burst‘, die sauerstoffabhängige intrazelluläre Verdauung, erweitert. Die PMN werden als essentiell für die Erregerabwehr dargestellt und die Bedeutung ihrer schnellen Rekrutierung in großer Anzahl für den Verlauf der Mastitis wird betont (Rainard und Riollot 2006).

Natürliche Killerzellen

Auch die natürlichen Killerzellen (NK) gehören als Lymphozyten zum angeborenen Immunsystem. Sie binden mit ihren Fc-Rezeptoren antikörpermarkierte Zellen und zeichnen sich durch ihre zytotoxische Aktivität aus, die durch Moleküle wie Perforin und TNF- α vermittelt wird. Weiterhin sind sie in der Lage, intrazelluläre Erreger abzutöten (Sordillo et al. 1997).

Lymphozyten

Neben den NK unterscheidet man B- und T-Lymphozyten. In ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen internalisieren B-Lymphozyten die von ihnen über Membran-rezeptoren erkannten Erreger und präsentieren sie über MHC II-Komplexe den T-Lymphozyten. Durch die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) können diese wiederum die B-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen anregen (Sordillo und Streicher 2002).

Die T-Lymphozyten können in $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten eingeteilt werden. Weiterhin werden unter den $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten CD4- (T-Helferzellen) und CD8 (T-Killerzellen und T-Suppressorzellen) -positive T-Zellen unterschieden. Anders als im Blut überwiegen in der Milchdrüse die T-Lymphozyten und hierunter wiederum die CD8-positiven Zelltypen (Sordillo et al. 1997). Beide T-Zellsubtypen weisen vor allem den Charakter von Gedächtniszellen auf, wodurch sie schnell auf wiederholten Antigenkontakt reagieren können (Taylor et al. 1994).

Wegen ihrer Fähigkeit zur Zytotoxizität wird ein Beitrag zur Erreger- aber auch Tumorabwehr der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nahegelegt, ihre genaue biologische Funktion ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (Sordillo und Streicher 2002).

2.1.2.3 Humorale Abwehr

Neben den beschriebenen zellulären Bestandteilen des Immunsystems sind auch verschiedene humorale Bestandteile an der Erregerabwehr und –eliminierung beteiligt. Die Durchlässigkeit der tight junctions der Milchdrüsenepithelzellen wird als eine wichtige Voraussetzung für die Effektivität der humoralen Abwehr angesehen (Rainard und Riollot 2006). So werden diese Zellverbindungen bei einer Infektion der Milchdrüse vermehrt durchlässig und erlauben hierdurch die Exsudation von Plasma in das Lumen.

Antikörper stellen durch ihre Fähigkeit zur Opsonisierung, d.h. Kenntlichmachung von Antigenen für phagozytierende Zellen, Agglutination von Erregern und Neutralisierung von Bakterientoxinen eine wichtige Gruppe humoraler Faktoren dar. In der Milchdrüse liegen die Antikörper-Isotypen IgG1, IgG2, IgA und IgM im Zuge einer Infektion in hohen Konzentrationen vor (Guidry und Miller 1986).

Auch die Konzentrationen der Komponenten des Komplementsystems steigen bei Infektionen der Milchdrüse an. In diesem Falle wirken sie als Entzündungsmediatoren, können die Lyse von Bakterien bewirken und unterstützen durch Opsonisierung die zelluläre Abwehr (Sordillo und Streicher 2002, Rainard 2003).

Als weiterer Bestandteil der humoralen Immunabwehr gilt das eisenbindende Protein Laktoferrin. Es wird als bakteriostatisch wirkendes Agens beschrieben, das zudem vor Sauerstoffradikalen schützt. Des Weiteren wird seine immunmodulierende und entzündungshemmende Wirkung dargestellt (Rainard und Riollot 2006). Andere Autoren sehen die Hauptaufgabe dieses Proteins in der Abwehr von coliformen Erregern während der Trockenstehperiode (Sordillo und Streicher 2002).

Lysozym ist ein Enzym, das die Bindung von Laktoferrin an Membranen von Bakterien optimieren kann und durch die Hydrolyse von Peptidoglykanen in den Zellwänden Gram-positiver Erreger bakterizid wirkt (Sordillo und Streicher 2002).

Als weitere antibakteriell wirksame Enzyme in der Milchdrüse gelten die Lactoperoxidase und die Xanthinoxidase. Weiterhin wird eine Beteiligung von in der Milchdrüse gebildetem Albumin an der angeborenen Immunantwort nahegelegt (Shamay et al. 2005).

2.1.3 Mikrobielle Besiedlung des Zitzenkanals und der Zitzenhaut laktierender Rinder

Paduch und Krömker gehen von einem Austausch der mikrobiellen Populationen zwischen Zitzenhaut, -öffnung und -kanal aus (Paduch und Krömker 2011). Daher werden diese Lokalisationen im Folgenden zusammengefasst betrachtet.

Der Nachweis der Zitzenkanalmikrobiota kann mit verschiedenen Probenahme- und Diagnostikverfahren erfolgen, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert wird. So wurden beispielsweise Viertelanfangsgemelksproben als nicht-invasive Methode angewandt, aber neben trockenen und feuchten Tupfern auch Interdentalbürsten eingesetzt (Paduch und Krömker 2011). Des Weiteren wurden unterschiedliche Probenahmezeitpunkte gewählt, beispielsweise vor und nach dem Milchentzug. Beim Vergleich von Vorgemelksproben zu Milchproben nach dem Milchentzug konnten Unterschiede in der Milchzusammensetzung wie auch der mikrobiellen Besiedlung festgestellt werden (Espeche et al. 2009). Eine andere Arbeit berichtet, dass kein Einfluss des Entnahmezeitpunktes bei Tupferproben bezüglich ihres qualitativen Keimgehaltes festgestellt werden konnte (Paduch und Krömker 2011). Die Beprobung nach dem Melken mittels Tupfer ist durch Milchrückstände im Strichkanal und der noch nicht wieder kontrahierten Muskulatur des Zitzenkanalausganges erleichtert (du Preez 1986).

Beeinflusst wird die Besiedlung durch Melkzeughygiene und Zitzendesinfektion (Newbould et al. 1970). Außerdem kann beispielsweise der maschinelle Milchentzug durch eine Zunahme der Zitzendicke Einfluss nehmen (Zecconi et al. 1992). Die Bedeutung individueller Gegebenheiten sowie Unterschiede in Unterbringung, Fütterung und Melkroutine auf die Besiedlung von Zitzenkanal und -haut wurden ebenfalls beschrieben (Monsallier et al. 2012). Dass die Diversität der Strichkanalmikrobiota laktierender Milchrinder höher ist, als bisher vermutet, zeigen v.a. Studien der letzten Jahre, die neben klassisch mikrobiologischen Untersuchungen zusätzlich oder ausschließlich molekularbiologische Techniken angewendet haben.

Die Tabelle 1 bietet eine Übersicht der inzwischen mit molekularbiologischen Techniken nachgewiesenen Bakteriengruppen.

Tabelle 1 Mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesene Besiedlung des Zitzenkanals und der Zitzenhaut von Milchkühen

Gattung	Referenz ¹	Gattung	Referenz ¹
Actinobacteria		Firmicutes	
<i>Aeromicrobium</i>	6 ^b	<i>Aerococcus</i>	5, 6, 7 ^{a,b}
<i>Arcanobacterium</i>	6 ^b	<i>Aerosphaera</i>	6 ^b
<i>Arthrobacter</i>	6 ^{a,b}	<i>Bacillus</i>	1, 6, 7 ^{a,b}
<i>Bifidobacterium</i>	5 ^b	<i>Brevibacillus</i>	7 ^a
<i>Brachybacterium</i>	1, 6 ^b	<i>Brochothrix</i>	7 ^b
<i>Brevibacterium</i>	4 ^a	<i>Butyrivibrio</i>	6 ^b
<i>Clavibacter</i>	6 ^a	<i>Clostridium</i>	6, 1 ^b
<i>Corynebacterium</i>	4, 5, 6 ^{a,b}	<i>Coprococcus</i>	6 ^b
<i>Curtobacterium</i>	1, 6 ^{a,b}	<i>Enterococcus</i>	1, 3, 4, 6, 7 ^{a,b}
<i>Dietzia</i>	6 ^b	<i>Eubacterium</i>	6, 1 ^b
<i>Eggerthella</i>	6 ^b	<i>Facklamia</i>	6, 5, 1 ^b
<i>Enterorhabdus</i>	6 ^b	<i>Holdemania</i>	6 ^b
<i>Isoptericola</i>	6 ^a	<i>Jeotgalicoccus</i>	1, 5, 7 ^b
<i>Janibacter</i>	6 ^b	<i>Lactobacillus</i>	3, 4, 7 ^{a,b}
<i>Knoellia</i>	6 ^b	<i>Lactococcus</i>	3, 4, 5 ^b
<i>Kocuria</i>	5, 7 ^{a,b}	<i>Leuconostoc</i>	6 ^a
<i>Leucobacter</i>	6 ^b	<i>Lysinibacillus</i>	7 ^a
<i>Marmoricola</i>	6 ^b	<i>Oceanobacillus</i>	7 ^a
<i>Microbacterium</i>	1, 6 ^{a,b}	<i>Paenibacillus</i>	6, 7 ^a
<i>Micrococcus</i>	1, 5, 7 ^{a,b}	<i>Pediococcus</i>	1 ^b
<i>Nesterenkonia</i>	1 ^b	<i>Sharpea</i>	6 ^b
<i>Nocardioides</i>	6 ^b	<i>Selenomonas</i>	6 ^b
<i>Olsenella</i>	6 ^b	<i>Solobacterium</i>	6 ^b
<i>Plantibacter</i>	6 ^a	<i>Staphylococcus</i>	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 ^{a,b}
<i>Propionibacterium</i>	5, 7 ^b	<i>Streptococcus</i>	3, 4, 5, 6 ^{a,b}
<i>Propioniferax</i>	6 ^b	<i>Syntrophococcus</i>	6 ^b
<i>Rothia</i>	6 ^a	<i>Turicibacter</i>	6 ^b
<i>Sanguibacter</i>	6 ^a	<i>Weissella</i>	3, 4, 5, 7 ^{a,b}
<i>Streptomyces</i>	5 ^b	Proteobacteria	
<i>Terrabacter</i>	6 ^b	<i>Acinetobacter</i>	5 ^b
<i>Tessaracoccus</i>	1 ^b	<i>Afipia</i>	6 ^a
<i>Tetrasphaera</i>	6 ^b	<i>Bosea</i>	6 ^b
Bacteriodetes		<i>Bradyrhizobium</i>	6 ^a
<i>Myroides</i>	5 ^b	<i>Burkholderia</i>	6, 7 ^{a,b}
<i>Parabacteroides</i>	6 ^b	<i>Citrobacter</i>	7 ^b
<i>Porphyromonas</i>	6	<i>Enterobacter</i>	5, 6 ^{a,b}

Stamm und Gattung	Referenz ¹
<i>Escherichia</i>	1, 6 ^{a, b}
<i>Methylobacterium</i>	6 ^b
<i>Ochrobactrum</i>	6 ^a
<i>Pantoea</i>	6 ^a
<i>Paracoccus</i>	1, 6 ^b
<i>Pseudomonas</i>	6 ^a
<i>Psychrobacter</i>	5, 7 ^b
<i>Rahnella</i>	6 ^a
<i>Rhizobium</i>	6 ^b
<i>Serratia</i>	6, 7 ^{a, b}
<i>Sphingomonas</i>	6 ^a

1

- 1 Gill et al. (2006) Tupferproben aus Strichkanal
- 2 Taponen et al. (2008) Tupferproben von Zitzenhaut und aus Strichkanal
- 3 Espeche et al. (2009) Vor- und Nachgemelksproben + Tupferproben aus Strichkanal
- 4 Nader-Macias et al. (2008) Tupferproben aus dem Strichkanal und Milchproben
- 5 Braem et al. (2012) trockene Tupfer um Strichkanalöffnung herumgeführt
- 6 Verdier-Metz et al. (2012) feuchter Tupfer um Strichkanalöffnung herumgeführt
- 7 Braem et al. (2013) Abstrich Strichkanalöffnung + Milchprobe
- 8 Supré et al. (2009) Milchproben und Zitzenspizentupfer
- 9 Braem et al. (2011) Milchproben und Zitzenspizentupfer

a kulturell mikrobiologisch mit anschließender molekularbiologischer Nachweismethode
b molekularbiologische Nachweismethode

Besondere Bedeutung kommt der Besiedlung mit koagulase negativen Staphylokokken (KNS) zu. So beschreiben schon Devriese und Keyser diese als dominierende Bakteriengruppe (Devriese und Keyser 1980). In einer neueren Studie konnten sie bei 97,2% der beprobten Zitzenspitzen nachgewiesen werden (Braem et al. 2013). Die Relevanz der Besiedlung für die Eutergesundheit wird kontrovers diskutiert. So wird zum einen in Verbindung mit intramammären Infektionen mit KNS ein leichter Anstieg der Milchleistung festgestellt (Schukken et al. 2009, Piepers et al. 2010). Andere Autoren betonen, dass die Zitzenhaut besiedelnde KNS selten als Mastitiserreger identifiziert wurden und umgekehrt; einzig auf *Staphylococcus chromogenes* trifft beides zu (Taponen et al. 2008).

Eine Untersuchung der Wachstumshemmung von Mastitiserregern durch die Mikrobiota der Zitzenhaut *in-vitro* ergab, dass 25% der nachgewiesenen Isolate zur Hemmung definierter Mastitiserreger fähig ist. Weiterhin wurden die zur Hemmung fähigen Bakterienspezies *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus* sp., *Aerococcus viridans* und *Staphylococcus hominis* auf Zitzen von trockenstehenden Kühen sowie neugeborenen Kälbern aufgebracht, um ihre Fähigkeit zur Persistenz zu testen, wobei jedoch nur *S. hominis* längere Zeit nachgewiesen werden konnte (Woodward et al. 1988). Andere Autoren belegen *in-vitro* eine Hemmung bedeutender Mastitiserreger wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis*, nicht jedoch von *Escherichia coli* durch *Staphylococcus chromogenes* (De Vliegher et al. 2004). Zuvor wurde gefunden, dass die Zellzahlen von Färsen, deren Zitzen mit *S. chromogenes* besiedelt waren, in den ersten Tagen der Laktation geringer

ausfielen als die von Tieren ohne entsprechende Besiedlung der Zitzen (De Vliegher et al. 2003).

Sowohl die Zitzenhaut als auch der Zitzenkanal laktierender Milchrinder wurden positiv auf die Anwesenheit von Milchsäurebakterien getestet (Gill et al. 2006, Nader-Macias et al. 2008, Espeche et al. 2009, Braem et al. 2012, Verdier-Metz et al. 2012, Braem et al. 2013). Die Autoren betonen den potentiell positiven Effekt auf die Eutergesundheit. Auch für die Käseproduktion könnte sich die Besiedlung von Zitzenhaut und -kanal mit Milchsäurebakterien als vorteilhaft erweisen (Verdier-Metz et al. 2012). Espeche et al. konnten 102 verschiedene Milchsäurebakterienstämme aus Vor- und Nachgemelksproben sowie Tupferproben aus dem Strichkanal nachweisen. Die Stämme wurden auf ihre Oberflächeneigenschaften und die Fähigkeit zur Produktion von Bacteriocinen hin untersucht. Abschließend wurden 5 Stämme mit potenziell vorteilhaften Eigenschaften zur Anwendung an der Milchdrüse ausgewählt, hierunter auch ein *Lactococcus lactis*-Stamm (Espeche et al. 2009).

2.2 Eutergesundheitsstörungen

Eutergesundheitsstörungen können wie folgt eingeteilt werden (Wendt 1994):

- Entzündungen des Drüsenparenchyms, des Gangsystems, der Zitze
- Verletzungen der Zitzen / der Milchdrüse
- Funktionsstörungen
- Missbildungen
- Pathologische Euterödeme
- Erkrankungen des Lymphsystems im Bereich des Euters.

Zwischen den einzelnen Störungen bestehen oft pathogenetische Zusammenhänge. Die bedeutsamste Eutergesundheitsstörung in Hinsicht auf Verbreitung, wirtschaftliche Bedeutung und Behandlungsaufwand stellt die Entzündung des Drüsenparenchyms (Mastitis) dar (Thompson-Crispi et al. 2014). Im Folgenden wird ausschließlich hierauf eingegangen.

Die Klassifizierung der Eutergesundheit in gesund und krank richtet sich stark nach den Zielvorstellungen des Betrachters. Als gut etabliertes Kriterium hat sich die Beurteilung der somatischen Zellzahl durchgesetzt. Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) schlägt eine Kategorisierung anhand zytologisch-mikrobieller Befunde vor (DVG 2012). Hier wird ein Zellgehalt von unter 100.000 pro mL Milch ohne den Nachweis euterpathogener Mikroorganismen als normale Sekretion definiert. Bei einem Zellgehaltsanstieg ohne Nachweis euterpathogener Mikroorganismen, liegt eine unspezifische Mastitis vor. Werden hingegen Euterpathogene bei einem Zellgehalt von unter 100.000 pro mL Milch nachgewiesen, spricht man von einer latenten Infektion, bei gleichzeitigem Anstieg des Zellgehaltes der Milch von einer Mastitis. Begründung findet der gewählte Zellgehalt in Untersuchungen, die nachweisen, dass darüber hinaus die zelluläre Abwehr in entzündliche Reaktionen überzugehen beginnt (Doggweiler und Hess 1983).

2.2.1 Mastitiserreger und deren Nachweismöglichkeiten

Anhand ihrer Epidemiologie können Mastitiserreger in kontagiöse (auch kuhassozierte) und konstitutionelle (auch umweltassozierte) Erreger eingeteilt werden (Wendt 1994, Krömker 2007, Zoche 2011). Eine Übersicht hierzu liefert Tabelle 2. Die erste Gruppe zeichnet sich meist durch eine hohe Infektionsprävalenz bei geringgradiger Variabilität der Stämme und eine lange Infektionsdauer aus, wobei sie oft für subklinische Mastitiden verantwortlich sind. Bei der zweiten Gruppe verhält es sich meist umgekehrt. Die sogenannten Umwelterreger zeigen eine niedrige Prävalenz bei hoher Variabilität der Stämme und verursachen vorwiegend akute Mastitiden (De Kruif et al. 2014).

Tabelle 2 Einteilung häufiger Mastitiserreger nach Winter (2009) und De Kruif et al. (2014)

Gruppe	Gram-positiv	Gram-negativ	Sonstige	Prophylaxe
kuhassoziert	<i>S. aureus</i> <i>S. agalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i>		<i>Mycoplasma</i> spp.	Erregerver- schleppung während Melkakt vermeiden
	<i>C. bovis</i>			

Gruppe	Gram-positiv	Gram-negativ	Sonstige	Prophylaxe
umweltassoziiert	<i>S. uberis</i> <i>S. dysgalactiae</i> <i>S. equinus</i> <i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Nocardia</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. Hefen Pilze	Hygiene verbessern, Euter- reinigung
Sonstige	koagulase- negative Staphylokokken <i>A. pyogenes</i>			Hygiene verbessern, Euter- reinigung Fliegen- bekämpfung

Die Zuordnung zu einer der Gruppen ist jedoch nicht immer möglich. So kann beispielsweise *Streptococcus uberis* als klassischer umweltassoziierter Erreger kontagiöses Verhalten zeigen (Zadoks et al. 2001). Schukken et al. (2008) distanzieren sich von dem klassischen Konzept der Erregereinteilung unter Berufung auf mehrere Studien, die Beispiele für abweichendes Verhalten einiger Bakterienstämme darlegen. Sie schlagen eine Zuordnung der Mastitiserreger auf Stamm-Ebene vor und prägen den Begriff *host adapted* für Erreger, die leicht von Kuh zu Kuh übertragen werden. Im Gegensatz dazu sprechen sie von opportunistischen Stämmen, die schwere Infektionen beim Einzeltier verursachen.

Eine weitere Einteilung orientiert sich am pathophysiologischen Verhalten der Erreger und bezeichnet *Corynebacterium bovis* und koagulasenegative Staphylokokken (KNS) als „Minor Pathogens“, alle übrigen als „Major Pathogens“ (Wendt 1994).

Im Falle einer Mastitis ist die Identifizierung des verursachenden Erregers und ein Antibioogramm unabdingbar für eine erfolgreiche Behandlung. Auch für ein Vorgehen auf Herdenebene ist die Benennung sogenannter Leitkeime von großer Bedeutung (Krömker 2007).

Als Goldstandard für die Erregerdiagnostik gelten weltweit konventionelle mikrobiologische Methoden (Rossmannith und Fehlings 2013), denen eine aseptische Probenahme, wie in den Leitlinien der DVG beschrieben, vorausgehen muss (DVG 2009). Folgend werden 0,01 mL Milch auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und anschließend für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine erste Beurteilung und ggf. Anzucht auf Selektivnährböden erfolgt nach 24 Stunden. In der Routinediagnostik folgt hierauf eine quantitative Empfindlichkeitsbestimmung zur Erleichterung der Wahl eines passenden Antibiotikums (DVG 2009).

Probleme ergeben sich hierbei für den behandelnden Tierarzt zum einen durch die Wartezeit während der Anzucht, zum anderen durch Proben ohne Erregernachweis. Der Anteil von Milchproben von Fällen klinischer Mastitis, bei denen keine Erregernachzucht gelingt, liegt bei 20 bis 30% (Taponen et al. 2009). Die Autoren beschreiben hier einen noch größeren Anteil für Proben von Fällen subklinischer Mastitis mit 28,7 bis 38,6% ohne Erregernachweis. Eine Ringstudie, die Proben sowohl von Fällen klinischer und subklinischer Mastitis als auch Proben aus Mastitis-Kontrollprogrammen betrachtet, gibt sogar einen Prozentsatz von 49,7 für Proben ohne Erregernachweis an (Makovec und Ruegg 2003).

Weiterhin stellt sich das Problem der häufigen Isolierung von *Minor Pathogens* auch in Milchproben mit hoher somatischer Zellzahl, obwohl diese Erreger im Vergleich zu den *Major Pathogens* seltener für hohe Zellzahlen verantwortlich zu sein scheinen (Pitkala et al. 2004). KNS und *C. bovis* werden in mehreren großen Studien als die am häufigsten isolierten Bakterien angegeben (Makovec und Ruegg 2003, Pitkala et al. 2004).

Verschiedene Methoden wurden bisher getestet, um den aufgeführten Problemen entgegenzutreten. Ein kontrovers diskutierter Ansatz ist im Einfrieren der Milchproben vor der Kultivierung zu sehen. Eine Studie hierzu, die 182 Proben untersuchte, stellte keinen Einfluss auf die Nachweisrate für Streptokokken und *S. aureus*, eine Abnahme des Nachweises für *E. coli* und *A. pyogenes* und einen Anstieg für den Nachweis von KNS fest (Schukken et al. 1989). Andere Autoren kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Dinsmore et al. 1992), wohingegen sich das Einfrieren und eine anschließende Inkubation in Glukose-Bouillon als der einfachen Plattierung deutlich überlegen darstellen konnte (Sol et al. 2002). Weiterhin wurde erfolgreich versucht, den Anteil der Milchproben ohne Erregernachweis durch eine Erhöhung der zur Kultivierung eingesetzten Probemenge von 0,01 mL auf 0,1 mL zu erhöhen (Krömker 2013).

