

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Ätiologische Bedeutung von  
*Prototheca zopfii* Genotyp 2 bei der  
Protothekenmastitis des Rindes**

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

vorgelegt von  
**Katja Roth**  
Tierärztin aus Tett nang

Berlin 2009

Journal-Nr. 3372

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Heuwieser

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

cows, protothecosis, experimental infection, aetiology, dairy cows, algae,  
bovine mastitis, prototheca, prototheca zopfii, milk, pathogenicity,  
genotypes, histopathology, epidemiology

Tag der Promotion: 26. Mai 2010

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: 978-3-86664-798-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

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.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Diese Arbeit wurde in Teilen gefördert durch die

Deutsche  
Forschungsgemeinschaft

**DFG**



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Charakterisierung der Gattung <i>Prototheca</i> .....	3
2.1.1	Taxonomie und Phylogenie .....	3
2.1.2	Morphologie.....	5
2.1.3	Physiologie .....	7
2.1.4	Kultivierung.....	9
2.1.5	Ökologie .....	9
2.2	<i>Prototheca spec.</i> als Krankheitserreger .....	10
2.2.1	Protothekosen des Menschen .....	10
2.2.2	Protothekosen der Fleischfresser .....	11
2.2.3	Protothekosen anderer Spezies.....	12
2.3	Protothekenmastitis des Rindes .....	12
2.3.1	Ätiopathogenese.....	12
2.3.2	Klinik.....	13
2.3.3	Pathomorphologie .....	14
2.3.4	Diagnostik.....	15
2.3.5	Therapie und Bekämpfung .....	16
2.3.6	Epizootiologie .....	17
2.4	Experimentell induzierte Protothekosen.....	19
3	Tiere, Material und Methoden .....	21
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau .....	21
3.2	Tiere .....	21
3.3	Stämme .....	23
3.4	Infektion.....	23
3.4.1	Herstellung der Inokulationskulturen.....	23
3.4.2	Infektionsversuche.....	24
3.5	Probenentnahme und Probenbearbeitung .....	25
3.5.1	Blutproben .....	25
3.5.2	Kotproben.....	26
3.5.3	Milchproben .....	26
3.6	Sektion .....	28
3.6.1	Mikrobiologische Untersuchung der Gewebeproben.....	29
3.7	Histologische Untersuchungen .....	29
3.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	30
3.8.1	Plattencoating.....	30

## Inhaltsverzeichnis

---

3.8.2	ELISA-Durchführung .....	30
3.9	Realtime PCR.....	32
3.9.1	Extraktion der DNA aus den Gewebeproben .....	32
3.9.2	Primer, Sonden und Reaktionsbedingungen.....	32
3.10	Statistische Auswertung .....	34
4	Ergebnisse .....	35
4.1	Klinische Parameter.....	35
4.1.1	Euteruntersuchung .....	36
4.1.2	Milchleistung.....	40
4.2	Milchuntersuchung .....	41
4.2.1	Sensorische Veränderungen .....	41
4.2.2	California-Mastitis-Test .....	43
4.2.3	Elektrische Leitfähigkeit.....	44
4.2.4	Chloridgehalt .....	45
4.3	Blut.....	46
4.4	Mikrobiologische Untersuchungen.....	47
4.4.1	Erregerausscheidung mit der Milch.....	47
4.4.2	Erregerausscheidung mit dem Kot.....	49
4.4.3	Kultureller Nachweis in Gewebeproben .....	49
4.4.4	Genotypisierung der Reisolat mittels Realtime PCR .....	51
4.5	Patho-/Histologische Untersuchungen.....	53
4.6	ELISA.....	57
5	Diskussion .....	62
5.1	Etablierung eines Mastitis-Infektionsmodells .....	62
5.2	Klinische Betrachtung.....	64
5.3	Milchuntersuchung .....	65
5.4	Mikrobiologische Untersuchungen.....	67
5.5	Realtime PCR.....	69
5.6	Histologische Untersuchungen .....	70
5.7	ELISA.....	72
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick .....	75
6	Zusammenfassung .....	81
7	Summary .....	83
8	Literaturverzeichnis.....	84
9	Anhang .....	96
9.1	Chemikalien und Reagenzien .....	96
9.2	Rohdaten und Ergebnisse der Kontrollviertel.....	98