Seit Mitte der 1990er Jahre sind Publikationen zum Nachweis von Mastitiserregern mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu finden. Eine ausführliche Referenzliste kann der „Stellungnahme des Sachverständigenausschusses zur Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Mastitisdiagnostik“ entnommen werden (DVG 2010). Die dort benannten Vor- und Nachteile des Einsatzes der PCR in der Mastitisdiagnostik sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Vorteile und Nachteile des Einsatzes der PCR in der Mastitisdiagnostik nach DVG (2010)

Vorteile	Nachteile
Diagnose innerhalb von Stunden möglich	hohe Kosten (Reagenzien/Testkits, Geräte)
hohe Sensitivität und Spezifität	Falsch-positive Befunde möglich durch <ul style="list-style-type: none"> - Kontamination vor Probenahme - Kontamination bei Probenahme - Kreuzkontamination bei Probenaufbereitung
vereinfachter Nachweis von schwer anzüchtbaren Erregern (z.B. <i>Mycoplasma</i> spp.)	
Erregernachweis bei kulturell negativen Proben möglich, z.B. nach Vorbehandlung	Falsch-negative Befunde möglich durch <ul style="list-style-type: none"> - Störfaktoren im PCR-Ansatz - Mutationen in Zielsequenz der Primer - Zerstörung der Ziel-DNA durch Kontamination mit DNAsen - eingeschränktes diagnostisches Spektrum
Identifizierung kultureller Isolate	
Typisierung von Isolaten für epidemiologische Zwecke, Nachweis von Virulenzfaktoren	ätiologische Bedeutung nachgewiesener Erreger fraglich

Vorteile	Nachteile
Möglichkeit der Automatisierung	Überprüfung von Therapieerfolg nur mit genügend zeitlichem Abstand möglich, da auch nicht vermehrungsfähige Erreger nachgewiesen werden
	Resistenztests nur als Nachweis von Resistenzgenen bei bestimmten Spezies, phänotypische Ausprägung nicht überprüfbar
	hoher Aufwand für Standardisierung und Qualitätskontrolle

Mit dem PathoProof™ Mastitis PCR Assay (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnland) wird ein Testkit für den Nachweis von Mastitiserregern mittels Multiplex-PCR kommerziell vertrieben. Der Assay soll den Nachweis von speziesspezifischen DNA-Sequenzen von bis zu 15 Mastitiserregern und dem Beta-Lactamase-Gen für Penizillinresistenz bei Staphylokokken ermöglichen. Eine Studie, die den Test mit 643 Kulturisolaten aus Proben von Fällen boviner Mastitis, sowie von Proben von Menschen und Haustieren einsetzte, kam bei einer mit 100 % angegebenen Sensitivität zu dem Ergebnis einer Spezifität des Tests von 99 Prozent für *S. uberis*, 99,5 Prozent für *E. coli* und 100 Prozent für alle weiteren getesteten Bakterien (Koskinen et al. 2009). Ein Vergleich des Tests mit konventionellen kulturellen Methoden wurde an 50 Milchproben von Fällen subklinischer Mastitis durchgeführt (Schlez et al. 2012). Hierbei konnten mittels PathoProof™ bei allen Proben Erreger innerhalb von 3 bis 4 Stunden nachgewiesen werden, wohingegen die kulturelle Methode bei 3 Proben ohne positiven Befund blieb. Allerdings wurden in der Studie beinahe alle in Tabelle 3 aufgeführten Nachteile der PCR-Diagnostik aufgezeigt. So konnten erwartungsgemäß nicht alle in Frage kommenden Erreger nachgewiesen werden und eine ätiologische Beurteilung der zumeist mehrfach positiven Ergebnisse erwies sich als schwierig. Weiterhin beschreibt die Autorin die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen bei dieser Multiplex-PCR-Technik, aufgrund der möglicherweise nicht für alle Komponenten gleich stringenten Reaktionstemperaturen (Schlez et al. 2012).

Der Einsatz der PCR zur Identifizierung von Mastitiserregern aus Milchproben sollte daher nur für folgende Indikationen erfolgen (DVG 2010):

- ergänzende Diagnostik bei akuter klinischer Mastitis
- Screening auf kontagiöse Erreger
- Nachweis schwer anzüchtbarer Erreger
- Identifizierung kultureller Isolate
- Typisierung von Isolaten

Ein anderer Ansatz zur Identifizierung von Mastitiserregern liegt in der Geruchsdetektion. Hier wird versucht, valide Verfahren mittels Gaschromatografie oder „elektronischen Nasen“ zu etablieren (Fischer-Tenhagen 2013).

2.3 Dippmittel

2.3.1 Dippmittel zur Mastitisprophylaxe

Die Anwendung von Zitzentauch- oder –sprühverfahren verfolgt das Ziel, die Zitzenhaut, vor allem im Bereich der Zitzenkuppe, zu desinfizieren und somit Mastitiserreger zu beseitigen. Auch die Pflege der durch den Melkvorgang beanspruchten Haut trägt wesentlich zur Wirksamkeit eines Dippmittels bei (Hansen und Hamann 2003). Auf Präparate, die ausschließlich zur Zitzenhautpflege angewandt werden, wird im Folgenden nicht eingegangen.

Das Desinfizieren der Zitzen nach dem Melkvorgang, auch als „Dippen“ oder „Postdip-Verfahren“ bezeichnet, gilt als weltweit anerkannte Maßnahme zur Mastitisprophylaxe (Neave et al. 1969, Natzke et al. 1972, Pankey et al. 1984, Hansen und Hamann 2003, Williamson und Lacy-Hulbert 2013), ohne jedoch Einfluss zu nehmen auf bereits bestehende intramammäre Infektionen. Demnach ist die Rate der Neuinfektionen während der Anwendung eines Dippmittels der wichtigste Parameter zur Beurteilung von dessen Wirksamkeit. Durch Dippen oder Spraysen nach dem Melken kann die Neuinfektionsrate um mindestens 50 Prozent gesenkt werden (Nickerson 2001, Hansen und Hamann 2003). Bei Einhalten eines Mastitis-Kontroll-Programmes, durch Dippen der Zitzen zum einen und antibiotisches Trockenstellen zum anderen, konnte neben einer Senkung der Neuinfektionsrate auch eine Steigerung der Milchproduktion beobachtet werden (Natzke et al. 1972).

Die erste Beschreibung eines auf Pinienöl basierenden Zitzendippmittels zur Reduktion von *Streptococcus agalactiae* ist im Jahr 1916 durch Moak zu finden (Pankey et al. 1984). Nachfolgende Studien zum Dippmittel-Einsatz beschäftigten sich mit verschiedenen Inhaltsstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen (Philpot und Pankey Jr 1975). Weiterhin wurden Methoden zur Evaluation der Effektivität von Dippmitteln erarbeitet (Farnsworth et al. 1976, Hogan et al. 1990).

Der National Mastitis Council (NMC) der USA schlägt Protokolle zum Testen von Dippmitteln vor und listet in regelmäßigen Abständen Inhaltsstoffe von Dippmitteln und zugehörige Studien, wenn diese Studien nach vorgeschlagenen Protokollen durchgeführt worden sind. Gelistete Studien müssen außerdem entweder den Handelsnamen des Produktes oder eine Angabe zum Hersteller enthalten und in begutachteten wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht worden sein (Nickerson 2001).

In Deutschland wird von der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) ein Gütesiegel für Dippmittel vergeben. Die Produkte werden vorab auf folgende Eigenschaften geprüft:

- gute Hautpflegewirkung
- keine Weiterverbreitung von Mastitiserregern
- kein Hemmstoffeintrag in die Milch
- Freisein von unerwünschten Stoffen

Gelistet sind hier momentan 64 Zitzentauchmittel und 14 in Deutschland zusätzlich als Tierarzneimittel zugelassene Zitzentauchmittel.

2.3.2 Inhaltsstoffe von Dippmitteln

Zitzendippmittel setzen sich meist aus einer desinfizierenden, einer pflegenden und einer verdünnenden Komponente zusammen und können als Fertigpräparat oder Konzentrat erworben werden. Sie sollten die geringste Menge Desinfektionsmittel enthalten, mit deren Konzentration sie noch wirken (Winter 2009).

Dippmittel mit Iod als desinfizierende Komponente gelten als effizient und werden in Konzentrationen von 0,05 bis 1 %ig zum Einsatz gebracht (Nickerson 2001). Ein Vorteil der Anwendung liegt in der Färbung der behandelten Zitzen, was eine Kontrolle der Behandlung erleichtert (Blowey und Edmondson 1996). Als ein Nachteil iodhaltiger Präparate ist die Bildung von Ioddämpfen anzusehen, was vor allem bei Sprühapplikation zu bedenken ist. Ioddämpfe können zu Irritationen des Respirationstraktes von Mensch und Tier führen (Falkenberg 2002). Da Iod nur begrenzt löslich ist (300 ppm), werden Tenside zur Komplexbildung eingesetzt. Die so entstandenen Lösungen werden als Iodophore bezeichnet. Ihre antimikrobielle Wirkung entsteht durch Oxidation organischer Substanzen durch freies Iod. Hierzu wird kontinuierlich freies Iod aus den Komplexen zur Verfügung gestellt, da ein chemisches Gleichgewicht vorliegt (Pankey et al. 1984). Durch Oxidation halogenempfindlicher Enzymgruppen in Mikroorganismen wird eine Wirkung gegen alle Mastitiserreger, die meisten Pilze, Viren und Sporen erreicht (Nickerson 2001). Iodophore reagieren mit jeglichem organischem Material, weshalb ihre Wirksamkeit bei Anwendung auf stark verschmutzten Zitzen herabgesetzt ist.

Da Iodophore der Haut Fette entziehen, sind den meisten iodhaltigen Zitzendippmitteln rückfettende und pflegende Komponenten zugesetzt.

Der Tabelle 4 sind einige weitere mögliche desinfizierende Komponenten von Dippmitteln zu entnehmen.

Tabelle 4 Beispiele gebräuchlicher Desinfektionsmittel zum Zitzendippen

Desinfektionsmittel	Empfohlene Wirkstoffkonzentration	Besonderheiten	Referenz zu Feldversuchen nach Protokollen des NMC
Iod	freies Iod : 6-12 ppm ¹ bzw. 0,05-1% Iod ²	Irritation der Haut (Fettentzug) ¹	Foret et al. (2005), Leslie et al. (2005)
Chlor	Saures Natriumhypochlorit: 0,32% ¹ (bestehend aus Aktivator und Base)	Hautirritationen ^{1,2} , muss täglich zubereitet werden ² , Präparate trocknen auf Zitzenhaut und hinterlassen einen Film ²	Hillerton et al. (2007), Boddie et al. (1994)
Chlorhexidin	als –gluconat oder –acetat: 0,35-0,55% ¹	hautpflegend, geringe Inaktivierung durch organische Kontamination ³ bei starker Verunreinigung können <i>Serratia</i> spp. und <i>Pseudomonas</i> spp. überleben ² , stabil ³	Boddie et al. (1997), Hogan et al. (1995)
Quartäre Ammonium-Verbindungen	Bromide oder Chloride: 0,05-0,1% ¹	hautschonend, ungiftig ² <i>Serratia</i> spp. und <i>Pseudomonas</i> spp. überleben ² stabil ³	Stewart und Philpot (1982), Pankey und Watts (1983)
Dodecyl-Benzen-Sulfonsäure (DDBSA)	2% ¹	hautschonend, sehr stabil ¹ , eingeschränkte Effektivität bei pH>3,5-4 ⁵	Pankey et al. (1984), Pankey et al. (1985)
Hydrogenperoxid	k.A. Kombination mit Milchsäure möglich ¹	die Kombination mit Milchsäure beschleunigt das Abschilfern toter Hautzellen im <i>Stratum corneum</i> und verbessert so die Zitzenhautkondition ²	Leslie et al. (2006)
Fettsäure-Produkte	Fettsäure: 1% ¹	lipophil, daher entweder in organischem Lösungsmittel gelöst oder mit Emulgatoren versetzt ³ , bei sehr kalten Bedingungen eignen sich Produkte mit organischen Lösungsmitteln ³	Boddie und Nickerson (1992)

¹ Winter (2009), ² Nickerson (2001), ³ Hansen und Hamann (2003), ⁴ NMC (2013), ⁵ Pankey et al. (1984)

2.4 Probiotika

2.4.1 Definition

Positive Wirkungen von später als Probiotika bezeichneten Mikroorganismen auf den Menschen legte als erster É. Metchnikoff nahe (Görke und Liebler-Tenorio 2001). Geprägt wurde der aus dem Griechischen stammende Begriff „probiotisch“ erstmals von Lilly und Stillwell (1965). Sie beschreiben damit eine vom Einzeller *Colpidium campylum* ausgeschiedene, thermostabile aber nicht weiter charakterisierte Substanz, die das Wachstum von *Tetrahymena pyriformis* fördert. Aufgrund der wachsenden Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten für Probiotika hat sich ihre Definition in den letzten knapp 50 Jahren maßgeblich geändert. So versteht man heute unter Probiotika „lebende Mikroorganismen, die bei Verabreichung in ausreichender Menge eine positive Wirkung auf den menschlichen oder auch tierischen Organismus ausüben“ (FAO/WHO 2001). Somit ist auch eine Abgrenzung in Hinsicht auf Präbiotika gegeben, die von Dünndarmenzymen nicht hydrolysierbare Substanzen darstellen, welche im Dickdarm das Wachstum und/oder die Aktivität apathogener Keime fördern (Gibson und Roberfroid 1995). Synbiotika stellen eine Kombination aus probiotischen Mikroorganismen und präbiotisch wirkenden Substraten dar (Ölschläger 2009).

2.4.2. Wirkmechanismus und Anwendungsgebiete

Als Probiotika wird eine recht heterogene Gruppe von Bakterien, Hefen und Pilzen eingesetzt (Görke und Liebler-Tenorio 2001). So kommen neben Gram-positiven Bakterien wie beispielsweise *Lactobacillus*- oder *Bacillus*-Arten auch Gram-negative Mikroorganismen wie z.B. *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 sowie Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* und Schimmelpilze wie *Aspergillus niger* zum Einsatz. Hierbei werden sowohl Mono- als auch Mischkulturen verwendet.

Allein die große Bandbreite an eingesetzten Organismen legt nahe, dass die Wirkmechanismen nicht verallgemeinernd für alle Probiotika gelten können. Bisher konnten jeweils für bestimmte Bakterien Mechanismen ihrer Effekte beschrieben werden, die in Tabelle 5 mit zugehörigen Studien dargestellt sind.

Tabelle 5: Wirkmechanismen von Probiotika, modifiziert nach Ohashi und Ushida (2009) und Görke und Liebler-Tenorio (2001)

Wirkmechanismus	Referenz
auf den Wirtsorganismus	
Wachstumsstimulation indigener Mikroorganismen	Ohashi et al. (2001)
→ Steigerung der Produktion kurzkettiger Fettsäuren	Tsukahara et al. (2006)
→ Immunmodulation	Guarner und Malagelada (2003)
→ Wachstumsinhibition und Exklusion von Pathogenen	
→ Konkurrenz mit Pathogenen um Anheftungsstellen	Gueimonde et al. (2007)

Wirkmechanismus	Referenz
Einfluss auf die Schleimhautarchitektur (z.B. Zottenlänge und – breite im Jejunum, Anzahl Becherzellen)	Jahn et al. (1996) Görke (2000) Buts et al. (1990)
Veränderung von Permeabilität und Transportmechanismen der Darmschleimhaut	Winckler et al. (1998) Breves (1997) Ohashi und Ushida (2009)
Immunmodulation	Buts et al. (1990) Petzoldt (1986) Delcenserie et al. (2008)
auf Pathogene	
Kompetition um Anheftungsstellen und Nährstoffe	Davidson und Hirsh (1976) Muralidhara (1973)
Antagonisierung durch Metabolite oder Agglutination	Floch et al. (1972) Oxford (1944) Gedek (1975)
Neutralisation bakterieller Toxine	Brandao et al. (1998) Castagliuolo et al. (1996)

2.4.3 *Lactococcus lactis* und das Bacteriocin Nisin im Einsatz am und im Euter

Laktokokken gehören wie auch die Gattungen *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Enterococcus* der Gruppe der Milchsäurebakterien an. Sie liegen in Paaren oder kurzen Ketten vor, sind Katalase- und Oxidase-negativ und fakultativ anaerob. Aufgrund ihres Temperaturoptimums von 20 bis 30 °C sind Laktokokken als mesophile Organismen einzuordnen.

Die *Lactococcus lactis*-Unterarten sind *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* und *Lactococcus lactis* subsp. *tractae*. Neben dem Einsatz als Starterkultur in der Käseproduktion, der Konservierung von Lebens- sowie Futtermitteln und beim Backen werden diese Bakterien auch für medizinisch indizierte Zwecke verwendet oder finden als Probiotika Anwendung.

Der in dieser Arbeit verwendete *Lactococcus lactis* – Stamm LAC 0125 der Firma Lactosan GmbH & Co KG ist zur Produktion des Bacteriocins Nisin fähig.

Nisin wird als antimikrobielles Peptid beschrieben, das gegen eine große Anzahl Gram-positiver Bakterien wirksam ist. Hierunter fallen auch bedeutende Mastitiserreger (Sears et al. 1992, Delves-Broughton et al. 1996, Wu et al. 2007, Piper et al. 2009). Hervorzuheben ist die Fähigkeit zur Bindung von Lipid II, einer wichtigen Komponente der bakteriellen Zellwandsynthese. Des Weiteren wird hierdurch die Bildung eines Poren-Komplexes ermöglicht (Wiedemann 2001). So generiert Nisin eine 2 nm große Pore in der Bakterienmembran, die letztendlich zum Zelltod führen kann, was nachgewiesen wurde mittels Kernspinresonanzspektroskopie (Hsu 2002). Nisin ist außerdem zur Induktion der Autolyse empfänglicher *Staphylococcus*-Stämme fähig (Piper et al. 2009).

Bei der Suche nach Alternativen zur antibiotischen Behandlung von subklinischen und klinischen Mastitiden gab es bereits mehrere Ansätze, Probiotika und/oder Bakteriocine einzusetzen. Hierbei wurden vorwiegend Kulturen und Substrate herangezogen, die bereits in der Lebensmittelproduktion zum Einsatz kommen, wie beispielsweise Lacticin und Nisin (Piper et al. 2009).

So testeten Sears et al. eine nisinhaltige Formulierung auf ihre bakterizide Wirkung, wofür nach der Behandlung Mastitiserreger auf die Zitzenhaut aufgebracht wurden (Sears et al. 1992). Hierbei konnte eine Wirksamkeit festgestellt werden, die der einer 1%igen Iodlösung gleichzusetzen war. Im Vergleich zu Präparaten mit geringeren Iodkonzentrationen von 0,1 und 0,5%, sowie zu Formulierungen mit 0,5% Chlorhexidin erzielte der Nisin-Dipp sogar eine bessere Wirkung, ohne Hautirritationen auszulösen.

Ein zur Anwendung im „Pre- und Postdipping“ entwickeltes Produkt wurde in zwei Studien im Vergleich mit einem Iod-Dippmittel getestet (Sears et al. 1992, Serieys und Poutrel 1996). Die Autoren beider Studien fanden eine der Kontrolle gleichwertige Effizienz des nisinhaltigen Dippmittels. Bei Anwendung vor und nach dem Melken konnte sogar eine noch bessere Wirkung insbesondere auf *S. aureus* und *S. agalactiae* verzeichnet werden (Sears et al. 1992).

Cao et al. konnten eine der Antibiotika-Therapie gleichgestellte Wirkung von Nisin bei klinischer Mastitis beobachten (Cao et al. 2007). Sie wendeten bei 92 Milchkühen mit 107 klinisch erkrankten Vierteln eine intramammäre Therapie mit Nisin (51 Viertel) beziehungsweise Gentamicin (56 Viertel) an. Es zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der nicht mehr als klinisch einzustufenden Fälle sowie bei der Entwicklung der somatischen Zellzahl. Die Autoren heben hervor, dass bei 17 Isolaten von *S. aureus* bei 82,5 % Resistenzen gegenüber Penicillin und bei 35,3 % Resistenzen gegenüber Gentamicin, jedoch keine Resistenzen gegenüber Nisin vorlagen.

Auch bei subklinischer Mastitis wird von einem hohen therapeutischen Effekt von Nisin mit Heilungsraten von bis zu 90% bei Infektionen mit *Streptococcus agalactiae* und 50% bei *Staphylococcus aureus*-Infektionen berichtet (Wu et al. 2007). Hierzu wurden 90 subklinisch erkrankte Tiere randomisiert in eine mit Nisin behandelte Gruppe (46 Tiere) und eine Kontrollgruppe (44 Tiere) eingeteilt. Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden nach einer dreitägigen intramammären Behandlung mit Nisin bzw. ohne Behandlung in der Kontrollgruppe anhand von Probenahmen 1 und 2 Wochen später ermittelt.

Bereits 1949 wurde eine Suspension von Nisin in Fällen subklinischer Mastitis, verursacht durch *Streptococcus agalactiae* und Staphylokokken, eingesetzt (Taylor et al. 1949). Hierbei wurde 3 klinisch und 34 subklinisch an einer *Streptococcus agalactiae*-Infektion erkrankten Tieren einmalig eine Suspension mit 5 Millionen internationalen Einheiten Nisin intramammär infundiert. Des Weiteren wurden 10 klinisch und 27 subklinisch erkrankte Tiere mit 2,5 Millionen internationalen Einheiten Nisin pro mL behandelt. Im ersten Fall waren nach 21 Tagen bei 37 Tieren keine klinischen Fälle mehr nachweisbar, im zweiten Fall waren es 33 Tiere, wobei hier keine Unterscheidung der zuvor klinisch oder subklinisch erkrankten Tiere erfolgte. Weiterhin wurden 10 Tiere mit einer subklinischen *Staphylococcus aureus*-Infektionen mit 5 Millionen Einheiten Nisin pro mL behandelt, wobei nur ein Tier nach 21 Tagen positiv bakteriologisch getestet wurde. Hingegen bewirkte die Therapie mit 2,5 Millionen internationalen Einheiten Nisin pro mL bei 2 Tieren mit einer klinischen *Streptococcus dysgalactiae*-Infektionen keine klinische Besserung.

Auch die intramammäre Anwendung lebender *L. lactis*-Kulturen wurde in Fällen von subklinischer wie auch klinischer Mastitis getestet (Crispie et al. 2008, Klostermann et al. 2008, Klostermann et al. 2010). In einer Studie mit jeweils 11 chronisch subklinisch erkrankten Eutervierteln konnte eine zur antibiotischen Behandlung mit einem

handelsüblichen Präparat (Amoxicillin, Clavulansäure und Prednisolon) gleichwertige Erregereliminierung und Reduktion der Zahl somatischer Zellen verzeichnet werden (Klostermann et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse wurden im zweiten Versuch dieser Studie erzielt. Hier wurden jeweils 25 klinisch erkrankte Viertel mit der *L. lactis*-Kultur bzw. einem im Handel erhältlichen Präparat, welches neben Penethamathydrojodid, Dihydrostreptomycinsulfat und Framycetinsulfat auch Prednisolon enthält (Leo Yellow[®], Leo Laboratories Limited, Irland), behandelt. In beiden Versuchen wurden keine AntibioGramme erstellt.

Die intramammäre Infusion einer lebenden *L. lactis*-Kultur bei 3 gesunden Kühen an jeweils einem Viertel führte zu einer starken lokalen Immunantwort, wohingegen die als Kontrolle dienenden unbehandelten und mit einer Antibiose behandelten Viertel unverändert blieben (Crispie et al. 2008). Die Immunantwort stellte sich durch eine vermehrte Rekrutierung von PMN und Lymphozyten dar, aber auch ein Anstieg von Akute-Phase-Proteinen wurde gemessen. Beides konnte bei Anwendung des Zellüberstandes anstelle der lebenden Kultur nicht festgestellt werden.

Aufgrund potentiell protektiver Eigenschaften, wie Oberflächeneigenschaften und die Bildung antagonistischer Substanzen, wurden eine *Lactococcus lactis*-Spezies sowie 4 weitere Mikroorganismen aus 102 von der Zitzenhaut isolierten Milchsäurebakterien ausgewählt. Sie sollten in nachfolgenden Studien die Basis für Produkte zur Mastitisprävention darstellen (Espeche et al. 2009).

Momentan sind nisinhaltige Eutertücher auf dem Markt (Wipe Out[®], ImmuCell, Portland, USA) erhältlich und ein nisinhaltiger Euterinjektor befindet sich in der Entwicklung. Er soll als Alternative zur antibiotischen Behandlung bei Mastitiden zum Einsatz kommen und in den USA ohne Wartezeit auf Milch und Fleisch unter dem Namen Mast Out[®] (ImmuCell, Portland, USA) vertrieben werden (ImmuCell 2014).

2.5 Fragestellung dieser Arbeit

Die Wirtschaftlichkeit eines Milchviehbetriebes hängt in hohem Maße von der Eutergesundheit ab. Das Dippen der Zitzen nach dem Melken stellt eine weit verbreitete präventive Maßnahme dar. Bisher werden hierzu vorrangig Produkte eingesetzt, die eine desinfizierende und eine pflegende Komponente enthalten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein lebender *Lactococcus lactis*-Laborstamm als Zitzendippmittel eingesetzt und die Entwicklung ausgesuchter klinischer Parameter beobachtet.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Dem Feldversuch vorangegangene *in-vitro* Untersuchungen

3.1.1 Kokultivierung zur Beurteilung der Wachstumsbeeinflussung von *Lactococcus lactis* und *Staphylococcus aureus*

Zur Beurteilung einer eventuellen Wachstumsbeeinflussung von *Staphylococcus aureus* durch *Lactococcus lactis* und *vice versa* wurden Mikrotiterplatten mit beiden Bakterien in unterschiedlichen Konzentrationen als Mehrfachansatz beimpft, inkubiert und ihr Wachstum mittels Trübungsmessung [690 nm] beobachtet (Kokultivierung). Anschließend wurde eine DNA-Extraktion der Proben vorgenommen und die Bakterienstämme mittels Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) quantifiziert.

3.1.1.1 Stämme und Inkubationsbedingungen

Die für die Kokultivierung verwendeten Stämme waren *Lactococcus lactis* LAC 0125 und *Staphylococcus aureus* DSM 6732. Der *L. lactis*-Stamm stammte von der Firma Lactosan GmbH & Co KG, Kapfenberg, Österreich und ist zur Produktion von Nisin fähig. *S. aureus* wurde bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland, bezogen und stellt ein Isolat aus einem bovinen Euter dar. Für den Versuch wurden beide Stämme in einer Übernachtskultur in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) kultiviert. Der *L. lactis*-Stamm wurde aus dem Dippmittel-Pulver, der *S. aureus*-Stamm wurde aus einer Kryokultur kultiviert und vor dem Versuch über Nacht in TSB inkubiert. Aus diesen Flüssigkulturen wurden Zellzahlbestimmungen mittels Thomakammer vorgenommen. Die Zellzahlen wurden mit Peptonwasser auf 10^8 Zellen pro mL eingestellt und dekadisch verdünnt. Verdünnungen jedes Stammes von 10^2 bis 10^5 Zellen pro mL wurden für die Kokultivierung verwendet. Hierdurch entstanden 16 verschiedene Versuchsansätze (Tabelle 6), die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Für jeden Ansatz wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 160 μ l TSB-Medium und je 20 μ l einer Suspension der beiden Stämme befüllt, sodass die Endkonzentration von je 10^2 bis 10^5 Zellen pro mL pro Stamm eingesetzt wurde (Tabelle 6). Die anschließende Inkubation erfolgte aerob bei 37 °C für 9 Stunden. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Photometers (Tecan infinite M200 Pro, Fa. Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) in Abständen von 5 min aufgenommen und von der Software des Gerätes gespeichert.

Tabelle 6 Pipettierschema Co-Kultivierung [Zellen/mL]

<i>L. lactis/S. aureus</i>						<i>L. lactis</i>	<i>S. aureus</i>	TSB
$10^2 / 10^2$	$10^2 / 10^2$	$10^2 / 10^2$	$10^2 / 10^4$	$10^2 / 10^4$	$10^2 / 10^4$	10^2	10^2	200µl
$10^3 / 10^2$	$10^3 / 10^2$	$10^3 / 10^2$	$10^3 / 10^4$	$10^3 / 10^4$	$10^3 / 10^4$	10^3	10^3	200µl
$10^4 / 10^2$	$10^4 / 10^2$	$10^4 / 10^2$	$10^4 / 10^4$	$10^4 / 10^4$	$10^4 / 10^4$	10^4	10^4	200µl
$10^5 / 10^2$	$10^5 / 10^2$	$10^5 / 10^2$	$10^5 / 10^4$	$10^5 / 10^4$	$10^5 / 10^4$	10^5	10^5	200µl
$10^2 / 10^3$	$10^2 / 10^3$	$10^2 / 10^3$	$10^2 / 10^5$	$10^2 / 10^5$	$10^2 / 10^5$	10^2	10^2	200µl
$10^3 / 10^3$	$10^3 / 10^3$	$10^3 / 10^3$	$10^3 / 10^5$	$10^3 / 10^5$	$10^3 / 10^5$	10^3	10^3	200µl
$10^4 / 10^3$	$10^4 / 10^3$	$10^4 / 10^3$	$10^4 / 10^5$	$10^4 / 10^5$	$10^4 / 10^5$	10^4	10^4	200µl
$10^5 / 10^3$	$10^5 / 10^3$	$10^5 / 10^3$	$10^5 / 10^5$	$10^5 / 10^5$	$10^5 / 10^5$	10^5	10^5	200µl

3.1.1.2 DNA-Extraktion

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Dreifachansätze vereinigt und abzentrifugiert (10 min, 17.000 x g, 4 °C). Die Überstände wurden zwecks Stabilisierung der RNA und damit möglicher späterer Analyse der Genexpression mit 100 µl RNA LATER versetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und bei -30 °C eingefroren.

Zur anschließenden DNA-Extraktion wurde das halbe Probenvolumen (50 µl) eingesetzt und die Arbeitsschritte des „Protokolls für Bakterien“ des NucleoSpin® Tissue-Kits (Macherey Nagel, Düren) eingehalten. Eine Ausnahme stellte hierbei der Lyseschritt dar. Um die Lyse der Gram-positiven Zellwände zu erleichtern, wurden die Zentrifugate der Kokulturen nach Zentrifugation (10 min, 17.000 x g, 4 °C) für 30 min bei 37°C mit einer Lysozym-Lösung (40 mg/mL) inkubiert.

3.1.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, die Zielgene und Primersequenzen sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Quantifizierung der Ziel-DNA wurde mit dem Real-Time PCR-Cycler Mx3000P® (Stratagene, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Das entsprechende PCR-Programm und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Zubereitung des Master Mixes erfolgte nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland), wobei mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green® gearbeitet wurde.

Tabelle 7 Verwendete PCR –Primersequenzen und Zielgene

Gen	Primer	Produktgröße	Primersequenz (5' → 3')	Referenz
16S rDNA	Lac 1	351 bp	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	Rinttila et al. (2004)
	Lac 2		CACCGCTACACATGGAG	
nuc	nuc2 F	284 bp	GCGATTGATGGTGATACGGT	Kateete et al. (2010)
	nuc2 R		T AGCCAAGCCTTGACGAACTA AAGC	

Tabelle 8 Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter

Zyklus	Zyklenzahl	Temperatur/Zeit
Aktivierung	1x	95 °C/15 min
Amplifizierungszyklus	40x	
Denaturierung		95 °C/30 s
Primerhybridisierung		60 °C/30 s
Elongation		72 °C/30 s
Schmelzkurve	1x	95 °C/1 min
		60 °C/30 s
		95 °C/30 s

3.1.1.4 Herstellung von Kalibrierreihen zur Quantifizierung der Kopienzahlen der Zielgene

Um eine exakte Quantifizierung der PCR-Ergebnisse zu ermöglichen, wurden PCR-Produkte der Zielgene verwendet. Hierzu wurden PCR-Produkte von *Lactococcus lactis* LAC 0125 und *Staphylococcus aureus* (DSM 6732) aus Kultur-DNA hergestellt und aufgereinigt (QIAquick® Aufreinigungs-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Zur Quantifizierung der DNA und Verifizierung der korrekten PCR-Produktgröße wurden die PCR-Produkte mit einem DNA Chip (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) gemessen. Aus der Produktgröße und DNA-Konzentration wurde dann die Kopienzahl des unverdünnten, aufgereinigten PCR-Produktes bestimmt. Dekadische Verdünnungen dieses PCR-Produktes wurden dann als Kalibrierproben in dem PCR-Assay verwendet, um die Kopienzahl der Zielgene in den Proben zu quantifizieren.

3.1.1.5 Auswertung

Für die Auswertung der Kokultivierung wurden nur die durch die Bakterien verursachten Trübungszunahmen herangezogen. Hierfür wurde die Differenz der gemessenen Werte und der Grundturbidität des Mediums gebildet. Anschließend wurden mit dem Programm SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) nichtlineare Regressionskurven modelliert, die der folgenden Formel entsprechen:

$$f = a / (1 + \exp(-(x - x_0)/b)).$$

Die ermittelten Funktionen weisen einen Bestimmtheitsgrad von mindestens 0,9 auf. Es wurden die lag-Zeit und das spezifische Wachstum berechnet.

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit der MxPro QPCR Software (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland). Zunächst wurden anhand der Schmelzkurvenanalyse spezifische und unspezifische PCR-Produkte bzw. positive und mögliche falsch-positive Signale ermittelt. Ergebnisse, die eine Abweichung des Schmelzpunktes von mehr als $\pm 0,5$ °C aufzeigten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Anhand der Kalibrierreihen wurden dann mittels der Software die Kopienzahlen der Zielgene in den Proben ermittelt.

3.1.2 PathoProof™ Mastitis PCR Assays

Der PathoProof™ Mastitis PCR Assay ist eine Multiplex-PCR, die 4 Primer-Mixe und 3 Sonden nutzt (Thermo Scientific, Waltham, USA). Entsprechend ist nach Herstellerangaben mit jedem Primer-Mix die Identifikation von 3 Erregern möglich. Die Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Bakterien, die mit den Oligonukleotiden des jeweiligen Primer-Mixes identifiziert werden sollten. Hierüber sollte eine Zuordnung der Fluoreszenz zu jedem eingesetzten Stamm ermöglicht werden. Da die Auswertung der PCRs in dieser Arbeit quantitativ erfolgen sollte, konnte die Herstellersoftware, die nur semiquantitative Ergebnisse erlaubt, nicht verwendet werden. Deshalb wurden dekadische Verdünnungen der DNA aus 10 verschiedenen Stämmen als Kalibrierproben verwendet (Tabelle 10). Zunächst wurden die zu testenden Stämme mit jedem Primer-Mix in einer PCR eingesetzt, um hieraus Kalibrierreihen zu erstellen.

Tabelle 9 Zuordnung der Bakterien und Primer-Mixe laut PathoProof™ Mastitis PCR Assay-Handbuch

Primer-Mix	zu detektierende Bakterien
1	<i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>C. bovis</i>
2	<i>E. coli</i> , <i>S. dysgalactiae</i>
3	<i>Staphylococcus</i> spp. (inklusive alle relevanten KNS), <i>S. agalactiae</i> , <i>S. uberis</i>
4	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Arcanobacterium pyogenes</i>

Die in Tabelle 10 aufgeführten Bakterien wurden zuvor zu den dort angegebenen Bedingungen kultiviert, die DNA extrahiert und der DNA-Gehalt mit einem Mikrovolumen-Spektrometer (Nano-Drop® ND-3300) bestimmt. Hierzu wurden 2 µl des zuvor 1:10 mit TE-Puffer (TRIS (PUFFERAN®)/EDTA, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und dem gleichen Volumen einer 1:5000-Verdünnung des Farbstoffs SYBR-Green® (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) versetzten DNA-Extrakts fluoressenzphotometrisch gegen eine Standardreihe gemessen. Im Folgenden wurden diese Extrakte als Kalibrierungsreihe für die nach dem Herstellerprotokoll angefertigten PCRs eingesetzt.

Tabelle 10 Anzuchtbedingungen der zur Quantifizierung des PathoProof™ Mastitis Assays eingesetzten Bakterien-Stämme

Name laut DSMZ	DSM-Nr.	Anzuchtbedingungen
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (Rosenbach 1884)	6732	TSB ¹ , 37 °C
<i>Streptococcus faecium</i> (Orla-Jensen 1919)	20477	BHI ² , 37 °C
<i>Corynebacterium bovis</i> (Bergey et al. 1923)	20582	TSB ¹ mit 5 % Schafblut, 37 °C
<i>Escherichia coli</i> ((Migula 1895) Castellani und Chalmers 1919)	2840	BHI ² , 37 °C

Name laut DSMZ	DSM-Nr.	Anzuchtbedingungen
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> ((ex Diernhofer 1932) Garvie et al. 1983 emend. Vieira et al. 1998)	20662	BHI ² und Anaerocult® C, 37 °C
<i>Streptococcus uberis</i> (Diernhofer 1932)	20569	TSB ¹ und Anaerocult® C, 37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ((Schroeter 1886) Trevisan 1887)	30104	TSB ¹ mit 5 % Schafblut, 37 °C
<i>Serratia marcescens</i> (Bizio 1823)	30122	BHI ² , 37 °C
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Lehmann and Neumann 1896)	2134	BHI ² und Anaerocult® C, 37 °C
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> ((Glage 1903) Pascual Ramos et al. 1997)	20594	PYG ³ , 37 °C

¹ Tryptic-Soja-Bouillon, ² Hirn-Herz-Infus-(BHI)-Medium, ³ PYG-Medium

3.1.2.1 Quantifizierung der Ergebnisse mit dem PathoProof™ Mastitis PCR Assay

Die Quantifizierung der PCR-Ergebnisse wurde analog zu der in 3.1.1.5 Auswertung beschriebenen Methode durchgeführt.

3.1.3 Weitere verwendete Geräte und Chemikalien der *in-vitro* Untersuchungen

Es wurde ausschließlich gefiltertes, UV-behandeltes und doppelt destilliertes Reinstwasser verwendet (TKA Thermo Scientific, Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert, Deutschland). Des Weiteren wurden alle Lösungen vor Gebrauch bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 1,013 x 10⁵ Pa für 20 min mit einem Dampfdruck-Autoklaven (Varioklav® Dampfsterilisator, H&P Labortechnik AG, Oberschleissheim, Deutschland) sterilisiert. Temperatursensitive Lösungen und Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße, VWR International, Leuven, Belgien). Die Zentrifugationsschritte wurden mittels einer Kühlzentrifuge (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei 4 °C bewerkstelligt.

Neben den in Tabelle 10 aufgeführten Bakterien-Stämmen, die bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland, bezogen wurden, sind die im Anhang aufgeführten Materialien zum Einsatz gekommen.

3.2 Anwendung eines *L. lactis*-haltigen Dippmittels im Feldversuch

3.2.1 Versuchsbetrieb

Die *in-vivo* Untersuchungen fanden auf Gut Hülsenberg in Wahlstedt an einer Milchviehherde der Rasse Deutsche Schwarzbunte mit im Jahr durchschnittlich 175 Kühen statt.

Im 4-monatigen Versuchszeitraum wurde eine durchschnittliche Milchleistung von 11.500 kg/Jahr bei 3,7% Fett und 3,2% Eiweiß erreicht, wobei die Milchkontrolle monatlich vom Landeskontrollverband Schleswig-Holstein durchgeführt wurde.

Das Melken fand zweimal täglich durch das Melkpersonal in einem Doppel-Zwölfer Side-by-Side Melkstand (Fa. BouMatic Gascoigne Melotte Sprl., Remicourt, Belgien) in möglichst zwölfstündigem Abstand statt. Die Melkhygiene gestaltete sich folgendermaßen: nach dem Vormelken und grobsinnlicher Beurteilung des Vorgemelkes durch das Melkpersonal wurden die Zitzen jeder Kuh mit einem neuen feuchten Eutertuch (Baumwolle) gereinigt. Anschließend wurde das Melkzeug angelegt. Nach automatischer Abnahme desselben wurden die Zitzen mit einem Dippmittel besprüht bzw. gedippt.

Die Eutergesundheit der Herde wurde regelmäßig tierärztlich überwacht.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war die Herde in Laufställen mit Hoch- sowie Tiefboxen untergebracht, welche mit Gummimatten mit Roggenstroh-Kalk-Einstreu ausgestattet waren. Die Einstreu wurde in wöchentlichem Abstand erneuert.

Die Fütterung erfolgte als Totale Mischration (TMR), welche zweimal täglich vorgelegt wurde. Als Grundlage der Ration dienten betriebseigene Mais- und Grassilage. Die TMR stand ad libitum zur Verfügung. Die Futteraufnahme je Kuh und Tag wurde aus der Vorlage und der Besatzdichte kalkuliert (Tabelle 11).

Tabelle 111 Kalkulierte Futteraufnahme pro Kuh und Tag [kg]

Komponente	TM
Maissilage	7
Grassilage	7
Kraftfutter	10
Futteraufnahme	24

Die Mischungsbestandteile der Kraftfutterkomponente sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12 Kraftfutterzusammensetzung

Einzelkomponente	Anteil im FM [%]
Raps	30,0
Körnermais	24,0
Sojaschrot	15,0
Melasse-Schnitzel	12,0
Weizen	11,2
SCHAUMANN ENERGY ¹	4,00

Einzelkomponente	Anteil im FM [%]
RINDAVIT 210 PLUS ASSCO ATG ²	2,00
Calciumcarbonat	0,70
Natriumchlorid	0,50
Futter-Harnstoff	0,30
Sojaöl	0,30

¹ Energiereiches Spezial-Einzelfuttermittel für Hochleistungskühe,
Inhaltsstoffe: 0,0 % Rohprotein; 0,0 % Rohfaser; 0,0 % Natrium; 84 % Rohfett; 11,0 % Rohasche; 9,0 % Calcium; 18,5 MJ NEL,
Technologische Zusatzstoffe: BHT (E321): 150 mg/kg
Zusammensetzung: 100 % Salze von Fettsäuren, pfl.

² Mineralfuttermittel für Rinder
Inhaltsstoffe: 21,0 % Calcium; 9,0 % Natrium; 2,2 % HCl-unlösliche Asche; 0,0 % Phosphor;
6,5 % Magnesium
Zusatzstoffe je kg Mineralfutter: 1.000.000 I.E. Vitamin A (E 672); 5.000 mg Vitamin E (DL-Alpha-Tocopherolacetat); 80.000 I.E. Vitamin D₃ (E 671); 150.000 mcg Biotin; 3.600 mg Zink als Zinkoxid (E6); 2.400 mg Zink als Glycin-Zinkchelate-Hydrat (E 6); 3.1500 mg Mangan als Mangan-(II)-oxid (E 5); 1.350 mg Mangan als Glycin-Manganchelate-Hydrat (E 5); 650 mg Kupfer als Kupfer-(II)-sulfat, Pentahydrat; 750 mg Kupfer als Glycin-Kupferchelate-Hydrat (E 4); 40 mg Kobalt als basisches Kobalt-(II)-carbonat, Monohydrat; 200 mg Jod als Calciumiodat, wasserfrei; 35 mg Selen als Natriumselenit; 65,0 x 10⁹ KBE *Saccharomyces cerevisiae* (CNCM I-1077/Nr. E1711); 500 mg Zitronensäure (E 330); 340 mg BHT (E 321); 120 mg Propylgallat (E310); 48 mg Ethoxyquin (E 324)
Zusammensetzung: 53,4 % Calciumcarbonat; 23,4 % Natriumchlorid; 13,0 % Magnesiumoxid; 3,0 % Rüben-Melasse

Die aus Analyseergebnissen der Futterkomponenten berechneten Kennzahlen der Futtermischung sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13 Kennzahlen der TMR berechnet aus Analyseergebnissen der Futterkomponenten

Kennwert	
Trockenmasse	456 g/kg uS
Nettoenergie Laktation	6,79 MJ/kg TM
Rohprotein	160 g/kg TM
Rohfett	42,8 g/kg TM
Nutzbares Rohprotein	168 g/kg TM
Strukturwirksame Rohfaser	148 g/kg TM
Stärke	170 g/kg TM
Zucker	39,6 g/kg TM
Calcium	7,88 g/kg TM
Phosphor	4,10 g/kg TM
Natrium	2,30 g/kg TM

Kennwert	
Magnesium	2,73 g/kg TM
Kalium	16,1 g/kg TM
Schwefel	2,30 g/kg TM
Kupfer	19,8 mg/kg TM
Selen	0,33 mg/kg TM
Vitamin E	44,2 mg/kg TM
Biotin	1335 mcg/kg TM
DCAB	131 meq/kg TM
Beständige Stärke	47,6 g/kg TM

3.2.2 Studientiere

Vor Versuchsbeginn wurden alle laktierenden Rinder des Betriebes in fünf Melkgruppen eingeteilt. Hierbei wurde jeweils eine Versuchs- und eine Kontrollgruppe aus erstlaktierenden sowie pluriparen Tieren etabliert. Die Zuteilung erfolgte randomisiert anhand der letzten 5 Ziffern der Ohrmarkennummer nach dem Schema AABB. Tiere, die während der Versuchszeit nach dem Trockenstehen wieder in die Melkgruppen aufgenommen wurden, sowie Erstkalbinnen wurden alternierend der Kontroll- bzw. Versuchsgruppe zugeordnet. Die fünfte Gruppe setzte sich aus verschiedenartig erkrankten Tieren zusammen.

Daraus ergab sich folgende Melkreihenfolge und somit Zuteilung der Einzeltiere zu den Behandlungsgruppen:

1. Melkgruppe: pluripare Tiere der Versuchsgruppe
2. Melkgruppe: pluripare Tiere der Kontrollgruppe
3. Melkgruppe: Färsen der Versuchsgruppe
4. Melkgruppe: Färsen der Kontrollgruppe
5. Melkgruppe: erkrankte Tiere

Als Studientiere in den Versuch wurden Tiere jedes Laktationsstadiums aufgenommen, die noch für mindestens 5 Monate gemolken werden sollten und deren Somatische Zellzahl der MLP von April 2013 unter 100.000 Somatischen Zellen pro Milliliter Milch lag. So ergab sich die Anzahl n=35 für die Kontrollgruppe und n=37 für die Versuchsgruppe. Von diesen Tieren wurden monatlich die in Abschnitt 3.2.5 Aufnahme klinischer Parameter und sonstige Datenerfassung beschriebenen Parameter erhoben.

Von den Studientieren wurden, unabhängig vom Versuchsansteller, 11 Tiere aus der Kontroll- und 10 Tiere aus der Versuchsgruppe vom Melkpersonal ausgewählt, um mittels Tupferprobe aus dem Strichkanal auf die mikrobielle Besiedlung ihrer Zitzen untersucht zu werden (siehe 3.2.6 Probenahme).

Tiere, die während des Versuches an einer Mastitis erkrankten, wurden nach Anweisung des behandelnden Tierarztes therapiert.

3.2.3 Dippmittel

Alle Tiere der Kontrollgruppe sowie die erkrankten Tiere (Melkgruppen 2, 4 und 5) wurden mit „Schauma-Dip ad us. vet.“ der H. W. Schaumann AG, Pinneberg, Deutschland, gedippt. Wirksamer Bestandteil dieses Dippmittels ist Iod in einem Komplex mit einem nichtionischen Tensid (Nonoxinol-9). Weiterer Bestandteil der gebrauchsfertigen Lösung ist Glycerin. Dieses Dippmittel wurde während des gesamten Versuchszeitraumes mittels einer Sprühanlage mit Handspritze aufgebracht.

Die Tiere der Versuchsgruppe (Melkgruppen 1 und 3) wurden mit einem zu jeder Melkzeit aus einem Pulver frisch zubereiteten Dippmittel behandelt. Hierzu wurden 10 g des Pulvers in 1 l Wasser durch kräftiges Schütteln gelöst. In 10 g des Produktes waren 4,75 g Dextroseanhydrid, sowie 5 g Johannisbrotkernmehl (Cargill Texturizing Solutions Deutschland GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) als Verdickungsmittel enthalten. Als wirksamer Bestandteil wurde 0,26 g *L. lactis* LAC 0125 (entspricht einer Keimzahl von $5 \cdot 10^7$) beigemischt. Ab dem 28.05.2013 wurde als Farbstoff 0,025 g Indigotin (blau) zur besseren Unterscheidung gedippter und ungedippter Tiere zugegeben. Dieses Dippmittel wurde bis zum 12.07.2013 mit einem Feinsprüher angewandt. Ab dem 13.07.2013 wurde das Mittel in einem Dippbecher verwendet. Hierbei wurde nach jedem behandelten Tier der Dipp-Becher geleert und neues Dippmittel eingefüllt.

Nach Beendigung des Versuches wurden alle Tiere mit dem Dippmittel der Kontrollgruppe behandelt.

3.2.4 Versuchsanordnung

Als Kontrollpunkte während der Studie wurden die Daten der MLP gewählt. Der Versuchsbeginn war die MLP im Mai 2013, das Versuchsende die MLP im September 2013 (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen und Behandlungen

Zeitpunkt	Maßnahme
05 / 2013 (Versuchsbeginn, Monat 1)	Klinische Untersuchung und Probenahme <ul style="list-style-type: none"> • Adspektion und Palpation von Euter, -haut und Zitze • Tupferprobenahme Behandlungsbeginn Besprühen der Zitzen in Versuchs- und Kontrollgruppe nach jedem Melken bis zum Versuchsende
06 / 2013 (Monat 2)	Klinische Untersuchung <ul style="list-style-type: none"> • Adspektion und Palpation von Euter, -haut und Zitze
07 / 2013 (Monat 3)	Klinische Untersuchung und Probenahme <ul style="list-style-type: none"> • Adspektion und Palpation von Euter, -haut und Zitze • Tupferprobenahme
08 / 2013 (Monat 4)	Klinische Untersuchung <ul style="list-style-type: none"> • Adspektion und Palpation von Euter, -haut und Zitze

Zeitpunkt	Maßnahme
09 / 2013 (Versuchsende)	Klinische Untersuchung und Probenahme <ul style="list-style-type: none">• Adspektion und Palpation von Euter, -haut und Zitze• Tupferprobenahme Behandlungsende
05 – 09 / 2013	<ul style="list-style-type: none">• Dokumentation auftretender Erkrankungen• Dokumentation der Milchleistungsprüfungsdaten• Dokumentation von Abgangsdaten und Ursachen

3.2.5 Aufnahme klinischer Parameter und sonstige Datenerfassung

Alle Versuchstiere wurden im etwa vierwöchigen Abstand, zeitgleich zur MLP, unmittelbar nach dem Melken im Melkstand einer adspektorischen und palpatorischen Untersuchung der Milchdrüse unterzogen. Die Befunde wurden in Excel 2010 (Microsoft Corporation) dokumentiert.