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Taxonomische Einordnung der Prototheken. ....	4
Tabelle 2:	Zuordnung der 3 Varianten von <i>P. zopfii</i> zu einem Genotyp beziehungsweise einer Spezies. ....	5
Tabelle 3:	Assimilationsmuster von <i>P. zopfii</i> und <i>P. blaschkeae</i> im Testsystem API50C®. ....	8
Tabelle 4:	Untersuchungs- und Probennahmeschema. ....	22
Tabelle 5:	Übersicht über die in den Infektionsversuchen eingesetzten <i>Prototheca</i> -Stämme. ....	23
Tabelle 6:	Infektionsdosis und -keim der einzelnen Tiere und Euterviertel. ....	25
Tabelle 7:	In den Infektionsversuchen untersuchte Gewebeproben. ....	28
Tabelle 8:	Gebrauchsverdünnungen der im ELISA eingesetzten Milchserumproben und der sekundären Antikörper. ....	31
Tabelle 9:	Bei der Realtime PCR eingesetzte Primer. ....	32
Tabelle 10:	Bei der Realtime PCR eingesetzte Sonden. ....	33
Tabelle 11:	Anwendungskonzentrationen der Oligonukleotide für die Realtime PCR. ....	33
Tabelle 12:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Euteruntersuchung der mit den unterschiedlichen Erregern infizierten Euterviertel. ....	39
Tabelle 13:	Nachweisraten der Erreger in den beprobten Euterabschnitten bei den unterschiedlichen mikrobiologischen Anzuchtverfahren. ....	49
Tabelle 14:	Identifikation der aus den Gewebeproben gewonnenen Erreger mittels Realtime PCR. ....	52
Tabelle 15:	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der mit Hämalaun-Eosin gefärbten Euterparenchymproben. ....	56
Tabelle 16:	Übersicht über den immunhistologischen Erregernachweis in den Gewebeproben. ....	57
Tabelle 17:	Signifikanzen der Unterschiede der elektrischen Leitfähigkeit der Milch zwischen den unterschiedlich infizierten Vierteln errechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test. ....	98
Tabelle 18:	Signifikanzen der Unterschiede der quantitativen Erregerausscheidung mit der Milch zwischen den unterschiedlich infizierten Vierteln errechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test. ....	99
Tabelle 19:	Vergleichende Darstellung der Befunde der adspektorischen Milchsekretuntersuchung der Euterviertel, die mit <i>P. zopfii</i> Genotyp 2 infiziert worden sind. ....	102

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kolonien von <i>P. zopfii</i> Genotyp 2. ....	6
Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von <i>P. zopfii</i> Genotyp 1. ....	7
Abbildung 3: Innere Körpertemperatur der Versuchstiere im Verlauf der Infektion. ....	36
Abbildung 4: Hochgradig vergrößertes Euterviertel bei Tier 3. ....	37
Abbildung 5: Hochgradig vergrößerte Euterviertel bei Tier 5. ....	37
Abbildung 6: Hochgradig vergrößerter Euterlymphknoten der rechten Euterhälfte bei Tier 2. ....	39
Abbildung 7: Milchmenge der monoinfizierten Versuchstiere im Verlauf der Infektion. ....	41
Abbildung 8: Verlauf der Befunde der sensorischen Milchuntersuchung. ....	43
Abbildung 9: Verlauf der Ergebnisse des California-Mastitis-Testes während des Versuchszeitraumes. ....	44
Abbildung 10: Elektrische Leitfähigkeit der Milch der unterschiedlich infizierten Euterviertel im Verlauf des Versuchs. ....	45
Abbildung 11: Chloridgehalt der Milch der infizierten Euterviertel während des gesamten Versuchszeitraumes. ....	46
Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der quantitativen Erregerausscheidung mit der Milch. ....	48
Abbildung 13: Quantitativer Erregernachweis in den verschiedenen Euterabschnitten. ....	50
Abbildung 14: Amplifikationskurven der drei außerhalb des Euters gefundenen Protothekenisolate mittels <i>P. zopfii</i> Genotyp 2-spezifischer Realtime PCR. ....	53
Abbildung 15: Euterparenchym eines mit <i>P. zopfii</i> Genotyp 2 und eines mit <i>P. blaschkeae</i> infizierten Viertels. ....	54
Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von <i>P. zopfii</i> Genotyp 2 in der Milz des monoinfizierten Tieres 1. ....	56
Abbildung 17: Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der gleichzeitig mit allen drei Erregern infizierten Versuchstiere. ....	58
Abbildung 18: Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere. ....	59

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 19: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der gleichzeitig mit allen drei Erregern infizierten Versuchstiere. ....	60
Abbildung 20: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere. ....	60
Abbildung 21: Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit den drei Erregern infizierten Versuchstiere. ....	100
Abbildung 22: Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere. ....	100
Abbildung 23: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit den drei Erregern infizierten Versuchstiere. ....	101
Abbildung 24: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere. ....	101

## Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
CD	cluster of differentiation
Cl	Chlorid
CMT	California-Mastitis-Test
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dRn	delta normalized reporter
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gramm/Erdbanziehungskraft
G/l	Giga pro Liter
GT	Genotyp
HE	Hämalaun-Eosin
HL	hinten links
HR	hinten rechts
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
mS	Millisiemens
MW	Mittelwert
NK	Negativkontrolle
NTC	non template control
obB	ohne besonderen Befund
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Prototheca</i>
PAS	Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (Periodic acid-Shiff stain)
PBS	phosphate buffered saline
PIM	<i>Prototheca</i> isolation medium
PK	Positivkontrolle
SAG	Stammsammlung für Algenkulturen Göttingen
sec	Sekunde
TVV	Tierversuchsvorhaben
U	Enzymaktivität
VL	vorne links
VR	vorne rechts

# 1 Einleitung

Als einer der häufigsten Erkrankungen des Milchrindes kommt der Euterentzündung (Mastitis) und deren Bekämpfung eine große Rolle zu. Treten in einem Betrieb therapieresistente Mastitiden auf, so ist dies sowohl für den Tierhalter als auch den Tierarzt Grund zur Besorgnis und ruft akuten Handlungsbedarf hervor. Die Ursachen einer therapieresistenten Mastitis sind mannigfaltig, können jedoch am Erreger selbst liegen. Neben *Nocardia spp.* und atypischen Mykobakterien führt eine Infektion mit Prototheken ebenfalls zur absoluten Therapieresistenz. Bereits im Jahre 1952 berichtete LERCHE in Berlin erstmals vom Auftreten von Prototheken in der Milch einer mastitiskranken Kuh. Seither wurden diese ungewöhnlichen Erreger weltweit aus Rindermastitiden isoliert und immer detaillierter charakterisiert.

Die Vertreter der Gattung *Prototheca* sind chlorophyllfreie, also farblose Algen, die trotz dieser morphologischen Ausprägung zu den Grünalgen gezählt werden. *Prototheca* Spezies wurden nicht nur als Krankheitserreger bei Rindern identifiziert, sondern lösen auch bei anderen Säugetieren und nicht zuletzt beim Menschen unterschiedliche Krankheitsbilder aus. Die meisten Erkrankungen werden durch die Spezies *P. wickerhamii* und *P. zopfii* ausgelöst, wobei letztere über Jahrzehnte hinweg als Erreger der Protothekenmastitis des Rindes genannt wurde. Schon 1985 wurde *P. zopfii* von BLASCHKE-HELLMESSEN unter anderem aufgrund mikromorphologischer und auxanographischer Merkmale in 3 Varianten unterteilt. Im Jahre 2006 wurde mittels molekularbiologischer Methoden auf Basis der 18S rDNA eine neue taxonomische und phylogenetische Einordnung der drei Varianten von *P. zopfii* vorgenommen, aus welcher *P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und die genetisch entferntere neue Spezies *P. blaschkeae* hervorgingen. Die Untersuchung von Isolaten aus der Milch von Kühen, welche an Protothekenmastitis erkrankt waren, deuteten schon bei der Einteilung in drei Varianten darauf hin, dass nur eine der Varianten mit Rindermastitiden assoziiert zu sein schien. Dies bestätigte sich bei der molekularbiologischen Identifizierung epidemiologisch unabhängiger Mastitisisolate durch MÖLLER et al. (2007). Diese Entwicklungen warfen verständlicherweise die Frage nach dem eigentlichen Erreger der Protothekenmastitis des Rindes auf.

So war ein Ziel dieser Arbeit, in Anlehnung an die Henle-Kochschen-Postulate und den Dreisatz von „Isolieren-Kultivieren-Verimpfen“ ein Mastitis-Infektionsmodell zu etablieren. Dieses Modell sollte es erlauben *P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae* nach Instillation in Rindereuter hinsichtlich ihrer Pathogenität vergleichen zu können. Die Infektion von insgesamt sieben Milchrindern unter definierten Bedingungen sollte weiterhin dazu dienen prä- und postmortal Blut-, Milchsekret- und Gewebeproben zu gewinnen, um ergänzende ätiopathogenetische Aufschlüsse hinsichtlich der Protothekenmastitis des Rindes zu gewinnen. So wurde nach experimenteller Infektion über einen Zeitraum von zwanzig Tagen bei jedem Tier das klinische Bild, das quantitative und qualitative Ausscheidungsverhalten der Erreger über die Milch und den Kot und ausgewählte Parameter der Milchsekret-

und Blutuntersuchung protokolliert. Die postmortal entnommenen Gewebeproben dienten der Evaluierung der Besiedlung der unterschiedlichen Organe und waren der Ausgang für eine vergleichende pathohistologischen Untersuchung.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Charakterisierung der Gattung *Prototheca*

#### 2.1.1 Taxonomie und Phylogenie

Im Jahre 1894 wurden durch KRÜGER die ersten zwei Vertreter der Gattung *Prototheca* aus dem Safffluss von Laubbäumen isoliert. Bei der Beschreibung dieser niederen Organismen ordnete er diese, wegen ihrer Chlorophylllosigkeit und heterotrophen Ernährungsweise, als mycellose Pilze ein. Bereits damals konnte man Prototheken, hauptsächlich wegen ihrer Fortpflanzungsweise, keiner bekannten Pilzgattung zuordnen. Heute steht fest, dass sie nicht zum Reich der Pilze gezählt werden können, sondern zu dem der Pflanzen. Einer der Gründe dafür ist das Vorhandensein von Plastiden. Nachdem MENKE und FRICKE (1962) in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Plastide, genauer Leukoplasten, nachweisen konnten, wurde von NADAKAVUKAREN und MCCRACKEN (1973) und JOSHI et al. (1975) das Vorhandensein von Stärkegranula, sogenannten Amyloplasten, belegt.

Schon bei der Erstbeschreibung durch Krüger wurde eine auffallende Ähnlichkeit der Prototheken mit der Grünalpengattung *Chlorella* beschrieben, ob sie jedoch von diesen abstammen wurde lange Zeit vielschichtig und kontrovers diskutiert. Die Chlorophylllosigkeit von *Prototheca spec.* im Gegensatz zu *Chlorella spec.* erklärten einige Autoren durch das Auftreten von Apochlorose (sekundärer Chlorophyllverlust) (PRINTZ 1927; PRINGSHEIM 1963). Andere wiederum vermuteten, dass es durch Mutation zum Verlust des Chlorophylls gekommen sei (ANDERSON 1944; GRANICK 1948; BUTLER 1954; CIFERRI 1956; COOKE 1968b; SUDMAN und KAPLAN 1974; SEFFNER 1987). Der Aufbau ihrer Zellwand veranlasste aus verschiedenen Gründen einige Autoren dazu, die phylogenetische Verwandtschaft der Prototheken mit den Chlorellen anzuzweifeln (TURNER und LLOYD 1966). Allerdings zeigten CONTE und PORE (1973), dass es zumindest zwischen der Spezies *Chlorella protothecoides* und verschiedenen *Prototheca spec.* sehr viel Ähnlichkeiten im Aufbau der Zellwand gibt. Mit Fortschreiten der Entwicklung molekularbiologischer Methoden bestätigte sich die Zuordnung von *Prototheca spec.* zu den Chlorophyta (WOLFF und KUCK 1990; HUSS und SOGIN 1990; TARTAR et al. 2002; UENO et al. 2003). Des Weiteren konnte bei *P. wickerhamii* ein funktionelles Plastidengenom nachgewiesen werden, welches Ähnlichkeiten zum Chloroplastengenom von *Chlorella vulgaris* aufweist (TARTAR et al. 2003; TARTAR und BOUCIAS 2004). Die Einordnung der Prototheken aus heutiger Sicht ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Taxonomische Einordnung der Prototheken.**

Überreich:	Eukaryota
Reich:	Viridiplantae
Abteilung:	Chlorophyta
Klasse:	Trebouxiophyceae
Ordnung:	Chlorellales
Familie:	Chlorellaceae
Gattung:	<i>Prototheca</i>

Anerkannte Spezies der Gattung *Prototheca* sind *P. zopfii*, *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. wickerhamii* und *P. blaschkeae*. Die Existenz von *P. moriformis* wird nach wie vor bezweifelt, da die Mehrzahl der Autoren diese Spezies aufgrund einer bestehenden Kreuzantigenität, eines fast identischen Assimilationsmusters und molekularbiologischer Untersuchungen als ein Synonym von *P. zopfii* ansieht (SUDMAN und KAPLAN 1973; PADHYE et al. 1979; PORE 1985; UENO et al. 2003; ROESLER et al. 2006). SATOH et al. (2009) isolierten erst vor kurzem aus der Haut eines Menschen eine neue Spezies und schlugen vor, diesen Erreger einer Dermatitis *Prototheca cutis* zu nennen.