Um die Exposition der Euter der Tiere in Studien- und Kontrollgruppe gegenüber Schmutz vergleichen zu können, wurde ein Euter-Hygiene-Score anhand einer Hygiene-Scoring-Tabelle nach Ruegg (2002), aufgenommen. Die Bewertung von Euter- und Zitzenhaut sowie des Euterdrüsengewebes erfolgte nach Rosenberger und Dirksen (1990). Der Grad der Hyperkeratinisierung der Strichkanäle wurde mit Hilfe des Zitzenscorings nach Mein (2001) beurteilt. Die Bewertungsschlüssel sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Befundungen wurden immer von demselben Untersuchenden vorgenommen.

Die Daten der monatlichen Milchleistungsprüfung wurden den Berichten des Landeskontrollverbandes Schleswig-Holstein (Kiel) entnommen. Ein Tier der Versuchsgruppe wurde im Juli im Rahmen der MLP nicht beprobt.

Im Monat Juli setzte die reguläre MLP aus. Es wurde dennoch eine MLP durchgeführt, jedoch in geringerem Umfang. So wurde in diesem Monat beispielsweise auf die Aufnahme der Milchmenge verzichtet.

Die Datenerfassung auf dem Betrieb erfolgte mit dem Computerprogramm Herde 5.6 (DSP-Agrosoft, Paretz).

Daten zu Erkrankungen der Tiere wurden dem Bestandsbuch entnommen.

3.2.6 Probenahme

Die Probenahme fand im Rahmen des morgendlichen Melkens am Tag der MLP statt. Nach automatischer Abnahme des Melkzeuges erfolgte die Desinfektion aller Zitzen im Bereich der Strichkanalöffnung mit Zellstoff und 70%igem Alkohol. Anschließend wurde jede Zitze mit einem Mikro-Tupfer beprobt. Hierzu wurde dieser ca. 3 bis 5 mm weit in den Zitzenkanal eingeführt und um 360 ° gedreht. Hiernach wurde der Tupfer in Amies-Transportmedium (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gegeben, auf Eis gekühlt und innerhalb von 90 min in das Labor transportiert.

Während des Versuchszeitraumes erkrankte Viertel wurden zu den nachfolgenden Probenahmezeitpunkten nicht noch einmal beprobt.

3.2.7 Mikrobiologische Untersuchung

Die Tupfer wurden aus dem Transportmedium entfernt, in 0,5 mL 1%iges Peptonwasser aufgenommen und 25 min auf einem Schüttler homogenisiert. Anschließend wurden die Tupfer mit einer sterilen Pinzette entfernt und die so gewonnenen Proben mit 1%igem Peptonwasser dekadisch verdünnt. Jeweils 100 µl der unverdünnten Probe bzw. der Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} wurden daraufhin auf einem Selektivmedium ausplattiert. Zusätzlich diente ein Ausstrich des Dippmittels der Versuchsgruppe auf ebendiesem Medium als Positivkontrolle. Als Selektivmedium wurde MRS-Medium verwendet, das mit 2000 Einheiten Nisin/mL und 10 mg/l Trimethoprim versetzt war. Zur Herstellung der Stammlösung Nisin (1.000.000u/g) wurden zunächst 100 mL Wasser mit ca. 5 Tropfen 1 M HCL auf pH 2 gebracht. Anschließend wurden 4 g Nisin unter Rühren gelöst und die entstandene Lösung sterilfiltriert. Hiervon wurden 25 mL auf 500 mL Medium gegeben. Die Stammlösung Trimethoprim wurde durch Lösen von 100 mg Trimethoprim in 10 mL DMSO und anschließender Sterilfiltration hergestellt. Hiervon wurden 0,5 mL auf 500 mL Medium gegeben.

Die Inkubation der beimpften Platten erfolgte aerob bei 30 °C für 4 Tage.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die gewachsenen Kolonien gezählt, die sich makroskopisch nicht von der Positivkontrolle unterschieden.

3.2.8 Molekularbiologische Untersuchungen der Tupferproben

Als Ausgangsmaterial für die molekularbiologischen Arbeiten dienten die zuvor für die mikrobiologischen Untersuchungen aufbereiteten Tupferproben, die bei -24 °C eingefroren und nach Berlin ins Institut für Tierernährung verbracht wurden. Die Proben der einzelnen Zitzen wurden pro Tier und Probenahmezeitpunkt vereinigt, um die Detektionsgrenze der Ziel-DNA zu verringern. Die anschließende DNA-Extraktion erfolgte dann wie unter 3.1 Dem Feldversuch vorangegangene *in-vitro* Untersuchungen beschrieben.

3.2.8.1 Detektion des *NisinA*-Gens in den Tupferproben

Die DNA-Extrakte der vereinigten Tupferproben wurden unter den in 3.1.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dargestellten Reaktionsbedingungen und mit dem in Tabelle 13 spezifizierten Primer auf das Vorkommen des *NisinA*-Gens mittels qPCR untersucht. Die Auswertung dieser PCR erfolgte wie in 3.1.1.5 Auswertung beschrieben.

Tabelle 13 Verwendete PCR – Primersequenzen und Zielgene

Gen	Primer	Produktgröße	Primersequenz (5' → 3')	Referenz
NisinA	nisA F	115 bp	TCAGGTGCATCACCACGCA	Trmcic et al. (2011)
	nisA R		TTA TTACGTGAATACTACAATG ACAAGTTGCT	

Weiterhin wurden die Extrakte der Tupferproben mit Hilfe des PathoProof™ Mastitis PCR Assays auf Mastitiserreger untersucht.

3.2.8.2 Auswertung der Tupferproben mit dem PathoProof™ Mastitis PCR Assay

Die Quantifizierung der PCR-Ergebnisse wurde analog zu der in 3.1.1.5 Auswertung Auswertung beschriebenen Methode durchgeführt. Da sich bei einigen Primerkombinationen des PathoProof™ Mastitis Assays falsch-positive Signale in den Negativkontrollen zeigten, wurden in die Auswertung nur Proben einbezogen, deren C_T -Wert mindestens 3,3 C_T unter dem als Negativ-Kontrolle eingesetzten Wassers lag. Hierdurch wurde der Anteil von möglicherweise falsch-positiver Amplifizierung auf ein Zehntel des Gesamtsignals reduziert.

3.2.9 Verwendete Geräte und Chemikalien für den Feldversuch

Die Herstellung der verwendeten Lösungen und Medien erfolgte wie in Abschnitt 3.1.3 Weitere verwendete Geräte und Chemikalien der in-vitro Untersuchungen beschrieben. Neben den in Tabelle 10 aufgeführten Bakterien-Stämmen, die bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, bezogen wurden, sind die im Anhang aufgeführten Materialien zum Einsatz gekommen.

3.3 Statistische Auswertung erhobener Daten

Die statistische Auswertung aller Ergebnisse erfolgte mithilfe der Statistiksoftware SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Die Zellzahlen wurden logarithmiert, um eine Normalisierung der Daten zu erreichen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Nicht normal verteilte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und nachfolgendem Mann-Whitney-U Test analysiert. Weiterhin wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Eine Signifikanz wurde bei p-Werten kleiner 0,05 angenommen. Die verwendeten Tests und die erzielte Signifikanz werden im Folgenden bei der Darstellung der einzelnen Ergebnisse angegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1 Dem Feldversuch vorausgegangene *in-vitro* Untersuchungen

4.1.1 Kokultivierung zur Beurteilung der Wachstumsbeeinflussung von *Lactococcus lactis* LAC 0125 und *Staphylococcus aureus*

Bis auf einen Ansatz zeigten alle Inkubationen typische bakterielle Wachstumskurven mit lag-Phase und anschließendem exponentiellen Wachstum. Aufgrund der kurzen Inkubationszeit (9 Stunden) wurde jedoch die stationäre Phase nicht erreicht. Die folgenden Ergebnisse beruhen auf der Auswertung der Wachstumsparameter der entsprechenden Kokultivierungen. Durch die sogenannte „checkerboard“ Methode wurden Inokula von 10^2 bis 10^5 pro mL beider Stämme jeweils miteinander inkubiert. Hieraus ergeben sich für jedes Inokulum einer entsprechenden Konzentration eines Stammes mit jeder Konzentration des anderen Stammes Wachstumskurven, die ausgewertet werden können. Die Abbildung 1 stellt beispielsweise die gegenseitige Beeinflussung der lag-Zeit der beiden kokultivierten Stämme dreidimensional dar. Hier sind die log Inokula beider Stämme auf der x- bzw. y-Achse dargestellt, während die lag-Zeit auf der z-Achse aufgetragen wurde. Durch das Auftragen der aus den einzelnen Wachstumskurven berechneten lag-Zeiten kann der Zusammenhang als Fläche dargestellt werden. Die lag-Zeit ist abgesunken, je mehr Zellen das Inokulum enthielt. Da sich die Fläche annähernd symmetrisch darstellt, ist davon auszugehen, dass sich die beiden Stämme nicht in ihrem Wachstum beeinflussen. Nur bei einer asymmetrischen Verteilung der Fläche wäre von einem Einfluss eines Stammes auf den anderen Stamm auszugehen.

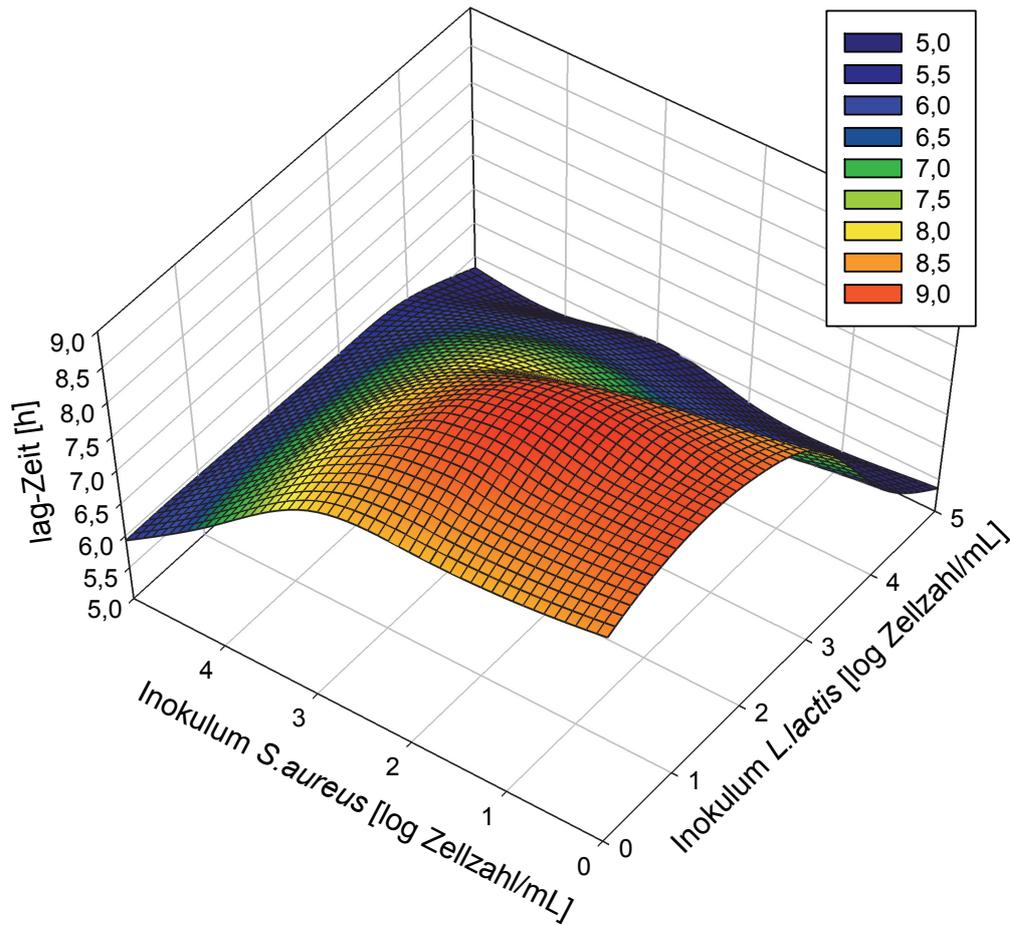


Abbildung 1 Darstellung der lag-Zeit nach 9 Stunden Kokultivierung von *L. lactis* und *S. aureus*

Da diese Schnellmethode der Überprüfung des Wachstums in Kokultur keine Information darüber liefert, ob ein Stamm selektiv beeinflusst wurde, wurden DNA-Extrakte der Inkubationen mittels qPCR untersucht. Entsprechend sind der Abbildung 2 die Kopienzahlen pro μl DNA-Extrakt des *nuc*-Gens von *S. aureus* zu entnehmen. Dargestellt sind die Ergebnisse der qPCR, wobei die x-Achse die logarithmierten, in der Kokultivierung eingesetzten Konzentrationen von *L. lactis* von 0 bis 10^5 Zellen/mL angibt, die y-Achse die Konzentrationen von *S. aureus* von 10^2 bis 10^5 Zellen/mL.

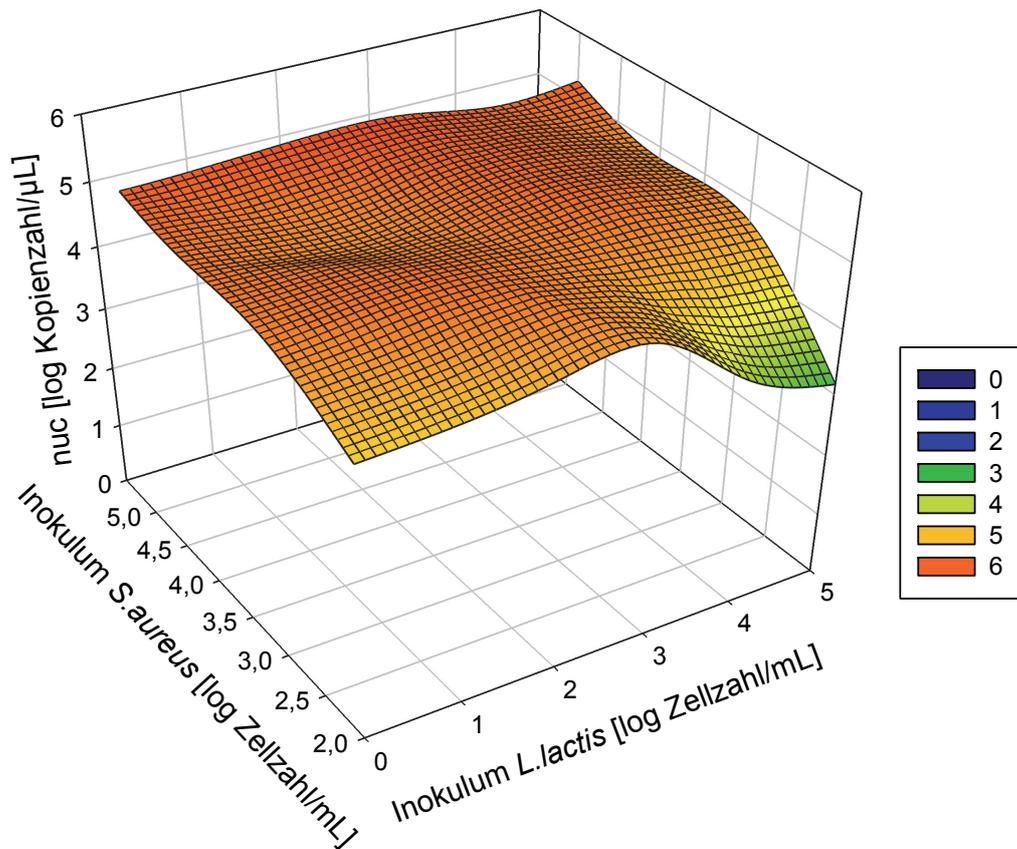


Abbildung 2 Einfluss von *L. lactis* auf das Wachstum von *S. aureus* anhand der Kopienzahl pro μl DNA-Extrakt des *nuc*-Gens von *S. aureus*

Die Fläche, die sich aus der logarithmierten Kopienzahl bei Anwendung des *nuc*-Primers (Tabelle 7) ergibt, ist annähernd symmetrisch und kann als äquivalent zum *S. aureus*-Gehalt angesehen werden. Im Falle der Inkubation der höchsten eingesetzten Konzentration von *L. lactis* und der geringsten eingesetzten Konzentration von *S. aureus* ist ein geringfügiges Abfallen der entstandenen Fläche zu erkennen. Entsprechend verringerte sich das Wachstum von *S. aureus* nur geringfügig, wenn die höchste Konzentration von *L. lactis* und die geringste Konzentration von *S. aureus* als Inokula verwendet wurden.

4.1.2 Quantifizierung des PathoProof™ Mastitis PCR Assays

Im PathoProof™ Mastitis PCR Assay wurden 10 Bakterienstämme eingesetzt und mit den 4 enthaltenen Primern getestet. Laut Handbuch sollten die Primer für die in Tabelle 9 aufgelisteten Bakterien spezifisch sein. Eine Überprüfung des PCR Assays mit Referenzstämmen lieferte jedoch für einige Bakterienarten ungenügende Ergebnisse.

Tabelle 14 Identifikation von 10 DSM-Stämmen mittels PathoProof™ Mastitis PCR Assay

Name	Stamm ID	Fluoreszenz	Primer-Mix	C _t -Wert
<i>S. aureus</i>	DSM 6732	SYBR	1	17,3
KNS	DSM 6732	SYBR	3	17,5
<i>E. faecium</i>	DSM 20477	HEX	1	12,9
<i>C. bovis</i>	DSM 20582	CY5	1	17,6
		HEX	4	20,6
<i>E. coli</i>	DSM 2840	HEX	2	18,2
		HEX	1	15,0
<i>S. dysgalactiae</i>	DSM 20662	CY5	2	14,0
<i>S. uberis</i>	DSM 20569	CY5	3	15,4
		SYBR	3	25,0
<i>S. agalactiae</i>	DSM 2134	HEX	3	13,2
<i>K. pneumoniae</i>	DSM 30104	SYBR	4	22,0
		HEX	1	14,7
		HEX	2	20,1
		HEX	4	22,0
<i>A. pyogenes</i>	DSM 20594	CY5	4	16,0
<i>S. marcescens</i>	DSM 30122	HEX	4	18,5
<i>L. lactis</i> LAC 0125		HEX	1	15,4
		HEX	2	16,2

Der Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass *Corynebacterium bovis* mit Primer-Mix 4 zu falsch-positiven Ergebnissen führte. Laut Handbuch sollte dieses Bakterium von Primer-Mix 1 detektiert werden. Ähnlich verhielt es sich mit *Escherichia coli*, der neben dem Primer-Mix 2, mit dem Primer-Mix 1 falsch-positive Ergebnisse ergab. Für den *Streptococcus uberis*-Stamm wurde ein falsch-positives Signal bei Primer-Mix 3 ermittelt. Der eingesetzte Extrakt von *Klebsiella pneumoniae* wurde bei der Fluoreszenz HEX sogar von Primer-Mix 1, 2 sowie 4 detektiert. Der in dieser Arbeit eingesetzte *L. lactis* LAC 0125 wurde von Primer-Mix 1 und 2 erkannt.

Da die Überprüfung des PCR Assays für einige Bakterienarten nicht zufriedenstellend war (siehe Tabelle 9 und Tabelle 14), wurden die auswertbaren Daten für die nachfolgenden Untersuchungen wie folgt zugeordnet (Tabelle 17):

Tabelle 15 Zuordnung der eingesetzten Stämme zu Primer-Mix und Fluoreszenz

Name	Stamm ID	Primer-Mix	Fluoreszenz
<i>S. aureus</i>	DSM 6732	1	SYBR
<i>E. faecium</i>	DSM 20477	1	HEX
<i>C. bovis</i>	DSM 20582	1	CY5
<i>E. coli</i>	DSM 2840	2	HEX
<i>S. dysgalactiae</i>	DSM 20662	2	CY5
<i>KNS</i>	DSM 6732	3	SYBR
<i>S. uberis</i>	DSM 20569	3	CY5
<i>S. agalactiae</i>	DSM 2134	3	HEX
<i>K. pneumoniae</i>	DSM 30104	4	SYBR
<i>A. pyogenes</i>	DSM 20594	4	CY5
<i>S. marcescens</i>	DSM 30122	4	HEX

4.2 Anwendung eines Dippmittels auf Basis von *Lactococcus lactis* im Feldversuch

4.2.1 Klinische Parameter

4.2.1.1 Hygiene Score

Die Euterhygiene verbesserte sich im Versuchszeitraum in beiden Gruppen. So wurden zur Aufnahmeuntersuchung 14,3% der Tiere der Kontrollgruppe (Iod) und 16,2% der Tiere der Versuchsgruppe (*L. lactis*) in Klasse 3 und 4 nach Maßgabe des verwendeten Hygienescores eingestuft. Im Monat 2 waren es nur noch 5,7% der Tiere der Kontrollgruppe und 8,1% der Versuchsgruppe, im folgenden Monat 3 noch 5,7% in der Versuchsgruppe. Zu den letzten beiden Untersuchungsterminen fiel kein Tier aus beiden Gruppen in diese Kategorien (Tabelle 16). Zu keinem Zeitpunkt unterschieden sich die beiden Gruppen bezüglich der Anzahl der zu Hygiene Score 1/2 und 3/4 zugeordneten Tiere signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p=0,633 - 0,898$).

Tabelle 16 Bewertung der Euterhygiene in Kontroll- (KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum [Anzahl der Tiere (%)]

Euterhygiene-Score	Monat 1		Monat 2		Monat 3		Monat 4		Monat 5	
	KG	VG								
1	22 (62,9)	20 (54,1)	23 (65,7)	32 (86,5)	28 (80,0)	26 (70,3)	27 (77,1)	27 (73,0)	29 (82,9)	30 (81,1)
2	8 (22,9)	11 (29,7)	10 (28,6)	2 (5,4)	5 (14,3)	11 (29,7)	8 (22,9)	10 (27,0)	6 (17,1)	7 (18,9)
3	2 (5,7)	4 (10,8)	2 (5,7)	2 (5,4)	2 (5,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
4	3 (8,6)	2 (5,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Σ^*	35 (100,1)	37 (100,0)	35 (100,0)	37 (100,0)	35 (100,0)	37 (100,0)	35 (100,0)	37 (100,0)	35 (100,1)	37 (100,0)

*durch Runden ergeben die Summen nicht exakt 100,0%

4.2.1.2 Befunde der Milchdrüse und Zitzen

Euter- und Zitzenhautläsionen

Die Euter- und auch die Zitzenhaut blieben über den gesamten Versuchszeitraum unauffällig. Vereinzelt traten kleinere Läsionen auf, wie Tabelle 17 zu entnehmen ist.

Tabelle 17 Zitzenhautläsionen in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) [Anzahl der Tiere (%)]

Monat	Zitzenhautrisse	
	KG	VG
Mai	0 (0,0)	1 (2,7)
Juni	0 (0,0)	0 (0,0)
Juli	2 (5,7)	2 (5,4)
August	1 (2,9)	0 (0,0)
September	1 (2,9)	1 (2,7)

Zitzen Condition Score

Der Zitzen Condition Score wurde in monatlichen Abständen aufgenommen (Abbildung 3). Über den gesamten Versuchszeitraum konnten die Mehrzahl der Viertel der Tiere aus Kontroll- sowie Versuchsgruppe mit dem Score 1 bewertet werden. Die Anzahl der in Score 1 eingestuften Viertel unterschied sich in keinem Monat signifikant zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe (Chi-Quadrat-Test, $p=0,245 - 0,806$). Im dritten Monat wurden tendenziell mehr Viertel von Tieren der Versuchsgruppe dem Zitzen Condition Score 2 zugeordnet als der Kontrollgruppe ($p=0,055$). Die Anzahl der Viertel, die dem Zitzen Condition Score 4 entsprachen, waren im gesamten Versuchszeitraum signifikant häufiger in der Kontrollgruppe vertreten ($p=0,000 - 0,002$).

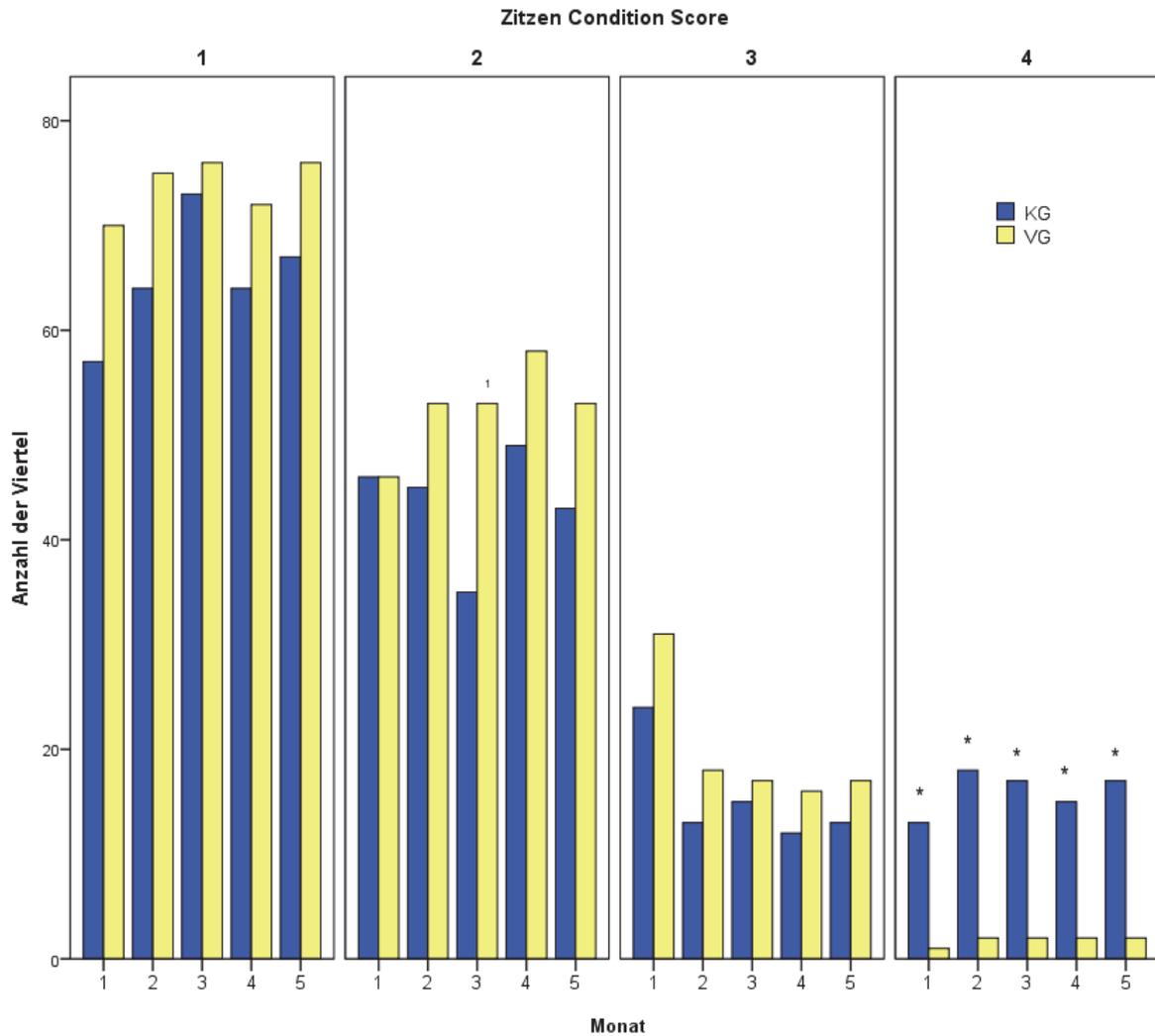


Abbildung 3 Entwicklung des Zitzen Condition Scores der Viertel in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchsverlauf

* kennzeichnet signifikante Unterschiede (Chi-Quadrat-Test, $p > 0,05$) in einem Monat zwischen den Gruppen

[†] kennzeichnet tendenzielle Unterschiede (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,055$) in einem Monat zwischen den Gruppen

Euterdrüsengewebe

Die Verteilung der Befunde der monatlichen Untersuchungen des Milchdrüsengewebes der Tiere sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18 Zustand des Euterdrüsengewebes in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum [% der Viertel]

Befund	Mai	Juni	Juli	August	September
	KG / VG	KG / VG	KG / VG	KG / VG	KG / VG
feinkörnig	82,1/89,9	77,1*/91,9*	81,4/91,9	93,6/89,2	93,6/85,8
grobkörnig, weich	13,6 ^a /5,4 ^b	17,1 ^a /4,7 ^b	13,6 ^a /2,7 ^b	0,0/4,1	0,0/6,8
grobkörnig, derb	0,0/0,0	0,0/0,0	0,7/0,0	0,7/0,7	0,7/2,7
grobknotig	0,0/0,0	0,7/0,0	0,0/0,0	0,0/1,4	0,0/0,7
diffus verhärtet	0,0/0,7	0,7/0,0	0,0/0,7	0,0/0,0	0,0/0,7
akut geschwollen	0,0/0,7	0,0/0,0	0,0/0,7	1,4/0,0	1,4/0,0
Atrophie	4,3/3,4	4,3/3,4	4,3/3,4	4,3/3,4	4,3/3,4
prall	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,7	0,0/1,4	0,0/0,0
n	140/148	140/148	140/148	140/148	140/148

n Anzahl der Viertel

^{a, b} Werte mit unterschiedlichen Indizes in einer Zeile unterscheiden sich signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,05$) im jeweiligen Monat

* Werte mit diesem Index in einer Zeile weisen eine Tendenz im jeweiligen Monat auf (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,073$)

Während des gesamten Versuchszeitraumes fanden kaum Veränderungen des Drüsengewebes statt. Die meisten Viertel ließen sich als feinkörnig und weich beschreiben. Grobkörniges, aber ebenfalls weiches Drüsengewebe wurde vorwiegend in der Kontrollgruppe festgestellt. Die Anzahl atrophischer Viertel blieb über den Versuchszeitraum konstant.

4.2.1.3 Krankheitstage

Zwei Tiere der Kontrollgruppe wurden im Versuchszeitraum einmalig systemisch mit Antibiotika aufgrund von Arthritiden behandelt. Die Wartezeit auf Milch betrug jeweils 24 Stunden. Ein weiteres Tier der Kontrollgruppe wurde einmalig im Rahmen einer Ketose-Behandlung mit Dexamethason therapiert. Die Wartezeit auf Milch betrug 4 Tage.

Die während des Versuches akut an einer Mastitis erkrankten Tiere wurden nach Behandlungsplan des Hoftierarztes sofort antibiotisch am betroffenen Viertel behandelt (Präparat: Cobactan® LC 75 mg). Eine systemische Medikation war hierbei in keinem Fall erforderlich. Keines der an Mastitis erkrankten Tiere zeigte eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Während des Versuchszeitraumes wurden 15 Viertel von Tieren der Kontrollgruppe und 8 Viertel von Tieren der Versuchsgruppe behandelt (Abbildung 4). In der Kontrollgruppe ergaben sich hieraus 76 Behandlungstage, in der Versuchsgruppe 31 Behandlungstage.

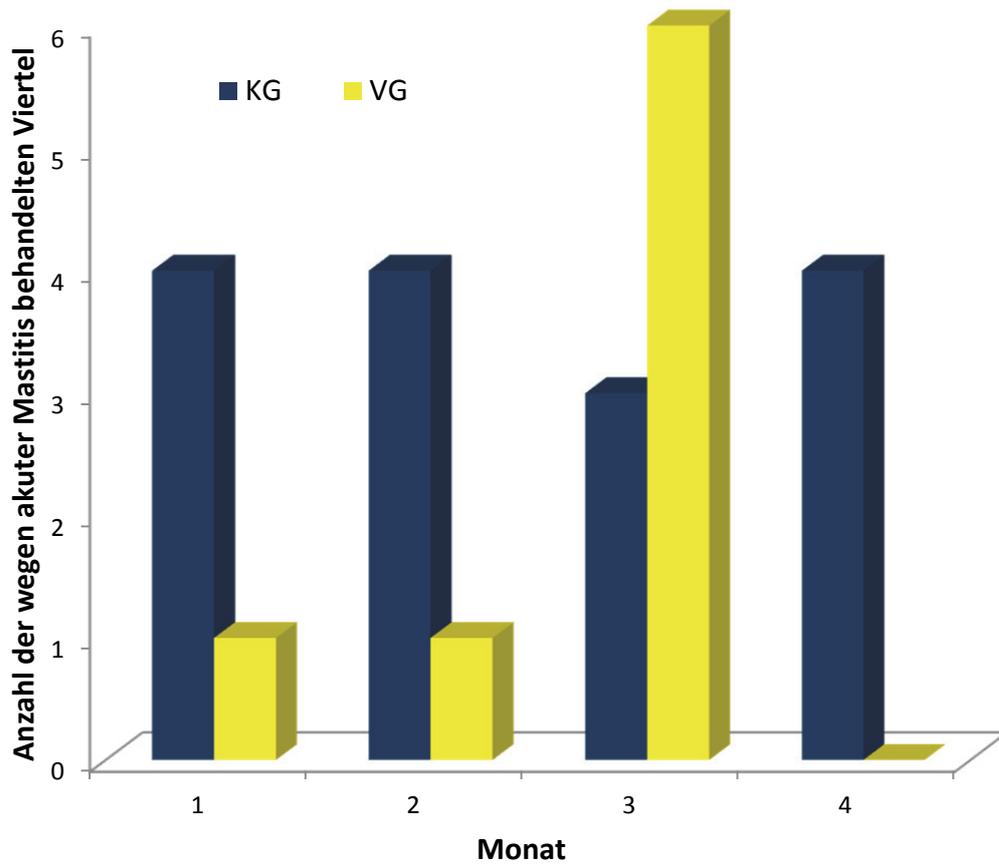


Abbildung 4 Anzahl der aufgrund einer akuten Mastitis behandelten Viertel in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum

4.2.2 Daten der MLP-Berichte

4.2.2.1 Zellzahlen der Milch

Die logarithmierten Zellzahlen der Tagesgemelke der Tiere von Versuchs- und Kontrollgruppe in den einzelnen Monaten unterschieden sich über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,171-1,000$). Die Mittelwerte der logarithmierten Zellzahlen sind in Abbildung 5 dargestellt. Über den Versuchszeitraum stiegen die Zellzahlen in beiden Gruppen an.

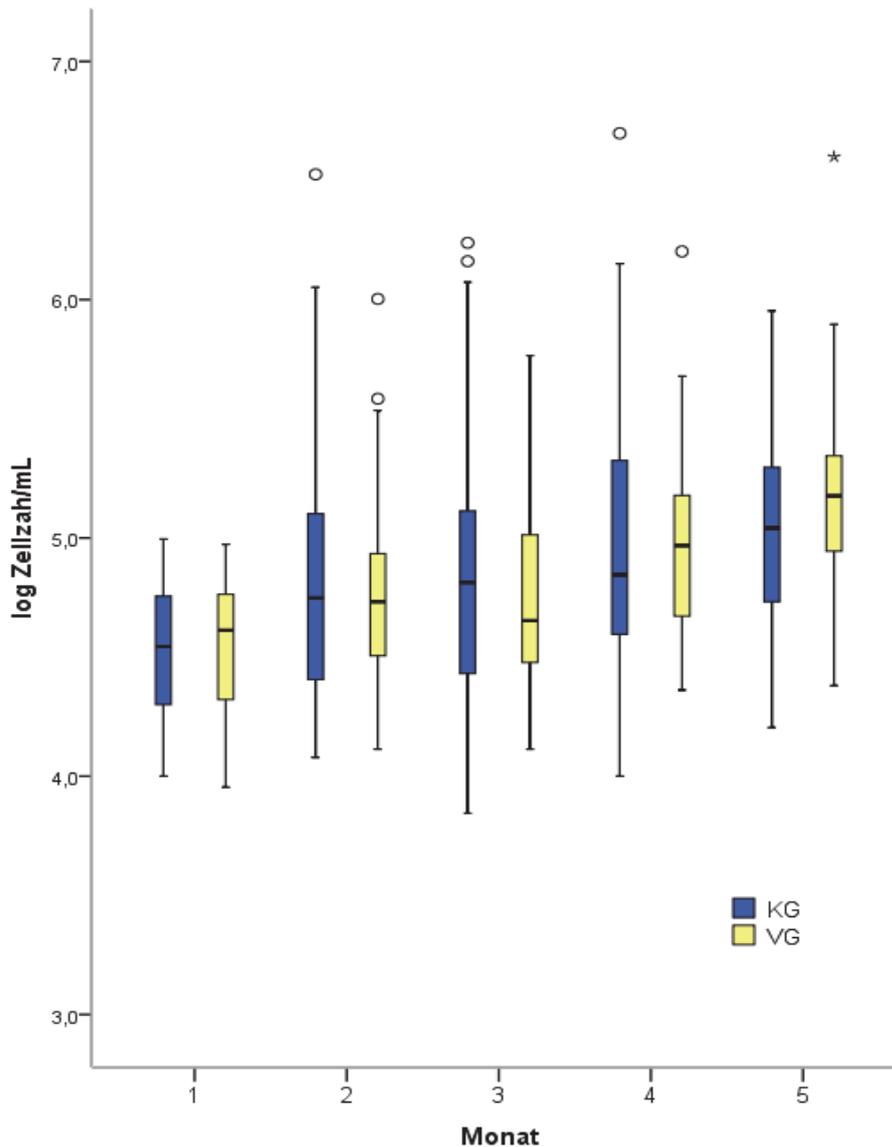


Abbildung 5 Vergleich der logarithmierten Mittelwerte der Zellzahlen der MLP in Kontroll- (KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum

Eine detailliertere Betrachtung ist nach Einteilung der Zellzahlen der Gesamtgemelke in Klasse 1 – 6 möglich. Eine Übersicht hierzu ist der Tabelle 19 zu entnehmen. Entsprechend der Auswahlkriterien der Versuchstiere fielen zu Versuchsbeginn alle Tiere in Klasse 1. In beiden Gruppen war eine Abnahme der Tiere in der Klasse 1 zu vermerken, jedoch geschah

die Verlagerung vorwiegend in die Klassen 2 und 3. Somit blieben die Zellzahlgehalte der Mehrheit der Tiere in der Kontroll- sowie auch der Versuchsgruppe im niedrigen bis mittleren Bereich. Ab der Versuchsmitte wurden in beiden Gruppen wiederholt auch hohe Zellzahlen gemessen. Tiere mit Zellzahlgehalten, die der Klasse 6 entsprachen, blieben selten.

Tabelle 19 Verteilung der Zellzahlen der MLP von Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum [Anzahl der Tiere und prozentualer Anteil (%)]

Klasse (Zellzahl in 10³/mL)	Mai 2013		Juni 2013		Juli 2013		August 2013		September 2013	
	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG	KG	VG
1 (0 – 100)	35 (100,0)	37 (100,0)	23 (65,7)	32 (86,5)	24 (68,6)	27 (73,0)	21 (60,0)	22 (59,5)	17 (48,6)	13 (35,1)
2 (101 – 250)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (17,1)	2 (5,4)	3 (8,6)	6 (16,2)	6 (17,1)	9 (24,3)	12 (34,3)	19 (51,4)
3 (251 – 500)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (11,4)	2 (5,4)	1 (2,9)	3 (8,1)	4 (11,4)	5 (13,5)	5 (14,3)	1 (2,7)
4 (501 – 750)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (5,7)	1 (2,7)	2 (5,7)	1 (2,7)	0 (0,0)	2 (5,4)
5 (751 – 1000)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,9)	1 (2,7)
6 (>1000)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (5,7)	1 (2,7)	3 (8,6)	0 (0,0)	2 (5,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,7)
Σ	35	37	35	37		37	35	37	35	37

Die Zellzahlen der gesamten Herde stiegen im Versuchszeitraum stark an. Im vierten Versuchsmonat ist dem MLP-Bericht eine Zellzahl von 435.000 Zellen/mL Milch als Herdenmittel zu entnehmen. In Abbildung 6 werden die Entwicklungen der logarithmierten Mittelwerte der Zellzahlen der MLP der gesamten Herde, sowie der Kontroll- und Versuchsgruppe im Versuchszeitraum dargestellt. Zu Beginn der Untersuchung stellen sich die als Studientiere ausgewählten Tiere sowohl der Kontroll- als auch der Versuchsgruppe mit deutlich niedrigeren Zellzahlen dar (Auswahlkriterium). Die logarithmierten Mittelwerte der Zellzahlen der MLP der gesamten Herde lagen im gesamten Versuchszeitraum bei über 5,4, wohingegen die als Studientiere ausgewählten Tiere in Kontroll- und Versuchsgruppe Werte bis maximal 5,2 erreichten. Bei allen dargestellten Tiergruppen ist ein Anstieg der Zellzahl im Versuchszeitraum zu vermerken.

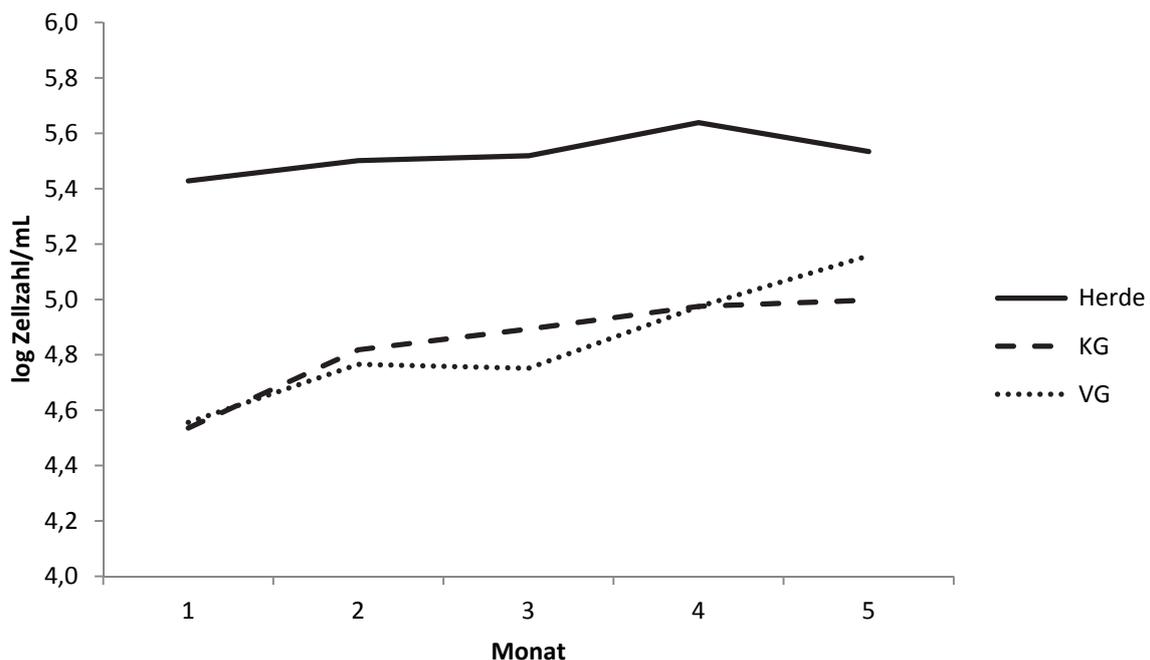


Abbildung 6 Entwicklung der logarithmierten Mittelwerte der Zellzahlen der MLP der gesamten Herde, sowie der Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) im Versuchszeitraum

4.2.2.2 Laktationstage und Milchleistung

Die Tabelle 20 zeigt Mediane der Latktionstage (DIM) und die geometrischen Mittelwerte der Milchleistungen in Kontroll- und Versuchsgruppe. Zu den gemessenen Zeitpunkten besteht kein signifikanter Unterschied der Laktationstage und der Milchleistung zwischen den beiden Gruppen (T-Test, $p=0,666-0,707$ bzw. $0,344-0,948$).

Tabelle 20 Mediane der Laktationstage (DIM) und Geometrische Mittelwerte und Standardabweichung σ der Milchleistungen in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) an den Tagen der MLP [kg]

Datum	KG			VG		
	DIM	Milchleistung	σ	DIM	Milchleistung	σ
07.05.13	151	37,33	6,52	149	35,77	7,30
05.06.13	180	35,87	6,29	178	36,03	8,16
05.08.13	241	32,41	7,28	239	32,71	8,22
11.09.13	278	29,47	7,46	276	29,34	8,93

4.2.3 Nachweis Nisin-resistenter Bakterien als Indiz für die Kolonisierung mit dem Nisin-resistenten *L. lactis*-Stamm

Einfluss der Probenaufbereitung auf die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Platte

Als Positivkontrolle der mikrobiologischen Untersuchungen wurden zum einen Direktausstriche des in der Versuchsgruppe verwendeten Dippmittels angefertigt, zum anderen wurden in das verwendete Dippmittel getauchte Tupfer wie die aus dem Strichkanal gewonnenen Proben prozessiert und ausplattiert. Der dabei entstandene Unterschied bzw. Verlust bei Prozessierung eines Tupfers kann der Tabelle 21 entnommen werden.

Tabelle 21 Vergleich der Positivkontrollen bei Direktausstrich/Tupferausstrich [kbE/Platte]

Dekadische Verdünnung	Direktausstrich Dippmittel	Tupferausstrich Dippmittel
0	> 200	> 200
-1	> 200	> 200
-2	> 200	298
-3	> 200	51
-4	> 200	6
-5	147	0
-6	12	0
-7	4	0
-8	1	0

Auswertung des Wachstums auf Selektivnährmedium

Bei der Untersuchung der Tupferabstriche des Strichkanals zu Studienbeginn konnten nur bei 3 von 43 Vierteln der Kontrollgruppe und bei 2 von 39 Vierteln in der Versuchsgruppe Nisin-

resistente Bakterien nachgewiesen werden (Tabelle 22). Dies ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Chi-Quadrat-Test mit Kontinuitätskorrektur, $p=1,000$). Im Gegensatz dazu wurde zu beiden folgenden Probenahmezeitpunkten ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt ($p=10^{-5}$). Während die Anzahl der Viertel mit Nachweis Nisin-resistenter Bakterien in der Kontrollgruppe abnahm, stieg die Anzahl an Vierteln in der Versuchsgruppe.

Tabelle 22 Nachweis Nisin-resistenter Bakterien auf Selektivmedium von Tieren aus Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) [Anzahl der Viertel (%)]

	Mai	Juli	September
KG	3 (7,0)	1 (2,6) ^a	0 (0,0) ^a
VG	2 (5,1)	16 (42,1) ^b	24 (72,7) ^b
n	42/39	38/38	37/34

n Anzahl untersuchter Proben in KG/VG

^{a, b} Werte mit unterschiedlichen Indizes in einer Spalte unterscheiden sich signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p<0,05$) im jeweiligen Monat

4.2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

4.2.4.1 Detektion des NisinA-Gens in den Tupferproben

Die Untersuchung aller DNA-Extrakte aus den Tupferproben auf die Anwesenheit des NisinA-Gens ergab die in Tabelle 23 dargestellten Ergebnisse. Zum ersten Probenahmezeitpunkt unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich eines positiven PCR-Signals nicht signifikant voneinander (Exakter Test nach Fisher, $p=0,586$). Nachfolgend stieg die Anzahl positiv getesteter Tiere in beiden Gruppen an. Zum zweiten Probenahmezeitpunkt sind in der Versuchsgruppe signifikant mehr Tiere positiv als in der Kontrollgruppe ($p=0,01$). Bei der Abschlussuntersuchung ist ebenfalls ein Trend in diese Richtung zu erkennen ($p=0,063$).