Nach zahlreichen Untersuchungen an Isolaten aus der Umwelt sowie aus dem Mastitisekret von Rindern unterteilten BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) *P. zopfii* in drei Varianten. Die Differenzierung erfolgte sowohl anhand mikromorphologischer Merkmale wie Zellform, Zellgröße und Teilungsaktivität als auch auxanographisch über die Assimilation verschiedener Kohlenstoff-Quellen. Als weitere Kriterien zur Differenzierung wurde das Vorkommen in bestimmten Habitaten sowie die unterschiedliche Pathogenität der Isolate herangezogen (SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN 1983; BLASCHKE-HELLMESSEN et al. 1985a). Auch die von SCHMALRECK et al. (1998) durchgeführte Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie lieferte weitere deutliche Hinweise für das Vorkommen verschiedener Varianten innerhalb von *Prototheca zopfii*, wobei sich Variante III am deutlichsten von den anderen zwei Varianten unterschied. ROESLER et al. (2003) untersuchten als zusätzlichen biochemischen Parameter die Assimilation verschiedener Stickstoffquellen und analysierten zahlreiche Isolate von *P. zopfii* auf serologischer und genetischer Ebene. Ihre Ergebnisse führten zum Vorschlag, die drei Varianten zukünftig als Biotypen I, II und III zu bezeichnen. Neueste genetische Untersuchungen konnten die Existenz der drei Varianten von *P. zopfii* bestätigen, wobei die Varianten I und II als Genotypen von *P. zopfii* und Variante III als neue Spezies *P. blaschkeae* spec. nov. eingeordnet wurden (ROESLER et al. 2006) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Zuordnung der 3 Varianten von *P. zopfii* zu einem Genotyp beziehungsweise einer Spezies.

	Variante I	Variante II	Variante III
neue taxonomische Einordnung als:	<i>P. zopfii</i> Genotyp 1	<i>P. zopfii</i> Genotyp 2	<i>P. blaschkeae</i>
Wachstum bei 37 °C nach 4 Tagen	+	++	+
Zellform	sphärisch/zylindrisch	sphärisch/zylindrisch	sphärisch
Zellgröße der Sporangiosporen (µm)	11 - 30	5 - 15	12 - 20
Anteil der Teilungsformen (%)	15%	3,4%	nicht untersucht
Galaktoseassimilation	++	(+)	+
Glycerolassimilation	+++	+++	-
pH-Toleranz	2,4 - 9,5	2,1 - 10,5	4,0 - 10,5
NaCl-Toleranz	4%	6%	4%

### 2.1.2 Morphologie

Kolonien von *Prototheca spec.* sind von cremeweiß bis beige Farbe und weisen eine weiche, pastenartige Konsistenz auf. Die Oberfläche variiert je nach Spezies von glatt und glänzend bis körnig und matt. Aufgrund ihres hefeähnlichen Geruches, sowie der Eigenschaft, sich nach ungefähr zehn Tagen bräunlich zu verfärben kommt es bei Anzüchtung auf den gebräuchlichen Pilznährmedien häufig zu Verwechslungen mit *Candida* Spezies (KAPLAN 1977; SCHÖNBORN und SEFFNER 1977; PORE 1985).



**Abbildung 1: Kolonien von *P. zopfii* Genotyp 2.**

Mikromorphologisch sind Prototheken runde bis ovale einzellige Organismen mit einer von der Teilungsphase abhängigen Zellgröße zwischen 4 und 30  $\mu\text{m}$  (GEDEK und WEBER 1978). Die Zellwand der Algen besteht zu großen Teilen aus Cellulose (KRÜGER 1894; TURNER und LLOYD 1966). LOUPAL et al. (1992) entdeckten einen vom Entwicklungszustand abhängigen Zellwandaufbau, der bei jungen Zellen ein-, bei älteren hingegen zwei- und dreischichtig war. Als eukaryotische Zellen besitzen sie einen Zellkern mit Nucleolus, einen Golgi-Apparat, Ribosomen, meist peripher liegende Mitochondrien und ein endoplasmatisches Retikulum (WEBSTER et al. 1968; NADAKAVUKAREN und MCRACKEN 1973; PATNI und AARONSON 1974). Auch Plastide, welche Glykogen und einen stärkeähnlichen Speicherstoff enthalten, konnten nachgewiesen werden. Diese wurden als Leukoplasten oder Amyloplasten bezeichnet (MENKE und FRICKE 1962; NADAKAVUKAREN und MCRACKEN 1973). Die Vermehrung der Prototheken erfolgt vegetativ durch Bildung von Tochterzellen, auch Endosporen genannt, die sich innerhalb der Mutterzelle, dem sogenannten Sporangium, bilden (PADHYE et al. 1979). Die Anzahl der Endosporen variiert je nach Alter der Mutterzelle und Nährstoffangebot. Jede Tochterzelle hat ihre eigene Zellwand und wird durch Aufplatzen der Mutterzelle freigesetzt. Zurück bleibt eine leere Hülle, die erst nach einiger Zeit enzymatisch abgebaut wird und bei der mikroskopischen Identifizierung der Organismen eine wichtige Struktur darstellt.



Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von *P. zopfii* Genotyp 1.

Ein geringer Prozentsatz der Zellpopulation besteht aus Dauerformen, welche das Überleben unter schlechten Umweltbedingungen sichern. Diese etwas kleineren Zellen werden als Hypnozoen bezeichnet und besitzen eine äußerst dicke und widerstandsfähige Zellwand (PRINGSHEIM 1963; JOSHI et al. 1975). Wie auch bei Pilzen und Bakterien zu beobachten ist, hängen Größe und enthaltene Sporenanzahl stark von Spezies, Isolat, Nährmedium und vor allem vom Entwicklungsstadium ab (ARNOLD und AHEARN 1972; KAPLAN 1977).

### 2.1.3 Physiologie

Da es sich bei Prototheken um chlorophyllose Grünalgen handelt, können diese die für ihre Stoffwechselprozesse benötigte Energie nicht aus dem Sonnenlicht beziehen. Als chemoorganoheterotrophe Organismen nutzen Prototheken demnach organische Verbindungen als Energiequelle. Dabei werden verschiedene Zucker, Alkohole wie Propanol und Glycerol, aber auch Fettsäuren assimiliert (BARKER 1935a; BARKER 1935b; ANDERSON 1944; KESSLER 1982). Die nutzbaren Stickstoffquellen sind ebenfalls vorwiegend organischer Natur, während anorganischer Stickstoff schlecht, Nitrat und Nitrit gar nicht und Ammoniumsalze nur mäßig verwertet werden können (PRINGSHEIM 1963; CASSELTON und STACEY

1968; PORE 1972). Die Vertreter der Gattung *Prototheca* sind thiamindefizient und benötigen somit Vitamin B1 (ANDERSON 1944; ANDERSON 1945; CIFERRI 1956). ANDERSON (1944) wies nach, dass auch die Zugabe der Thiamin-Bausteine Thiazol und Pyrimidin für das Wachstum von *P. zopfii* ausreichend ist. Bemerkenswert ist weiterhin, dass auch verschiedenste Kohlenwasserstoffe assimiliert werden (HEYER 1966; KOCKOVA-KRATOCHVILOVA und HAVELKOVA 1974; WALKER und PORE 1978; UENO et al. 2002). Diese Tatsache gewinnt zunehmend an Bedeutung. So wurde mittlerweile nachgewiesen, dass sich der thermotolerante Stamm *P. zopfii* var. *hydrocarbonea*, besonders wenn er in Polyurethanschaum immobilisiert ist, gut zur Biodegradation von Erdölverunreinigungen im Wasser eignet (WALKER et al. 1975a; WALKER et al. 1975b; UENO et al. 2008). Obgleich *Prototheca spec.* zum anaeroben Metabolismus fähig sind, ist es ihnen unter diesen Bedingungen jedoch nicht möglich zu wachsen (BARKER 1935a; ANDERSON 1945). Die Umsetzung der verschiedenen Substrate unter aeroben Bedingungen kann zur Bestimmung der unterschiedlichen Spezies herangezogen werden. Auch die zwei Genotypen von *P. zopfii* unterscheiden sich, wenn auch nur marginal, in ihren Assimilationsmustern (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Assimilationsmuster von *P. zopfii* und *P. blaschkeae* im Testsystem API50C®.**

C-Quelle	<i>P. zopfii</i> Genotyp 1	<i>P. zopfii</i> Genotyp 2	<i>P. blaschkeae</i>
Glycerol (48 h)	+++	+++	-
Galaktose (24 h)	+	-	(+)
Galaktose (48 h)	++	- oder (+)	++
Galaktose (72 h)	+++	(+) oder +	++
Glukose (24 h)	++	++	+

Das Wachstum von Prototheken wird durch Tageslicht nicht gefördert (KRÜGER 1894; ANDERSON 1944) und blaues Licht hemmt sogar die assimilatorische Leistungsfähigkeit von *P. zopfii* (EPEL und KRAUSS 1966). Prototheken sind außerdem in der Lage, relativ große Mengen an Speicherstoffen anzulegen. Dabei dienen Glykogen und Fett, das in den Algen in flüssiger Form als Öl eingelagert wird, als Reservestoffe. Unter schlechten Wachstumsbedingungen sind in den Dauerformen regelrechte Öltropfen sichtbar (PRINGSHEIM 1963; JOSHI et al. 1975).