Tabelle 23 Nachweis des NisinA-Gens in Tupferproben in Kontroll-(KG) und Versuchsgruppe (VG) [Geometrischer Mittelwert der logarithmierten Kopienanzahl/Tupfer (Anzahl positiver Proben)]

	Mai	Juli	September
KG	3,045 (3)	3,463 (3)	2,378 (5)
VG	2,198 (1)	3,535 (10)	3,381 (9)
n	11/10	11/10	11/10

4.2.4.2 Auswertung der Tupferproben mit dem PathoProof™ Mastitis PCR Assay

Aufgrund der in Tabelle 14 dargestellten falsch-positiven Ergebnisse wurde bei der Auswertung der Tupferproben die Identifikation von *E. faecium*, *E. coli*, koagulasenegative

Ergebnisse

Staphylokokken und *S. marcescens* ausgenommen. Entsprechend ergaben sich folgende Ergebnisse (Tabelle 24):

Tabelle 24 Nachweis von Mastitiserregern mittels PathoProof™ Mastitis Assay in Kontroll- (KG) und Versuchsgruppe (VG) [geometrischer Mittelwert ng/mL Tupferextrakt (Anzahl positiver Tiere)]

Erreger	Mai		Juli		September	
	KG	VG	KG	VG	KG	VG
<i>C. bovis</i>		2,59 (1)	4,99 (4)		2,96 (2)	3,48 (1)
<i>S. dysgalactiae</i>			0,21 (1)			0,05 (1)
<i>S. uberis</i>	122,89 (11)	66,73 (9)	2976,15 (11)	964,21 (10)	485,66 (11)	1188,52 (10)
<i>A. pyogenes</i>		0,02 (2)	0,01 (1)			0,13 (1)

Am häufigsten wurde *S. uberis* detektiert, wobei er als einziges der getesteten Bakterien in der Kontroll- sowie der Versuchsgruppe in jedem Monat bei der Mehrzahl der beprobten Tiere nachgewiesen wurde. Während zu Versuchsbeginn die geringsten Konzentrationen des Erregers aus den Tupferproben ermittelt wurden, stiegen diese im Versuchsverlauf in beiden Gruppen deutlich an. Die Erreger *S. aureus*, *S. agalactiae* und *K. pneumoniae* wurden in keiner Probe nachgewiesen.

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit eines *Lactococcus lactis*-basierten Zitzendippmittels zu prüfen. Eine mögliche Wachstumsbeeinflussung des Mastitiserregers *Staphylococcus aureus* durch dieses Bakterium wurde vorab in einem *in-vitro* Versuch getestet. Im Feldversuch wurden klinische Parameter erhoben, um die Vergleichbarkeit von Kontrollgruppe (Dippmittel auf Iod-Basis) und Versuchsgruppe (Dippmittel auf Basis von *L. lactis*) beurteilen und eine Beeinflussung der Zitzenhaut sowie der Eutergesundheit bei Anwendung der Dippmittel erkennen zu können. Weiterhin wurde nach Tupferprobenahme mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden eine Besiedlung des Strichkanals mit dem eingesetzten *Lactococcus lactis*-Stamm evaluiert.

Im Folgenden werden die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert, abschließend werden mögliche Perspektiven aufgezeigt.

5.1 Kritik der Methoden

Die Umstallung der Tiere einen Tag vor Versuchsbeginn und damit verbundene Unruhen und das Auftreten von auf den Spalten liegenden Tieren in den neu zusammengestellten Gruppen sind als Faktoren für die anfangs vermehrt auftretenden höheren Einstufungen beim Hygiene Score in Erwägung zu ziehen. Der Hygiene Score nahm im weiteren Versuchsverlauf in beiden Gruppen ab. Da der Infektionsdruck für die Milchdrüse steigt, je unsauberer die Tiere selbst und die Einstreu der Liegeboxen sind (Ward et al. 2002), wäre eine frühzeitigere Umstallung der Tiere im Zusammenhang mit der Gruppenbildung für den Versuchsverlauf günstiger gewesen.

Allen Tieren der Herde wurde aufgrund logistischer Gegebenheiten dieselbe Ration vorgelegt. Entsprechend stellte sich die Fütterung somit für einzelne Tiere suboptimal dar, wie auch den Kennzahlen der MLP-Berichte im Versuchszeitraum zu entnehmen ist. Von einem negativen Einfluss auf die Versuchsergebnisse ist jedoch nicht auszugehen.

Methodische Einschränkungen ergaben sich auch daraus, dass die als Studientiere ausgewählten Tiere aus Kontroll- und Versuchsgruppe während des Versuches mit den anderen Tieren der Milchviehherde von Gut Hülsenberg in den neu zusammengestellten Gruppen zusammen gehalten wurden. Eine Trennung fand nur zwischen den mit Iod behandelten Tieren (Studientiere sowie Nicht-Studientiere) und den mit dem probiotischen Dippmittel behandelten Tieren und innerhalb dieser Aufteilung nochmals zwischen uni- und pluriparen Tieren statt. Dies bedeutete, dass gleiche Stallungen und Liegeboxen von Studientieren und Nicht-Studientieren benutzt wurden. Ebenso wurde das Melken in gemischten Gruppen vollzogen und auch eine Zwischendesinfektion der Melkzeuge beispielsweise nach dem Melken von Nicht-Studientieren oder aber bei Wechsel der Gruppe von mit Iod behandelten Tieren zur *L. lactis*-Gruppe konnte nicht vollzogen werden. Hierdurch war zum einen eine Erregerverschleppung von Nicht-Studientieren auf Studientiere beider Gruppen und *vice versa*, zum anderen eine Übertragung der Laktokokken auf mit Iod behandelte Tiere möglich.

Grundsätzlich wurde der Versuch derart gestaltet, dass die Auswahl der Tiere randomisiert erfolgte. Auf Grund der Versuchsanstellung wusste die untersuchende Person bei Aufnahme der klinischen Parameter, welcher Gruppe das bonitierte Tier angehörte. Da die Beurteilung aller Tiere während derselben Melkzeit stattfand, ist die Gefahr einer Einflussnahme jedoch als gering anzusehen. Auch während der Tupferprobenahme war die Zugehörigkeit des beprobten Tieres zu Kontroll- bzw. Versuchsgruppe bekannt. Die weitere Prozessierung der Proben im Laborbereich erfolgte verblindet, sodass hier nicht von einer Beeinflussung auszugehen ist.

Die somatischen Zellzahlen der Herde lagen schon zu Versuchsbeginn deutlich über denen der Studientiere und nahmen im Versuchszeitraum stark zu. Da bekannt war, dass bei Tieren der Herde in der Vergangenheit Infektionen mit *Staphylococcus aureus* zu klinischen Mastitiden geführt haben, wäre eine bakteriologische Untersuchung aller Studientiere zu Versuchsbeginn und eine getrennte Aufstallung von den anderen Tieren der Herde wünschenswert gewesen. Da sich verschiedene *S. aureus*-Typen als kontagiöse aber auch als konstitutionelle Mastitiserreger verhalten können (De Kruif et al. 2014), wäre eine Typisierung des in der Herde vorkommenden Erregers interessant gewesen. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, wie ursprünglich geplant, bakteriologische Untersuchungen von Milchproben aller im Versuchszeitraum an Mastitiden erkrankten Tiere durchzuführen.

Bei vergleichender Betrachtung der Entwicklung der Zellzahlen der Milch in der Herde war ersichtlich, dass es in ähnlicher Weise wie im Versuchszeitraum bereits im Vorjahr zu einem erheblichen Anstieg während der Sommermonate gekommen war. Hitzestress ist auch im moderaten Klima der gemäßigten Breiten von Bedeutung (Schüller 2013). Jahreszeitliche Schwankungen des Zellzahlgehaltes der Milch und ein höheres Risiko für intramammäre Infektionen wurden bereits vielfach beschrieben (Nelson et al. 1969, Wegner et al. 1976, Schultze 1985, Winter 2009). Im Vorfeld des Versuches wäre eine Abklärung möglicher Ursachen des massiven Anstieges und damit einhergehende Verbesserungen wünschenswert gewesen, allerdings war dieses aufgrund der zeitlichen Bedingungen nicht umsetzbar. Es ist zu vermuten, dass eine Verlagerung des Versuchszeitraumes in die Wintermonate den wahrscheinlich saisonalen Effekt hätte reduzieren können.

Die vorliegende Arbeit konnte sich aufgrund der verfügbaren Tierzahlen und der Dauer der Feldstudie nicht an den Vorschlägen zur Evaluierung der Effektivität von Zitzendippmitteln des NMC (Nickerson et al. 2004) orientieren.

Im Vorfeld wurde überlegt, eine Abschätzung der Fallzahl durchzuführen, was auf Grund der Datenlage und Unsicherheit bezüglich der Effektgröße verworfen wurde. Die Arbeit wurde letztlich als Versuch mit dem Charakter einer Orientierungsstudie mit statistischer Auswertung angelegt.

Das Studiendesign des „split-herd“ Models wurde aufgrund technischer und personeller Gegebenheiten gewählt. Sowohl das „split-herd“ als auch das „split-udder“ Design werden hinsichtlich möglicher Interdependenzen auf Herden- oder auch Euter-Ebene kontrovers diskutiert (Hogan et al. 1990, Lam et al. 1996, Barkema et al. 1997, Barkema et al. 1997).

Der Einfluss der Applikationsart auf die Wirksamkeit von Zitzendippmitteln wurde bereits in mehreren Studien untersucht. So wurde beispielsweise für das Dippen im Handdippverfahren im Vergleich zur automatischen Sprühapplikation (Spühbalken) desselben iodhaltigen Präparates eine signifikant niedrigere Infektionsrate mit KNS ermittelt (Falkenberg 2002). Bei manueller Anwendung von Dippmitteln im Handdipp- und Sprühdippverfahren mit angemessener Sorgfalt gelten beide Verfahren jedoch als gleichwertig (Hansen und Hamann

2003). Dennoch wäre eine einheitliche Applikationsart im vorliegenden Versuch wünschenswert gewesen. Die Zitzen der Tiere der Kontrollgruppe wurden während, wie auch vor und nach dem Versuchszeitraum, mit der Handspritze einer Anlage besprüht, die mittels elektrischer Pumpe das iodhaltige Präparat in den Melkstand transportiert. Hingegen wurden die Tiere der Versuchsgruppe anfangs mit einer Handspritze mit Druckkolben, nach der Hälfte der Versuchszeit jedoch mit einem Handdippbecher behandelt. Durch das Leeren und neu Befüllen des Dipp-Bechers nach jedem Tier wurde versucht, ein Dippen in eventuell kontaminiertem Dippmittel zu verhindern.

Die Probenahme erfolgte nach Desinfektion der Zitzenenden mit Alkohol durch Einführen eines sterilen Tupfers in den Strichkanal, was nach dem Milchentzug erfolgte, um das Risiko einer Beschädigung von Strichkanalöffnung und Strichkanalepithel zu reduzieren (du Preez 1986, Paduch et al. 2012). Eine Kontamination der Probe aus dem Strichkanal durch Berührung der äußeren Haut, insbesondere bei hohen Zitzen-Condition-Scores, oder durch Zisternenmilch war hierbei jedoch nicht gänzlich auszuschließen. Weiterhin ist es möglich, dass bei Einführen des Tupfers in den Strichkanal eventuell noch nicht verflüchtigter Alkohol von der äußeren Haut an den Tupfer gelangt ist und hiermit aufgenommene Bakterien abgetötet haben könnte. Dies würde einen *L. lactis*-Nachweis in der PCR, jedoch nicht mittels Kulturverfahren ergeben. Weiterhin ist der Tabelle 21 zu entnehmen, dass die Prozessierung des in das Dippmittel getauchten Tupfers zu einer geringeren Ausbeute im Vergleich zum Direktausstrich des Dippmittels führt. Ursächlich hierfür könnte das Verbleiben einiger Bakterien im Transportmedium oder die nicht vollständige Ablösung aller Bakterien vom Tupfer sein.

5.1.1 Wachstumsbeeinflussung von *Lactococcus lactis* und *Staphylococcus aureus*

Die Kokultivierung von *Lactococcus lactis* LAC 0125 und *Staphylococcus aureus* (DSM 6732) ergab bei Einsatz der Stämme in Verdünnungen von jeweils 10^2 bis 10^5 Zellen pro mL keine signifikante gegenseitige Wachstumsbeeinflussung der beiden Stämme. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass sich das Wachstum von *S. aureus* bei Kokultivierung der höchsten eingesetzten Konzentration von *L. lactis* mit der geringsten eingesetzten Konzentration von *S. aureus* geringfügig verringerte, könnte eventuell mit dem Einsatz anderer Konzentrationen und/oder einer Verlängerung der Inkubationszeit eine Wachstumsbeeinflussung aufgezeigt werden. Weiterhin wäre es möglich, den pH-Wert des Inkubationsmediums gezielt einzustellen und dessen Veränderung während der Inkubation aufzunehmen. Eine Studie, in der *L. lactis* und *S. aureus* in einem auf pH 6,8 eingestellten TS-Medium kokultiviert wurden, zeigte, wie in den Untersuchungen dieser Arbeit, keine Wachstumsbeeinträchtigung von *S. aureus* nach 3 oder 6 Stunden (Alomar et al. 2008). Eine deutliche Wachstumshemmung von *S. aureus* wurde jedoch nach 24 Stunden unter diesen Bedingungen, und bereits nach 6 Stunden der Kokultivierung von *L. lactis* und *S. aureus* in auf pH 6,0 eingestellter Milch in derselben Studie nachgewiesen. Die Autoren sehen den pH-Wert als möglichen Faktor der Wachstumsbeeinflussung an. Weiterhin beschreiben sie, dass keine antimikrobiellen Substanzen im Überstand der Kulturen gefunden werden konnten. Eine Überprüfung der Exprimierung des Gens für die Nisin-Produktion bei Kokultivierung des als Zitzendippmittel eingesetzten *Lactococcus lactis*-Stammes mit Mastitserregern wäre demnach ein weiterer Ansatz zur umfassenderen Beurteilung der Effektivität des Dippmittels, da Nisin gegen viele Gram-positive Erreger, hierunter auch bedeutende Mastitserreger wirksam ist (Sears et al. 1992, Delves-Broughton et al. 1996, Wu et al. 2007, Piper et al. 2009).

5.1.2 Quantifizierung mittels des PathoProof™ Mastitis PCR Assays

Die Anwendung der Multiplex-PCR in der Mastitisdiagnostik wird bereits seit längerem untersucht (Phuektes et al. 2001, Gillespie und Oliver 2005). Mittlerweile ist der PathoProof™ Mastitis PCR Assay kommerziell erhältlich und wird von Landeslaboren zur weitergehenden Diagnostik, insbesondere bei Milchproben ohne kulturellen Erregernachweis angeboten (LKV-Weser-Ems 2014). Die Vorteile der Anwendung molekularbiologischer Techniken in der Mastitisdiagnostik wurden bereits in der Literaturübersicht beschrieben. Bei der Auswertung der Ergebnisse müssen jedoch auch alle der dort in Tabelle 3 aufgezeigten Nachteile bedacht werden.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten bei Einsatz von Kulturextrakten von 10 Mastitiserregern im PathoProof™ für die Erreger *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, koagulasenegative Staphylokokken und *Serratia marcescens* falsch-positive Ergebnisse aufzeigen. Die Erreger, die im Einsatz mit dem PathoProof™ zu den beschriebenen falsch-positiven Signalen führten, wurden wiederholt aus der von der DSMZ bezogenen Kryo-Kultur angezogen und erneut extrahiert, um Verunreinigungen der für die Quantifizierung eingesetzten Proben auszuschließen. Außerdem ergab der in dieser Arbeit als Dippmittelstamm eingesetzte *L. lactis*-Stamm bei Einsatz im PathoProof™ Signale für *Enterococcus* spp. und *Escherichia coli*. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, gibt die bereits in der Literaturübersicht zitierte Studie des Herstellers eine Spezifität des PathoProof™ von 100 % bei Einsatz von 454 Proben von Fällen klinischer Mastitis an (Koskinen et al. 2009). Darauf folgende Studien beziehen sich auf diese Ergebnisse und stellen die PCR-positiven aber Kultur-negativen Proben als falsch-negativ für den mikrobiologischen Erregernachweis dar (Taponen et al. 2009, Koskinen et al. 2010). Auch eine Feldstudie, die den PathoProof™ im Vergleich zur klassischen bakteriologischen Kultur testete, beschreibt falsch-positive PCR-Ergebnisse als unwahrscheinlich (Spittel und Hoedemaker 2012). Im Gegensatz dazu und in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit diskutiert die Autorin einer deutschen Multicenterstudie die Möglichkeit falsch-positiver Signale im PathoProof™ (Schlez et al. 2012). Von einem höheren Anteil von Mehrfachnachweisen bei Anwendung des PathoProof™ als mit kulturellen Untersuchungen berichten mehrere Studien (Koskinen et al. 2010, Bexiga et al. 2011, Spittel und Hoedemaker 2012). Dies kann mit der hohen Sensitivität der PCR erklärt werden, jedoch muss auch die Überlegung angestellt werden, ob die in der Probe enthaltene DNA zu mehreren Signalen im PathoProof™ geführt haben könnte. Weiterhin werden insbesondere koagulasenegative Staphylokokken häufig mittels PathoProof™ in Proben nachgewiesen, für die mikrobiologische Untersuchungen auf diese Bakteriengruppe negativ blieben (Koskinen et al. 2010, Bexiga et al. 2011, Spittel und Hoedemaker 2012). Auch hier ist die höhere Sensitivität der PCR, beispielsweise aufgrund von Detektion auch nicht-vitaler Organismen, ein möglicher Erklärungsansatz. Unklar ist, ob, wie in der vorliegenden Arbeit, darunter falsch-positive Ergebnisse gewesen sein können. So führte in dieser Arbeit auch der eingesetzte *S. uberis*-Stamm zu falsch-positiven Signalen für KNS. Koskinen et al. berichten von einem durch eine *Lactococcus*-Subspezies verursachten positiven mikrobiologischen Ergebnis bei 4 Proben (Koskinen et al. 2010). Hier bleibt offen, ob die entsprechenden Proben in der PCR zu einem positiven Ergebnis geführt haben. Dies wäre eine interessante Information, da die vorliegende Arbeit Signale für das eingesetzte *L. lactis*-Isolat im PathoProof™ nachweisen konnte.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sollte bei der Verwendung des PCR-Assays für einen vollständigen Überblick auf pathogene Bakterien die Möglichkeit falsch-positiver Ergebnisse bedacht werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Vergleich klinischer Parameter bei Anwendung eines Dippmittels auf Iodbasis und des *Lactococcus lactis*-Dippmittels

Die Aufnahme klinischer Parameter im Zuge der Anwendung eines *Lactococcus lactis*-haltigen Dippmittels und eines Kontrollpräparates sollte zum einen die Ausgangsbedingungen für beide Gruppen vergleichbar machen, zum anderen Auswirkungen der Behandlungen vergleichend erkennen lassen. Bei den im Versuchszeitraum aufgenommenen klinischen Parametern zeigten sich wenige Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe.

Der Hygiene-Score wurde beurteilt, da mit steigenden Hygiene-Scores der Infektionsdruck für die Milchdrüse zunimmt und auch eine signifikante Zunahme der Zellzahlen der Milch beschrieben wurde (Ward et al. 2002). Der Autor beschreibt auch, dass sich innerhalb der Hygiene Scores 1 und 2 keine signifikanten Unterschiede der Zellzahlen ergeben und ebenso bei den Scores 3 und 4. In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen in der Zuteilung zu Hygiene Score 1/2 und 3/4.

Der Grad der Hyperkeratinisierung der Strichkanäle der Studientiere wurde visuell begutachtet und mit Hilfe des Zitzenscorings nach Mein (2001) kategorisiert. Als Risikofaktoren für die Hyperkeratinisierung von Strichkanälen laktierender Rinder werden in der Literatur vor allem mechanische Reize beim Melken mit Melkmaschinen, insbesondere die Dauer des Melkens, Blindmelken und das Vakuum, beschrieben (Neijenhuis et al. 2000, Mein et al. 2003). Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen gesteigerter Hyperkeratinisierung und einem größeren Risiko des zugehörigen Viertels, an einer intramammären Infektionen zu erkranken, aufgezeigt werden (Neijenhuis et al. 2001). Der Autor schlussfolgert außerdem, dass verschiedene Mastitiserreger in unterschiedlichem Maße durch die verschiedenen Zitzen-Condition-Scores in ihrer Vermehrung und der Möglichkeit des Eindringens in den Strichkanal beeinflusst werden. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass eine gesteigerte Hyperkeratinisierung erhöhte Zellzahlen der Milch zur Folge haben kann (Bhutto et al. 2010). In einer irischen Studie konnte dieses aber nicht nachgewiesen werden (Gleeson et al. 2004). Eine neuere Untersuchung im „split-udder“ Design kommt zu dem Schluss, dass eine stärkere Hyperkeratinisierung mit einer höheren mikrobiellen Belastung des Strichkanals einhergeht (Paduch et al. 2012). So gelang signifikant häufiger der Nachweis von *E. coli* aus Tupferproben von Zitzen mit höheren Zitzen-Condition-Scores als von benachbarten Zitzen mit niedrigeren Scores. Dasselbe traf auch auf die Belastung der Zitzen mit *S. uberis* zu. Die Autoren schlussfolgern, dass ein höherer Grad der Hyperkeratinisierung des Strichkanals in Zusammenhang steht mit dessen Besiedlung durch konstitutionelle Erreger. Weiterhin deuten sie auf möglicherweise unterschiedliche Risikofaktoren für die Besiedlung durch kontagiöse Erreger hin. Eine andere Studie konnte den beschriebenen Zusammenhang zwischen gesteigerter Hyperkeratinisierung und Besiedlung des Strichkanals für die meisten „Major Pathogens“, koagulase negative Staphylokokken und auch „Minor Pathogens“ nachweisen (Bhutto et al. 2010).

In der Kontrollgruppe dieses Feldversuches wurden schon zur Aufnahmeuntersuchung und auch zu allen weiteren Untersuchungszeitpunkten signifikant mehr Viertel dem Score 4 (sehr rauer Ring) zugeordnet. Entsprechend waren diese Viertel gefährdeter in Bezug auf die Besiedlung mit Mastitiserregern. Da eine stärkere Exposition des Strichkanals mit einem

erhöhten Risiko intramammärer Infektionen einhergeht (Mein et al. 2004), ist davon auszugehen, dass im Versuchszeitraum mehr Viertel von Tieren der Kontrollgruppe diesem erhöhten Risiko ausgesetzt waren.

Generell sollte der Betrieb Maßnahmen ergreifen, die eine geringere Hyperkeratinisierung bewirken. Es bleibt offen, ob die Anwendung des *Lactococcus lactis*-haltigen Dippmittels bei Tieren mit weniger Hyperkeratinisierung zu anderen Ergebnissen führt.

5.2.2 Etablierung des als Dippmittel eingesetzten *Lactococcus lactis*-Stammes im Strichkanal und weiterführende molekularbiologische Untersuchungen

Mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Techniken wurde die Besiedlung der Strichkanäle der Studientiere mit dem als Dippmittel eingesetzten *Lactococcus lactis*-Stamm evaluiert.

Vor dem ersten Einsatz des Dippmittels konnte im Anzuchtverfahren auf Selektivmedium bei 3 Proben von Vierteln von Tieren der Kontrollgruppe und bei 2 Proben von Vierteln von Tieren der Versuchsgruppe ein Nisin-resistenter Stamm, der sich makroskopisch von dem als Positivkontrolle eingesetzten Dippmittel-Stamm nicht unterschied, nachgewiesen werden. Bei Untersuchung mittels PCR der für ein Tier gepoolten Proben konnte das NisinA-Gen bei 3 Proben von Tieren der Kontrollgruppe und bei einer Probe eines Tieres der Versuchsgruppe nachgewiesen werden. Laktokokken als indigene Bakteriengruppe des Strichkanals gesunder Tiere wurden bereits von anderen Autoren im Vorgemelk und anhand von Tupferproben aus dem Strichkanal nachgewiesen (Nader-Macias et al. 2008, Espeche et al. 2012). Im Versuchsverlauf, d.h. bei Anwendung des *L. lactis*-haltigen Dippmittels bzw. eines iodhaltigen Dippmittels in der Kontrollgruppe, stieg die Anzahl der Viertel bzw. Tiere mit positivem Ergebnis sowohl in der Kultur als auch im molekularbiologischen Nachweisverfahren an. Hierbei konnten bereits bei der ersten Tupferprobenahme nach Anwendung des *L. lactis*-haltigen Dippmittels bei allen beprobten Tieren der Versuchsgruppe das NisinA-Gen nachgewiesen werden. Da die Probenahme mindestens 11 Stunden nach der letzten Anwendung des jeweiligen Dippmittels stattgefunden hat und der Stamm noch nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass eine Kolonisierung des Strichkanals erfolgte. Die Besiedlung des Zitzenkanals hängt von den Interaktionen der Mikrobiota mit der Keratinschicht, dem Prozess von Abschilfern und Neubildung und der Wachstumsrate der Bakterien zusammen (Capuco et al. 1994). Genauere Untersuchungen sind nötig, um die Mechanismen der Adhäsion und Konkurrenz des eingesetzten Stammes mit anderen Bakterien, hierunter auch Mastitiserregern, erklären zu können. Da die Probenahme nach dem Milchentzug erfolgte, kann vermutet werden, dass sich der im Dippmittel aufgebrachte *L. lactis* nicht nur am Keratin, von dem je nach Melktechnik bis zu 40 % ausgeschwemmt wird (Mein et al. 2004), sondern auch im Bereich der Zitzenzisterne etabliert haben könnte.

Während zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach viermonatiger Anwendung der Dippmittel auch bei 5 Proben von Tieren der Kontrollgruppe ein Nachweis des *L. lactis* mittels PCR gelang, ergab das mikrobiologische Verfahren keine positiven Ergebnisse bei Proben von Tieren der Kontrollgruppe. Ursächlich für die PCR-positiven Proben von Tieren der Kontrollgruppe war vermutlich das schon in der Methodenkritik (5.1 Kritik der Methoden) beschriebene Fehlen einer Zwischendesinfektion nach dem Milchentzug von mit dem *L. lactis*-haltigen Dippmittel behandelten Tieren und vor dem Melken der Kontrolltiere.

Die bakteriologische Beschaffenheit von Anlieferungsmilch ist größtenteils von technischen Bedingungen der Melkanlage abhängig (Krömker 2007, De Kruif et al. 2014). Interessant wäre dennoch eine Beobachtung des Keimgehaltes der Milch bei Anwendung eines *L. lactis*-

haltigen Dippmittels. Da der Stamm pathogene Bakterien eventuell durch Nisinexkretion oder durch kompetitive Exklusion hemmen kann, ist fraglich, ob der Keimgehalt der Tankmilch durch die Reduktion anderer Bakterien verringert wird oder durch die Kolonisierung des *L. lactis* und eventuelle Abschwemmung in die Milch gleichbleibt oder sogar ansteigt.

Wie schon beschrieben, gehen erhöhte Zitzen-Condition-Scores mit einer erhöhten mikrobiellen Besiedlung einher. Da die oben dargestellten Ergebnisse nahe legen, dass sich der eingesetzte *L. lactis*-Stamm bei Anwendung als Dippmittel im Strichkanal etablieren lässt, ist fraglich, ob es bei steigenden Zitzen-Condition-Scores auch zu einer höheren Kolonisierung des Strichkanals bzw. seines rauen Ausganges durch diesen Stamm kommt. Sollte ein derartiger Zusammenhang nachgewiesen werden können, könnte der Einsatz eines *L. lactis*-haltigen Dippmittels besonders für Tiere mit hohem Score vorteilhaft sein. Das Dippmittel könnte zu einer erhöhten Konkurrenz innerhalb der Mikrobiota führen und beispielsweise durch Nisinexkretion oder durch kompetitive Exklusion pathogene Bakterien hemmen.

Auch während der Trockenstehperiode ist die bovine Milchdrüse einem hohen Risiko intramammärer Infektionen gegenüber ausgesetzt (Pieper et al. 2013) und könnte von der kurzzeitigen Anwendung eines *L. lactis*-haltigen Dippmittels profitieren. Für das Trockenstellen werden häufig antibiotische Trockensteller, oft in Kombination mit internen Zitzenversiegeln, eingesetzt. Da jedoch eine Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes in der Milchproduktion angestrebt wird, ist es angeraten, strategische Maßnahmen für die Trockenstehperiode dem jeweiligen Betrieb anzupassen. Neben verschiedenen anderen Maßnahmen empfehlen einige Autoren das Dippen auch während der Trockenstehperiode oder zumindest in den ersten und letzten zwei Wochen (De Kruif et al. 2014) mit dem Ziel, den Keimdruck auf der Zitzenhaut gering zu halten. Während das Zitzendippen in den letzten Tagen des Trockenstehens mit einem iodhaltigen Dippmittel keinen Effekt auf die Neuinfektionsrate zeigte (Schultze 1985), konnte eine Reduktion dieser Rate mit einem Barriere-Dippmittel, einem Dippmittel, das einen schützenden Film auf der Zitzenhaut bildet, aufgezeigt werden (Timms 2001). Eine Studie, in der einem Zitzenversiegler die Bakteriocine Nisin und Lacticin, beide produziert von einem *L. lactis*-Stamm, zugesetzt wurden, hebt die Überlegenheit und hohe Effektivität von Lacticin hervor (Ryan et al. 1998), die auch in einer weiteren Studie bekräftigt werden konnte (Ryan et al. 1999). Der Grund für den Vorteil von Lacticin gegenüber Nisin als Zusatz in Zitzenversiegeln liegt in der besseren Löslichkeit dieser Substanz bei physiologischem pH-Wert. Zu untersuchen wäre, ob das in dieser Arbeit beschriebene Dippmittel eine Reduktion der Neuinfektionsrate bei Anwendung in den ersten und letzten beiden Wochen der Trockenstehperiode zur Folge hat. Einen Vorteil könnte die nachhaltige Etablierung des *L. lactis*-Stammes auf der Euterhaut darstellen, da das Bakterium durch das Ausbleiben des Milchentzuges eventuell noch besser anheften kann. Somit wären intrazisternale Maßnahmen, wie sie das Einbringen von antibiotischen Trockenstellern oder internen Zitzenversiegeln darstellen, eventuell zu umgehen. Interessant wäre, ob das Aufbringen des Dippmittels in Verbindung mit der physiologischen Ausbildung eines Keratinfropfes gleichermaßen effizient ist, wie andere Prophylaxemaßnahmen in der Trockenstehperiode.

Mit dem verwendeten PathoProof™ Mastitis PCR Assay können laut Herstellerangabe 12 Mastitiserreger identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch einer quantitativen Auswertung der Ergebnisse des PathoProof™ vorgenommen, um genauere Aussagen über eventuelle Veränderungen der Zusammensetzung der Mikrobiota des Strichkanals der Studientiere im Versuchsverlauf treffen zu können. Da nicht alle Erreger bei

der Quantifizierung eingesetzt wurden und hierbei falsch-positive Ergebnisse auftraten, wurden die anschließend eingesetzten Tupferproben lediglich auf 7 Erreger getestet. Hierbei wurde während des gesamten Versuchszeitraumes am häufigsten und in Kontroll- und Versuchsgruppe gleichermaßen *S. uberis* detektiert. Auffällig sind hier vor allem die steigenden Konzentrationen pro gepooltem Tupferextrakt im Versuchsverlauf. Besonders hohe Infektionsraten durch diesen Erreger in den Sommermonaten wurden jedoch bereits beschrieben (Krömker 2007). Durch den Ausschluss von KNS aus der Auswertung in dieser Arbeit, kann ein Erreger, der bei Anwendung der PCR in der Mastitisdiagnostik bisher sehr häufig nachgewiesen wurde (Taponen et al. 2009, Bexiga et al. 2011, Spittel und Hoedemaker 2012), nicht abschließend diskutiert werden. Insgesamt ergaben sich, auch durch die Einschränkungen der in der Methodenkritik beschriebenen Umstände, zu wenig Nachweise für den Strichkanal der Studientiere besiedelnde Erreger, als dass eine Veränderung dessen im Zuge der Anwendung der Dippmittel hätte beurteilt werden können. Ein weiterer Grund für die wenigen Nachweise mittels PathoProof™ könnte darin liegen, dass gepoolte Proben vorliegen. Spittel und Hoedemaker beschreiben dies durch einen um 19 % reduzierten Nachweis von *S. aureus* nach dem Poolen von Proben auf Tierebene bei in Einzelgemelksproben positiven Vierteln (Spittel und Hoedemaker 2012).

5.3 Perspektive

Die vorliegende Arbeit konnte die Möglichkeit der Etablierung von *L. lactis* 0125 im Strichkanal laktierender Rinder bei Anwendung als Dippmittel nachweisen. Negative Auswirkungen auf die Tiere, evaluiert anhand ausgewählter klinischer Parameter und durch Auswertung wichtiger Daten der monatlichen MPL, wurden nicht beobachtet. Nicht zuletzt die in der Methodenkritik beschriebenen Einschränkungen, sondern auch grundlegende Fragen zur Zitzenkanalbesiedlung machen deutlich, dass bezüglich eventueller Vorteile der Anwendung eines *L. lactis*-haltigen Dippmittels Forschungsbedarf besteht.

Um die Effizienz des in dieser Arbeit eingesetzten *L. lactis*-haltigen Dippmittels besser beurteilen zu können, sollten Studien nach den Vorgaben des National Mastitis Councils erfolgen (Nickerson et al. 2004). Entsprechend ist ein Infektionsversuch, aber auch die Anwendung in einer größer angelegten Feldstudie denkbar.

Um mehr Einblick in die Mechanismen der Kolonisierung des Strichkanals zu erhalten, könnten Studien durchgeführt werden, die Tupferproben mit weiteren molekularbiologischen Methoden beleuchten. Hierzu könnte beispielsweise DGGE-Fingerprinting mit anschließender Clusteranalyse oder eine Pyrosequenzierung erfolgen. Dies könnte vor und während des Einsatzes des *L. lactis*-haltigen Dippmittels erfolgen und somit eine eventuelle Verlagerung der Mikrobiota des Strichkanals dokumentieren. Weiterhin wäre eine Untersuchung des eingesetzten Stammes mittels Transkriptomanalyse der Genexpression für Nisin und Adhäsine nach Rückgewinnung aus dem Strichkanal interessant.

6. ZUSAMMENFASSUNG

„Einfluss der Anwendung eines probiotischen Dippmittels mit *Lactococcus lactis* bei Milchkühen“

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *Lactococcus lactis*-Stamm mittels Kokultivierung auf seine Fähigkeit zur Wachstumsbeeinflussung des Mastitiserregers *Staphylococcus aureus* im *in-vitro* Versuch getestet. Weiterhin wurde der Stamm als probiotisches Dippmittel im Feldversuch bei Milchkühen eingesetzt.

Bei der Kokultivierung wurden ein *Lactococcus lactis*-Stamm und ein *Staphylococcus aureus*-Stamm in unterschiedlichen Konzentrationen in Mikrotiterplatten zusammen inkubiert und ihr Wachstum mittels Trübungsmessung beobachtet. Zur Beurteilung eventueller Wachstumsbeeinflussung wurden DNA-Extraktionen der Inkubate angefertigt und die Bakterienstämme mittels Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) quantifiziert. Eine geringfügige Wachstumshemmung von *S. aureus* war bei Kokultivierung der höchsten eingesetzten Konzentration von *L. lactis* mit der geringsten eingesetzten Konzentration von *S. aureus* zu erkennen. Alle weiteren eingesetzten Konzentrationen ließen nicht auf eine gegenseitige Beeinflussung schließen.

Im viermonatigen Feldversuch wurden 35 Tiere der Kontrollgruppe mit einem Dippmittel auf Iod-Basis gedippt, die 37 Tiere der Versuchsgruppe mit einem Dippmittel auf Basis von *L. lactis* behandelt. Es wurden klinische Parameter in monatlichem Abstand erhoben, um eine Beeinflussung der Zitzenhaut sowie der Eutergesundheit bei Anwendung der Dippmittel erkennen zu können.

Weiterhin wurde nach Tupferprobenahme mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden eine Besiedlung des Strichkanals mit dem eingesetzten *Lactococcus lactis*-Stamm evaluiert.

Die Auswertung der klinischen Parameter und ausgewählter Eutergesundheitskennwerte ergab wenige Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe. Entsprechend ist die Anwendung des in dieser Studie verwendeten probiotischen Dippmittels als gleichwertig zu dem als Kontrolle eingesetzten herkömmlichen Dippmittel auf Iodbasis einzustufen.

Der kommerziell erhältliche PathoProof™ Mastitis PCR Assay wurde mit Kulturextrakten quantifiziert, wobei falsch-positive Ergebnisse ermittelt wurden. Entsprechend konnten die Proben der Versuchstiere nicht auf alle darin enthaltenen Mastitiserreger getestet werden, weshalb eine mögliche Veränderung der Mikroflora des Strichkanals nicht beurteilt werden konnte.

Sowohl im mikrobiologischen als auch molekularbiologischen Nachweisverfahren konnte eine Etablierung des eingesetzten *Lactococcus lactis*-Stammes im Strichkanal der Milchkühe gezeigt werden.

Die erzielten Ergebnisse lassen den Einsatz eines probiotischen Dippmittels als gleichwertig gegenüber herkömmlichen Dippmitteln erscheinen, allerdings wären weitere Studien in Betrieben mit unterschiedlichen Grundvoraussetzungen hinsichtlich Haltung, Hygiene und Genetik sinnvoll.

7. SUMMARY

„Effect of the application of a probiotic teat dip with *Lactococcus lactis* in dairy cows”

In the present study, a *Lactococcus lactis* strain was tested for its ability of growth inhibition of *Staphylococcus aureus in-vitro*, using a cocultivation method. Furthermore, the strain was used in a field trial as probiotic teat dip for dairy cows.

For the cocultivation, a *Lactococcus lactis* strain and a *Staphylococcus aureus* strain were incubated in microtitre plates in different concentrations and their growth was observed by turbidity measurement. To evaluate the potential impact on bacterial growth, DNA was extracted from all incubates and the strains were quantified with qPCR. A minor inhibition of growth of *S. aureus* was detected when cocultivation was performed with the highest used concentration of *L. lactis* and the lowest used concentration of *S. aureus*. No other concentration led to the implication of a mutual impact of the strains.

During the field trial over the period of four months, a control group of 35 dairy cows was dipped with a teat dip based on iodine and an experimental group of 37 animals was treated with a teat dip based on *Lactococcus lactis*. Data of clinical parameters were collected to evaluate the impact of the application of the teat dips on the teat skin as well as the udder health.

Furthermore, the colonization of the teat canal by the applied *Lactococcus lactis* strain was evaluated, using microbiological and molecular biological methods after taking swab samples.

The evaluation of clinical parameters and selected characteristic values for udder health revealed few differences between the control and the experimental group. Accordingly, the application of the teat dip containing *Lactococcus lactis* can be classified as comparable to the teat dip used in the control group, containing iodine.

The commercially available PathoProof™ Mastitis PCR Assay was quantified with extracts of culture strains, which lead to some false-positive results. Therefore, the samples of the experimental animals could not be tested for all mastitis causing pathogens detectable with the test kit and a possible variation of the microflora of the teat canal could not be evaluated.

The establishment of the used *Lactococcus lactis* strain in the teat canal of dairy cows could be shown by microbiological as well as molecular biological methods.

With regard to the present results, the use of a probiotic teat dip seems to be comparable to conventional teat dips. However, further studies are needed to evaluate the effects of the probiotic teat dip under different conditions, including animal housing, hygiene and genetics.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Alomar, J., P. Loubiere, C. Delbes, S. Nouaille und M. C. Montel (2008). Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiology* 25(3): 502-508.

Barkema, H. W., Y. H. Schukken und T. J. G. M. Lam (1997). Design and evaluation of field studies on subclinical mastitis dealing with interdependence among quarters of the bovine udder. *Epidemiologie et Sante Animale* 31(32): 1-13.

Barkema, H. W., Y. H. Schukken, T. J. G. M. Lam, D. T. Galligan, M. L. Beiboer und A. Brand (1997). Estimation of Interdependence Among Quarters of the Bovine Udder with Subclinical Mastitis and Implications for Analysis. *Journal of dairy Science* 80(8): 1592-1599.

Bexiga, R., M. T. Koskinen, J. Holopainen, C. Carneiro, H. Pereira, K. A. Ellis und C. L. Vilela (2011). Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *Journal of Dairy Research* 78(1): 49-55.

Bhutto, A. L., R. D. Murray und Z. Woldehiwet (2010). Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. *Veterinary Journal* 183(1): 63-67.

Blowey, R. und P. Edmondson (1996). Teat disinfection in dairy herds. *In Practice* 18(6): 254-260.

Boddie, R. L. und S. C. Nickerson (1992). Evaluation of postmilking teat germicides containing LauricidinReg., saturated fatty acids, and lactic acid. *Journal of dairy Science* 75(6): 1725-1730.

Boddie, R. L., S. C. Nickerson und R. W. Adkinson (1997). Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of dairy Science* 80(11): 2809-2814.

Boddie, R. L., S. C. Nickerson und G. K. Kemp (1994). Efficacy of two barrier teat dips containing chlorous acid germicides against experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of dairy Science* 77(10): 3192-3197.

Braem, G., S. De Vlieghe, K. Supré, F. Haesebrouck, F. Leroy und L. De Vuyst (2011). (GTG)5-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. *Veterinary Microbiology* 147(1-2): 67-74.

Braem, G., S. De Vlieghe, B. Verbist, M. Heyndrickx, F. Leroy und L. De Vuyst (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Veterinary Microbiology* 157(3-4): 383-390.

- Braem, G., S. De Vliegher, B. Verbist, V. Piessens, E. Van Coillie, L. De Vuyst und F. Leroy (2013). Unraveling the microbiota of teat apices of clinically healthy lactating dairy cows, with special emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Journal of dairy Science* 96(3): 1499-1510.
- Brandao, R. L., I. M. Castro, E. A. Bampirra, S. C. Amaral, L. G. Fietto, M. J. Tropaia, M. J. Neves, R. G. Dos Santos, N. C. Gomes und J. R. Nicoli (1998). Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 564-568.
- Breves, G. H., O.; Schöneberger, M. ; Winckler, C. (1997). Untersuchungen zum Einfluß von Probiotika auf die intestinale Glucose- und Alaninaufnahme beim Schwein. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 6(45).
- Budras, K.-D. (2002). *Atlas der Anatomie des Rindes*. Hannover, Schlütersche.
- Buts, J. P., P. Bernasconi, J. P. Vaerman und C. Dive (1990). Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Digestive Diseases and Sciences* 35(2): 251-256.
- Cao, L. T., J. Q. Wu, F. Xie, S. H. Hu und Y. Mo (2007). Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *Journal of dairy Science* 90(8): 3980-3985.
- Capuco, A. V., G. A. Mein, S. C. Nickerson, L. J. Jack, D. L. Wood, S. A. Bright, R. A. Aschenbrenner, R. H. Miller und J. Bitman (1994). Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *Journal of dairy Science* 77(1): 64-74.
- Castagliuolo, I., J. T. LaMont, S. T. Nikulasson und C. Pothoulakis (1996). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infection and Immunity* 64(12): 5225-5232.
- Collins, R. A., K. R. Parsons, T. R. Field und A. J. Bramley (1988). Histochemical localization and possible antibacterial role of xanthine oxidase in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Research* 55(1): 25-32.
- Crispie, F., M. Alonso-Gómez, C. O'Loughlin, K. Klostermann, J. Flynn, S. Arkins, W. Meaney, R. Paul Ross und C. Hill (2008). Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research* 75(03): 374-384.
- Dahme, E. (2007). *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Stuttgart, Enke.
- Davidson, J. N. und D. C. Hirsh (1976). Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. *Infection and Immunity* 13(6): 1773-1774.
- De Kruif, A., M. Feldmann und M. Hoedemaker (2014). *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. Stuttgart, Enke.

- De Vliegher, S., H. Laevens, L. A. Devriese, G. Opsomer, J. L. M. Leroy, H. W. Barkema und A. de Kruif (2003). Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Veterinary Microbiology* 92(3): 245-252.
- De Vliegher, S., G. Opsomer, A. Vanrolleghem, L. A. Devriese, O. C. Sampimon, J. Sol, H. W. Barkema, F. Haesebrouck und A. de Kruif (2004). In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Veterinary Microbiology* 101(3): 215-221.
- Delcenserie, V., D. Martel, M. Lamoureux, J. Amiot, Y. Boutin und D. Roy (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology* 10(1/2): 37-54.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans und J. Hugenholtz (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 69(2): 193-202.
- Devriese, L. A. und H. d. Keyser (1980). Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *Journal of Dairy Research* 47(1): 155-158.
- Dinsmore, R. P., P. B. English, R. N. Gonzalez und P. M. Sears (1992). Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 75(10): 2706-2712.
- Djabri, B., N. Bareille, F. Beaudeau und H. Seegers (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Veterinary Research* 33(4): 335-357.
- Doggweiler, R. und E. Hess (1983). Somatic cell counts in milk from healthy udders. *Milchwissenschaft* 38(1): 5-8.
- du Preez, J. H. (1986). The prevalence of teat canal infections in lactating dairy cows as determined from foremilk and teat canal swab samples. *Journal of the South African Veterinary Association* 57(4): 193-198.
- DVG (2009). Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. Gießen, Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft.
- DVG (2010). Stellungnahme des Sachverständigenausschusses zur Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Mastitisiagnostik. *Deutsches Tierärzteblatt*: 914-917.
- DVG (2012). Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Gießen, Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft.
- Espeche, M. C., M. C. Otero, F. Sesma und M. E. Nader-Macias (2009). Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology* 135(3-4): 346-357.

- Espeche, M. C., M. C. Otero, F. Sesma und M. E. F. Nader-Macias (2009). Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology* 135(3–4): 346-357.
- Espeche, M. C., M. Pellegrino, I. Frola, A. Larriestra, C. Bogni und M. E. F. Nader-Macias (2012). Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe* 18: 103-109.
- Falkenberg, U. (2002). Untersuchungen zum Einsatz verschiedener Zitzendippverfahren in der Melkhygiene. Dissertation, FU Berlin.
- FAO/WHO, J. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO / WHO.
- Farnsworth, R. J., D. W. Johnson und L. Dewey (1976). Screening Tests for New Teat Dips. *Journal of dairy Science* 59(11): 1997-2000.
- Fischer-Tenhagen, C. (2013). Klassische und neue Ansätze zur Erregerdiagnostik bei Mastitis. 13. Modul zur Weiterbildung zum Fachtierarzt Rind. Tierklinik für Fortpflanzung, FU Berlin.
- Floch, M. H., H. J. Binder, B. Filburn und W. Gershengoren (1972). The effect of bile acids on intestinal microflora. *American Journal of Clinical Nutrition* 25(12): 1418-1426.
- Foret, C. J., C. Corbellini, S. Young und P. Janowicz (2005). Efficacy of two iodine teat dips based on reduction of naturally occurring new intramammary infections. *Journal of dairy Science* 88(1): 426-432.
- Gedek, B. (1975). The action of the yeast preparation Perenterol. *Münchener medizinische Wochenschrift* 117(3): 97-98.
- Gibson, G. R. und M. B. Roberfroid (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125(6): 1401-1412.
- Gill, J., P. M. Sabour, J. Gong, H. Yu, K. E. Leslie und G. M.W. (2006). Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 471-481.
- Gillespie, B. E. und S. P. Oliver (2005). Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of dairy Science* 88(10): 3510-3518.
- Gleeson, D. E., W. J. Meaney, E. J. O'Callaghan und M. V. Rath (2004). Effect of teat hyperkeratosis on somatic cell counts of dairy cows. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2(2): 115-122.
- Görke, B. (2000). Untersuchung der Schleimhautmorphologie im Dünn- und Dickdarm nach oraler Applikation von *Saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* beim Schwein. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

- Görke, B. und E. Liebler-Tenorio (2001). Probiotika: Gibt es wissenschaftliche Grundlagen für Ihre Wirkung? (Literaturübersicht). Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 108(6): 249-251.
- Guarner, F. und J.-R. Malagelada (2003). Gut flora in health and disease. The Lancet 361(9356): 512-519.
- Gueimonde, M., A. Margolles, C. G. de los Reyes-Gavilán und S. Salminen (2007). Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile — A preliminary study. International Journal of Food Microbiology 113(2): 228-232.
- Guidry, A. J. und R. H. Miller (1986). Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. Journal of dairy Science 69(7): 1799-1805.
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O. und Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Veterinary Quarterly 29:1, 18-31
- Hansen, S. und J. Hamann (2003). Maßnahmen zur Desinfektion der bovinen Zitze - Ziele, Verfahren, Produkte. Der Praktische Tierarzt 84(10): 780-793.
- Hewicker-Trautwein, M. (2007). Pathohistologie für die Tiermedizin. Milchdrüse. Stuttgart, Enke.
- Hillerton, J. E., J. Cooper und J. Morelli (2007). Preventing bovine mastitis by a postmilking teat disinfectant containing acidified sodium chlorite. Journal of dairy Science 90(3): 1201-1208.
- Hogan, J. S., D. M. Galton, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver und J. W. Pankey (1990). Protocols for evaluating efficacy of postmilking teat dips. Journal of dairy Science 73(9): 2580-2585.
- Hogan, J. S., J. W. Pankey und A. H. Duthie (1987). Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. Journal of dairy Science 70(5): 927-934.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, D. A. Todhunter und P. S. Schoenberger (1995). Efficacy of a barrier teat dip containing .55% chlorhexidine for prevention of bovine mastitis. Journal of dairy Science 78(11): 2502-2506.
- Hsu, S., Breukink, E., De Kruijff, B., Bonvin, A. und van Nuland, N. (2002). Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. Biochemistry 41(24):7670-6.
- ImmuCell. (2014). <http://immucell.com/>. zuletzt besucht: 15.04.2014.
- Jahn, H. U., R. Ullrich, T. Schneider, R. M. Liehr, H. L. Schieferdecker, H. Holst und M. Zeitz (1996). Immunological and trophical effects of Saccharomyces boulardii on the small intestine in healthy human volunteers. Digestion 57(2): 95-104.