#### 2.1.4 Kultivierung

Zur Anzucht von Vertretern der Gattung *Prototheca* werden als feste Nährmedien vorwiegend die gebräuchlichen Pilznährmedien, wie zum Beispiel der Sabouraud-Glukose-Agar oder der Kimmig-Agar verwendet (FRESE und GEDEK 1968; SCHÖNBORN und SEFFNER 1977; GEDEK und WEBER 1978; SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN 1983). Da ihr Wachstum dem von Sprosspilzen sehr ähnlich ist, werden für die spezifischere Isolierung häufig Selektivnährböden verwendet. Der bekannteste unter ihnen ist der erstmals von PORE (1973) beschriebene PIM-Agar (PIM=*Prototheca* isolation medium). Durch die Zugabe von Flucytosin und Kaliumhydrogenphthalat wird selbst in stark kontaminierten Proben das Wachstum von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen weitestgehend verhindert. Als flüssige Nährmedien eignen sich Sabouraud-Bouillon und Glukose-Pepton-Lösungen. Die Bebrütung sollte aerob erfolgen, wobei das Temperaturoptimum speziesabhängig zwischen 20 °C und 37 °C liegt (BLASCHKE-HELLMESSEN et al. 1985a). Dabei konnte erst unter 4 °C und über 45 °C kein Wachstum mehr festgestellt werden (ARNOLD und AHEARN 1972).

#### 2.1.5 Ökologie

Nachdem die erstmalige Isolierung aus dem Safffluss einer Linde gelang, wurden verschiedene Protothekenspezies auch aus dem Phloem zahlreicher anderer Bäume isoliert (KRÜGER 1894; PHAFF et al. 1964; PORE et al. 1983). Da der Safffluss von Bäumen gerne durch Insekten aufgesucht wird, postulierten PORE et al. (1983) sogar, dass dadurch eine Verbreitung stattfinden könnte. Als ubiquitäre Saprophyten findet man die Erreger auch in aquatischen Habitaten, wie Flüssen und Seen, in behandeltem und unbehandeltem Abwasser, in Trinkwasser und auch Schwimmbädern (COOKE 1968a; COOKE 1968b; DE CAMARGO und FISCHMAN 1979; CASAL und SOLIS 1981; SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN 1983; PORE et al. 1986). Aus unzähligen weltweit entnommenen Bodenproben konnten sie ebenso isoliert werden (PORE et al. 1983) wie auch aus Ölschlamm (KOCKOVA-KRATOCHVILOVA und HAVELKOVA 1974; BLASCHKE-HELLMESSEN et al. 1985b). PORE et al. (1983) zeigten, dass sie auch mit verschiedenen Nahrungsmitteln wie Salat, Schweinefleischprodukten, Muscheln, Krabben und Rindfleisch assoziiert sein können. Dabei ist fraglich, ob es durch andere Faktoren wie verunreinigtes Putzwasser oder unsauberes Schlachten zur Kontamination gekommen war. Auch aus der Umgebung von landwirtschaftlichen Nutztieren gelang der Nachweis des Erregers sehr häufig, und dies mit zum Teil sehr hohen Keimgehalten (PORE et al. 1983; SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN 1983; BAUMGÄRTNER 1997). Im Jahre 1993 führten WEBER und ENDERS intensive Untersuchungen über das Vorkommen von Prototheken im Kot verschiedener Tiere durch. Sie entdeckten, dass gesunde Rinder, Pferde, Haus-

und Wildschweine mit unterschiedlicher Häufigkeit Prototheken ausscheiden und somit oft latente Träger und Ausscheider sind. Die von BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) postulierten Varianten von *P. zopfii* hingegen zeigten ein tierartsspezifisches Vorkommen. Die Varianten I und II waren gleich häufig in Rinderställen anzutreffen, wobei nur Variante II, der heutige Genotyp 2, aus Protothekenmastitiden isoliert werden konnte. Ihm wurde daraufhin eine besondere Rolle in der Ätiologie dieser Erkrankung zugesprochen (SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN 1983; BLASCHKE-HELLMESSEN et al. 1985a). Variante III, die heute neu klassifizierte Spezies *P. blaschkeae*, wurde hingegen aus der Umgebung von Schweinen isoliert.