- Kateete, D., C. Kimani, F. Katabazi, A. Okeng, M. Okee, A. Nanteza, M. Joloba und F. Najjuka (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 9(1): 23.
- Klostermann, K., F. Crispie, J. Flynn, W. J. Meaney, R. Paul Ross und C. Hill (2010). Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *Journal of Dairy Research* 77(2): 231-238.
- Klostermann, K., F. Crispie, J. Flynn, R. P. Ross, C. Hill und W. Meaney (2008). Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research* 75(3): 365-373.
- König, H. E. (2005). *Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Stuttgart, Schattauer.
- Koskinen, M. T., J. Holopainen, S. Pyörala, P. Bredbacka, A. Pitkala, H. W. Barkema, R. Bexiga, J. Roberson, L. Solverod, R. Piccinini, D. Kelton, H. Lehmusto, S. Niskala und L. Salmikivi (2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of dairy Science* 92(3): 952-959.
- Koskinen, M. T., G. J. Wellenberg, O. C. Sampimon, J. Holopainen, A. Rothkamp, L. Salmikivi, W. A. van Haeringen, T. J. G. M. Lam und S. Pyörälä (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of dairy Science* 93(12): 5707-5715.
- Krömker, V. (2007). *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Stuttgart, Parey.
- Krömker, V. (2013). *Klinische Mastitiden ohne bakteriologischen Befund - Ursachen und Relevanz. Kompendium Nutztier 2013*. Stuttgart, Enke.
- Lacy-Hulbert, S. J. und J. E. Hillerton (1995). Physical characteristics of the bovine teat canal and their influence on susceptibility to streptococcal infection. *Journal of Dairy Research* 62(3): 395-404.
- Lam, T. J. G. M., M. C. M. Dejong, Y. H. Schukken und A. Brand (1996). Mathematical Modeling to Estimate Efficacy of Postmilking Teat Disinfection in Split-Udder Trials of Dairy Cows. *Journal of dairy Science* 79(1): 62-70.
- Lefcourt, A. M. und R. M. Akers (1983). Is oxytocin really necessary for efficient milk removal in dairy cows? *Journal of dairy Science* 66(10): 2251-2259.
- Leslie, K. E., C. S. Petersson, E. Vernooy und A. Bashiri (2005). Efficacy of an iodophore teat disinfectant against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in experimental challenge. *Journal of dairy Science* 88(1): 406-410.

- Leslie, K. E., E. Vernooy, A. Bashiri und R. T. Dingwell (2006). Efficacy of two hydrogen peroxide teat disinfectants against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of dairy Science* 89(9): 3696-3701.
- Lilly, D. M. und R. H. Stillwell (1965). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147(3659): 747-748.
- LKV-Weser-Ems (2014). <http://www.lkv-we.de/Startseite.html>. zuletzt besucht: 12.04.2014.
- Makovec, J. A. und P. L. Ruegg (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of dairy Science* 86(11): 3466-3472.
- Mein, G., D. Reinemann, N. Schurin und I. Ohnstad (2004). Milking Machines And Mastitis Risk: A Storm In A Teatcup. 2004 meeting of the National Mastitis Council.
- Mein, G. A., et al. (2001). Evaluation of Bovine Teat Condition in commercial Dairy Herds: 1. Non-Infectious Factors. NMC and AABP meeting, Vancouver.
- Mein, G. A., D. M. D. Williams und D. J. Reinemann (2003). Effects of milking on teat-end hyperkeratosis: 1. Mechanical forces applied by the teatcup liner and responses of the teat. 42nd annual meeting of the National Mastitis Council, Fort Worth Texas.
- Monsallier, F., I. Verdier-Metz, C. Afabriel, B. Martin und M.-C. Montel (2012). Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Science and Technology* 92: 265-278.
- Müller, U., A. Neu-Zahren und H. Sauerwein (2006). Milking-induced changes of the teat canal: review of investigation methods and first results from testing teat canal penetrability. *Milchwissenschaft* 61(3): 242-245.
- Muralidhara, K. S., Sandine, W.E., England, D.C., Elliker, P.R. (1973). Colonization of *E. coli* and *Lactobacillus* in intestines of pigs. *Journal of dairy Science* 56: 633-635.
- Nader-Macias, M. E., M. C. Otero, M. C. Espeche und N. C. Maldonado (2008). Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35(11): 1387-1395.
- Natzke, R. P., R. W. Everett, R. S. Guthrie, J. F. Keown, A. M. Meek, W. G. Merrill, S. J. Roberts und G. H. Schmidt (1972). Mastitis Control Program: Effect on Milk Production. *Journal of dairy Science* 55(9): 1256-1260.
- Naumann, A. und Brungs, A. (2014). MLP Daten – Basis für ein Frühwarnsystem zur Überwachung der Eutergesundheit auf Herdenebene. Tagung Eutergesundheit, Halle/Saale
- Neave, F. K., F. H. Dodd, R. G. Kingwill und D. R. Westgarth (1969). Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management. *Journal of dairy Science* 52(5): 696-707.
- Neijenhuis, F., H. W. Barkema, H. Hogeveen und J. P. T. M. Noordhuizen (2000). Classification and Longitudinal Examination of Callused Teat Ends in Dairy Cows. *Journal of dairy Science* 83(12): 2795-2804.

- Neijenhuis, F., H. W. Barkema, H. Hogeveen und J. P. T. M. Noordhuizen (2001). Relationship Between Teat-End Callosity and Occurrence of Clinical Mastitis. *Journal of dairy Science* 84(12): 2664-2672.
- Nelson, F. E., H. Tranmal, J. D. Schuh, T. N. Wegner und G. H. Stott (1969). Criteria of abnormal milk from individual quarters during a period of high temperatures. *Journal of dairy Science* 52(6): 912-913.
- Newbould, F. H., P. G. Carey und D. A. Barnum (1970). The numbers of intramammary infections and teat duct colonizations in a herd of twins during a hygiene experiment. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 34(3): 203-208.
- Nickerson, S. C. (2001). Choosing the best teat dip for mastitis control and milk quality. *NMC-PDPW Milk Quality Conference Proceedings*: 43.
- Nickerson, S. C., J. W. Pankey, J. L. Watts und N. T. Boddie (1983). Role of the teat end in preventing bovine mastitis. *Louisiana Agriculture* 26(4): 6-8.
- Nickerson, S. C., A. Saxon, F. L. K., H. T., J. S. Hogan, M. J., S. P. Oliver, O. W.E., P. M. und P. L. (2004). Recommended protocols for evaluating efficacy of postmilking teat germicides. *NMC Annual Meeting 2004*.
- NMC (2013). Summary of peer-reviewed publications on efficacy of premilking and postmilking teat disinfectants published since 1980. *NMC Annual Meeting 2013, San Diego*.
- Ohashi, Y., R. Inoue, K. Tanaka, T. Matsuki, Y. Umesaki und K. Ushida (2001). *Lactobacillus casei* strain Shirota-fermented milk stimulates indigenous *Lactobacilli* in the pig intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 47(2): 172-176.
- Ohashi, Y. und K. Ushida (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal* 80(4): 361-371.
- Ölschläger, T. A. u. H., J. (2009). *Definition und Wirkmechanismen der Probiotika, Präbiotika und Synbiotika*. Stuttgart, Thieme.
- Oxford, A. E. (1944). Diplococcin, an anti-bacterial protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochemical Journal* 38(2): 178-182.
- Paduch, J.-H., E. Mohr und V. Krömker (2012). The association between teat end hyperkeratosis and teat canal microbial load in lactating dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 158(3-4): 353-359.
- Paduch, J. H. und V. Krömker (2011). Die mikrobielle Besiedlung des Zitzenkanals bei Milchkühen - Bedeutung und Einflussfaktoren. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 124(3/4): 114-122.
- Pankey, J. W., R. L. Boddie und W. N. Philpot (1984). Evaluation of linear dodecyl benzene sulfonic acid as a teat dip in a commercial dairy. *Journal of dairy science* 67(6): 1354-1358.
- Pankey, J. W., R. J. Eberhart, A. L. Cuming, R. D. Daggett, R. J. Farnsworth und C. K. McDuff (1984). Uptake on postmilking teat antiseptics. *Journal of dairy Science* 67(6): 1336-1353.

- Pankey, J. W. und J. L. Watts (1983). Evaluation of spray application of postmilking teat sanitizer. *Journal of dairy Science* 66(2): 355-358.
- Pankey, J. W., J. L. Watts und S. C. Nickerson (1985). Field studies on linear dodecyl benzene sulfonic acid teat dip. *Journal of dairy Science* 68(6): 1523-1530.
- Paulrud, C. O. (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary Research Communications* 29(3): 215-245.
- Petzoldt, K., Müller, E. (1986). Tierexperimentelle und zellbiologische Untersuchungen zur Wirkung von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926 bei der unspezifischen Steigerung der Infektionsabwehr. Stuttgart, Thieme.
- Philpot, W. N. und J. W. Pankey Jr (1975). Hygiene in the Prevention of Udder Infections III. Effectiveness of 59 Teat Dips for Reducing Bacterial Populations on Teat Skin. *Journal of dairy Science* 58(2): 209-216.
- Phuektes, P., P. D. Mansell und G. F. Browning (2001). Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of dairy Science* 84(5): 1140-1148.
- Pieper, J., M. Hoedemaker und V. Krömker (2013). Zur Bedeutung der Trockenperiode für die Entstehung und Vorbeugung von Neuinfektionen der bovinen Milchdrüse. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 41(5): 315-324.
- Piepers, S., G. Opsomer, H. W. Barkema, A. de Kruif und S. De Vliegher (2010). Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than noninfected heifers. *Journal of dairy Science* 93(5): 2014-2024.
- Piper, C., P. D. Cotter, R. P. Ross und C. Hill (2009). Discovery of medically significant lantibiotics. *Current Drug Discovery Technologies* 6(1): 1-18.
- Piper, C., L. A. Draper, P. D. Cotter, R. P. Ross und C. Hill (2009). A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(3): 546-551.
- Pitkala, A., M. Haveri, S. Pyorala, V. Myllys und T. Honkanen-Buzalski (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of dairy Science* 87(8): 2433-2441.
- Rainard, P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research* 34(5): 647-670.
- Rainard, P. und C. Riollet (2003). Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development* 43(5): 439-457.
- Rainard, P. und C. Riollet (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* 37(3): 369-400.

- Riedl, J., E. Kiossis, M. Muller, S. Seidl, R. Stolla und W. Hermanns (2004). Endoscopic, pathologic-anatomic and histologic findings in the bovine teat. 2. Changes in the area of Furstenberg's rosette. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 111(11): 423-429.
- Rinttila, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogius und A. Palva (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97(6): 1166-1177.
- Rosenberger, G. und G. Dirksen (1990). *Die klinische Untersuchung des Rindes*. Berlin, Parey.
- Rossmannith, W. und K. Fehlings (2013). Polymerase chain reaction for detection of mastitis pathogens. *Der Praktische Tierarzt* 94(12).
- Ruegg, P. L. (2002). Udder Hygiene Scoring Chart. <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/udder-hygiene-scoring-chart.pdf> zuletzt besucht: 15.04.2014.
- Ryan, M. P., J. Flynn, C. Hill, R. P. Ross und W. J. Meaney (1999). The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *Journal of dairy Science* 82(12): 2625-2631.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross und C. Hill (1998). Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64(6): 2287-2290.
- Schlez, K., H. Seeger, R. Huber-Schlenstedt, M. Alex, M. Hassel, T. Eisenberg, K. Fehlings und M. Zschöck (2012). Ergebnisse einer Multicenterstudie zur Mastitisdiagnostik: Vergleich zwischen kultureller Untersuchung und einer kommerziellen Real-Time-PCR (Pathoproof[®] Mastitis). Tagungsband zur Tagung der Arbeitsgruppe Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Fachgruppe Milchhygiene Grub
- Schüller, L.-K., O. Burfeind und W. Heuwieser (2013). Hitzestress in Deutschland? Auswirkungen auf Fruchtbarkeit, Milchleistung und Behandlungsentscheidungen. Vortragsband bpt-Kongress 2013: 167-169.
- Schukken, Y. H., R. N. Gonzalez, L. L. Tikofsky, H. F. Schulte, C. G. Santisteban, F. L. Welcome, G. J. Bennett, M. J. Zurakowski und R. N. Zadoks (2009). CNS mastitis: nothing to worry about? (Special Issue: Heifer and CNS mastitis). *Veterinary Microbiology* 134(1/2): 9-14.
- Schukken, Y. H.; Barkema, H. W.; Lam, T. J. G. M.; Zadoks, R. N. (2008). Improving udder health on well managed farms: mitigating the 'perfect storm'. In: Lam, T.J.G.M. (Ed.) (2008). *Mastitis control: from science to practice*. Wageningen, Academic.
- Schukken, Y. H., J. A. H. Smit, F. J. Grommers, D. Vandegeer und A. Brand (1989). Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *Journal of dairy Science* 72(7): 1900-1906.

- Schultze, W. D. (1985). Control of new intramammary infection at calving by prepartum teat dipping. *Journal of dairy Science* 68(8): 2094-2099.
- Schultze, W. D. und S. C. Bright (1983). Changes in penetrability of bovine papillary duct to endotoxin after milking. *American Journal of Veterinary Research* 44(12): 2373-2375.
- Sears, P. M., B. S. Smith, W. K. Stewart, R. N. Gonzalez, S. D. Rubino, S. A. Gusik, E. S. Kulisek, S. J. Projan und P. Blackburn (1992). Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *Journal of dairy Science* 75(11): 3185-3190.
- Senft, B., F. Meyer und R. Romer (1990). The importance of lipids associated with teat canal keratin in the anti-bacterial system of bovine mammary glands. *Milchwissenschaft* 45(1): 18-21.
- Serieys, F. und B. Poutrel (1996). Field trial evaluation of two teat dips containing nisin or polyvinylpyrrolidone iodophor designed for use before and after milking. *Veterinary Research* 27(3): 295-303.
- Shamay, A., R. Homans, Y. Fuerman, I. Levin, H. Barash, N. Silanikove und S. J. Mabeesh (2005). Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *Journal of dairy Science* 88(2): 569-576.
- Sol, J., O. C. Sampimon, E. Hartman und H. W. Barkema (2002). Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Veterinary Microbiology* 85(3): 241-249.
- Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver und D. DeRosa (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of dairy Science* 80(8): 1851-1865.
- Sordillo, L. M. und K. L. Streicher (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7(2): 135-146.
- Spittel, S. und M. Hoedemaker (2012). Mastitis diagnosis in dairy cows using PathoProof™ real-time polymerase chain reaction assay in comparison with conventional bacterial culture in a Northern German field study. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 125(11/12): 494-502.
- Stewart, G. A. und W. N. Philpot (1982). Efficacy of a quaternary ammonium teat dip for preventing intramammary infections. *Journal of dairy Science* 65(5): 878-880.
- Supré, K., S. De Vlieghe, O. C. Sampimon, R. N. Zadoks, M. Vaneechoutte, M. Baele, E. De Graef, S. Piepers und F. Haesebrouck (2009). Technical note: Use of transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative *Staphylococcus* species originating from bovine milk and teat apices. *Journal of dairy Science* 92(7): 3204-3210.
- Taponen, S., J. Bjorkroth und S. Pyorala (2008). Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal of Dairy Research* 75(4): 422-429.

- Taponen, S., L. Salmikivi, H. Simojoki, M. T. Koskinen und S. Pyorala (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of dairy Science* 92(6): 2610-2617.
- Taylor, B. C., J. D. Dellinger, J. S. Cullor und J. L. Stott (1994). Bovine Milk Lymphocytes Display the Phenotype of Memory T Cells and Are Predominantly CD8+. *Cellular Immunology* 156(1): 245-253.
- Taylor, J. L., A. Hirsch und A. T. R. Mattick (1949). The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Veterinary Record* 61(16): 197-198.
- Thompson-Crispi, K., Atalla, H., Miglior, F. und Mallard, B. (2014). Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Journal of dairy Science* 97(11): 6964-6969.
- Timms, L. (2001). Field trial evaluations of a novel persistent barrier teat dip for preventing mastitis during the dry period and as a potential substitute for dry cow antibiotic therapy. National Mastitis Council Annual Meeting, Fergus.
- Trmcic, A., C. Monnet, I. Rogelj und B. Bogovic Matijasic (2011). Expression of nisin genes in cheese--a quantitative real-time polymerase chain reaction approach. *Journal of dairy Science* 94(1): 77-85.
- Tsukahara, T., K. Hashizume, H. Koyama und K. Ushida (2006). Stimulation of butyrate production through the metabolic interaction among lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, and lactic acid-utilizing bacteria, *Megasphaera elsdenii*, in porcine cecal digesta. *Animal Science Journal* 77(4): 454-461.
- Verdier-Metz, I., G. Gagne, S. Bornes, F. Monsallier, P. Veisseire, C. Delbes-Paus und M. C. Montel (2012). Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Applied and Environmental Microbiology* 78(2): 326-333.
- Ward, W. R., J. W. Hughes, W. B. Faull, P. J. Cripps, J. P. Sutherland und J. E. Sutherst (2002). Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Veterinary Record* 151(7): 199-206.
- Wegner, T. N., J. D. Schuh, F. E. Nelson und G. H. Stott (1976). Effect of stress on blood leucocyte and milk somatic cell counts in dairy cows. *Journal of dairy Science* 59(5): 949-956.
- Wendt, K. (1994). Euter- und Gesäugekrankheiten. Jena, Stuttgart, G. Fischer.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O., Bierbaum, G., de Kruijff, B. und Sahl, H. (2001). Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 1772-1779.
- Williamson, J. H. und S. J. Lacy-Hulbert (2013). Effect of disinfecting teats post-milking or pre- and post-milking on intramammary infection and somatic cell count. *New Zealand Veterinary Journal* 61(5): 262-268.

- Winckler, C., B. Schröder und G. Breves (1998). Effects of *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus* var. *caron* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on epithelial transport functions in pig jejunum. *Zeitschrift für Gastroenterologie Suppl.* 1: 30-37.
- Winter, P. (2009). *Praktischer Leitfaden Mastitis*. Stuttgart, Parey.
- Woodward, W. D., A. C. Ward, L. K. Fox und L. B. Corbeil (1988). Teat skin normal flora and colonization with mastitis pathogen inhibitors. *Veterinary Microbiology* 17(4): 357-365.
- Wu, J., S. Hu und L. Cao (2007). Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(9): 3131-3135.
- Zadoks, R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, Y. T. Grohn und Y. H. Schukken (2001). Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *Journal of dairy Science* 84(3): 590-599.
- Zecconi, A., J. Hamann, V. Bronzo und G. Ruffo (1992). Machine-induced teat tissue reactions and infection risk in a dairy herd free from contagious mastitis pathogens. *Journal of Dairy Research* 59(3): 265-271.
- Zoche, W., W. Heuwieser, V. Krömker (2011). Risikoorientiertes Monitoring der Eutergesundheit: Eine Literaturübersicht. *Tierärztliche Praxis Großtiere* (2): 88-94.

9. ANHANG

Bewertungsschlüssel Klinische Parameter

Tabelle 25 Befundsschlüssel zur klinischen Untersuchung des Euters, der Zitzen- und Euterhaut nach Rosenberger und Dirksen (1990)

Parameter	Klassifizierung
Euterhaut	0 = ohne besonderen Befund 1 = Euterhautödem 2 = Euterhautrisse
Zitzenhaut	0 = ohne besonderen Befund 1 = Zitzenhautläsion
Euterdrüsengewebe	0 = insgesamt feinkörnig und weich 1 = insgesamt grobkörnig, aber weich 2 = allgemein grobkörnig, derb mit einzelnen Knoten 3 = allgemein grobknotig 4 = grobknotig mit einzelnen diffusen Verhärtungen 5 = insgesamt diffus verhärtet 6 = akut geschwollen, vermehrt warm, schmerzhaft 7 = abkalbebedingtes Euterödem 8 = Atrophie des Gewebes 9 = pralles Viertel

Tabelle 26 Zitzen Condition Score nach Mein (2001)

Score	Beschreibung
1	kein Ring; das Zitzenende ist glatt und eben
2	glatter Ring; die Öffnung des Strichkanals ist erhaben, aber glatt bis geringfügig rau; kein altes Keratin sichtbar
3	erhabener, rauher Ring; mit Keratin, das sich 1-3 mm über die Öffnung des Strichkanals hinaus erstreckt
4	sehr rauher Ring; erhabener Ring, der mit über 4 mm Keratin über die Öffnung des Strichkanals hinausreicht

Weitere Chemikalien und Geräte

Weitere eingesetzte Chemikalien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
10x TEN, Assay Buffer	BIO-RAD, München, Deutschland
Accu Block™ Digital Dry Bath	Labnet International, Inc., Edison, USA
Anaerocult™ C	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank memmert	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
eppendorf Centrifuge 5430	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling/Berzdorf, Deutschland
Hirn-Herz-Infus-(BHI)-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33258	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Labor-pH-Meter Mettler Toledo	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Laborwaage Acculab Atilon	Sartorius AG, Göttinge, Deutschland
Lateralschüttler SM-30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatte Brand plates™	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
MRS-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Mx3000P®, Stratagene	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Nano-Drop® ND-3300	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Nisin (<i>Lc. Lactis</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
NucleoSpin® Tissue	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Peptonwasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PYG-Medium	DSMZ Medium 104, verwendete Chemikalien von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, sowie Merck KGaA, Darmstadt und Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	Quiagen GmbH, Hilde, Deutschland
Real Time-PCR-Gefäße	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland

RNAlater, RNA Stabilization Reagent	Quiagen GmbH, Hilden
Salzsäure, 1 mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Schafblut, defibriniert	Oxoid Limited, Hampshire, England
Sicherheitswerkbank Airstream® Max	Esco Technologies, Inc., Hatboro, USA
Software MxPro QPCR, Stratagene	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße	VWR International, Leuven, Belgien
Stratagene Brilliant II SybrGreen 2x with Rox	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Thomakammer	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v.d.Rhön, Deutschland
Trimethoprim	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tryptic-Soja-Bouillon (TSB)	Oxoid LTD, Basingstoke, England
Vakuumpumpe KNF Lab laboport	KNF Neuberger, INC., Trenton, USA
Vakuumfiltrationseinheit 0,2µl PES-Membran	VWR International, Leuven, Belgien

10. DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank geht an

... Herrn Professor Dr. Zentek für die Überlassung des praxisrelevanten und für mich besonders interessanten Themas. Ich möchte mich ebenso für die hilfreiche Unterstützung, und die ermöglichte Finanzierung bedanken.

... die H. Wilhelm Schaumann GmbH für die Bereitstellung der finanziellen Mittel sowie die gute Zusammenarbeit. Im Besonderen bedanke ich mich für die Möglichkeiten, die mir auf dem Gut Hülsenberg bereitgestellt wurden. Auch für die sehr gute Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kramer sowie der damaligen Herdenmanagerin Frau Czaja und dem Melkpersonal möchte ich mich bedanken.

... alle Mitarbeiter des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Ich danke besonders Frau Dr. Mader für ihre Hilfe und Frau Eitinger für ihre Unterstützung nicht nur im Labor. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Vahjen für seine konstruktive Kritik und die stets aufmunternden Worte sowie den wissenschaftlichen Mitarbeitern sowie Doktoranden des Institutes für ihre Unterstützung und zahlreichen Ratschläge.

... Hannes für die Hilfe in allen Lebenslagen und den Rückhalt während des Studiums und der Promotion.

Der größte Dank gebührt meinem Vater für seine Unterstützung während meines gesamten Weges. Er hat mir jederzeit und in jeglicher Hinsicht uneingeschränkt zur Seite gestanden.

Danke!

11. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.06.2014

Annett Walpuski