## **2.2 *Prototheca spec.* als Krankheitserreger**

Unter der Bezeichnung „Protothekosen“ werden die bei Mensch und Tier durch *Prototheca spec.* hervorgerufenen Krankheitsbilder zusammengefasst (SONCK und KOCH 1971). Obwohl die Erreger weltweit ubiquitär vorkommen, treten Erkrankungen selten auf, wobei sich bei den Tieren vor allem Rinder und Hunde infizieren. Bisher wird angenommen, dass es lediglich durch prädisponierende Faktoren wie zum Beispiel Immunsuppression oder mechanische Schädigung von Epithelien zum Auftreten einer Protothekose kommen kann. Aus akuten wie auch chronischen Fällen wurden bisher nur *P. zopfii*, *P. wickerhamii* und sehr selten auch *P. blaschkeae* isoliert.

### **2.2.1 Protothekosen des Menschen**

Fallberichte von Protothekeninfektionen beim Mensch liegen vor allem aus Nordamerika und Asien vor, wobei diese überwiegend durch *P. wickerhamii* und sehr viel seltener durch *P. zopfii* hervorgerufen werden (LASS-FLOERL und MAYR 2007). Protothekosen können dabei lokal oder systemisch und akut oder chronisch auftreten. Chronische Verläufe sind häufiger anzutreffen und anhand der Lokalisation des Infektionsgeschehens unterteilt man die Protothekeninfektionen in folgende drei Gruppen: 1) Haut- und Unterhautprotothekosen, 2) Schleimbeutel-, Faszien- und Sehnenscheidenprotothekosen und 3) systemische Protothekosen (LEE 1989; IACOVIELLO et al. 1992; HUERRE et al. 1993; LEIMANN et al. 2004). Erkrankungen treten bei immunsupprimierten und sehr selten auch bei immunkompetenten Patienten auf, jedoch ist der Krankheitsverlauf bei ersteren schwerer und meist systemisch (PEGRAM et al. 1983; CLARK et al. 1985). Die Pathogenese der menschlichen Protothekose ist noch weitgehend unbekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Patienten sich durch Kontakt mit Infektionsquellen, wie zum Beispiel kontaminiertes Wasser und Erde oder durch traumatische Inokulation, mit der Alge infizieren (CASAL und SOLIS 1981; KUO et

al. 1987; SIRIKULCHAYANONTA et al. 1989; WIRTH et al. 1999). Je nach Krankheitsbild wird eine medikamentöse und chirurgische Behandlung vorgenommen. Von den eingesetzten Antimykotika Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol und Amphotericin B ist letzteres am wirksamsten (KANTROW und BOYD 2003). Die Mortalitätsrate liegt nach KRCMERY (2000) bei 2,2%.

### 2.2.2 Protothekosen der Fleischfresser

Seit dem ersten Fallbericht einer Protothekose beim Hund durch VAN KRUININGEN et al. (1969) wurden noch weitere 37 Fälle, vor allem aus Nordamerika, beschrieben. Unterschiede zu Erkrankungen beim Menschen bestehen einerseits in den klinischen Erscheinungsformen selbst, aber auch seitens des Erregerspektrums (THIELE 1997). Es wird vermutet, dass die Erreger in den meisten Fällen über den Dickdarm in den Organismus eindringen und sich anschließend hämatogen und/oder lymphogen systemisch ausbreiten. Zum größten Teil wurde aus den untersuchten Fällen *P. zopfii* isoliert und weitaus seltener *P. wickerhamii* (STENNER et al. 2007). Im frühen Stadium der Erkrankung werden Patienten überwiegend mit intermittierender Hämatochezie vorgestellt. Später kommen oft Blindheit, Taubheit, Krämpfe und Ataxie hinzu, denn im Zuge ihrer Dissemination zeigen die beteiligten *Prototheca spec.* eine besondere Affinität zu Geweben, die eine gute Blutversorgung aufweisen: Augen, ZNS (Zentrales Nervensystem), Knochen, Nieren und Myocard (GREENE et al. 2006). Bei Infektionen mit *P. wickerhamii* ist die Zeitspanne zwischen Infektion und Dissemination deutlich länger und der Verlauf der Erkrankung ist weniger dramatisch (HOLLINGSWORTH 2000). Nur in sehr seltenen Fällen bleibt die Infektion nach äußerlichen Verletzungen auf lokale kutane Bereiche beschränkt (MACARTNEY et al. 1988). Etablierte Behandlungsschemata gibt es aufgrund der Seltenheit der Erkrankung nicht, jedoch wird ähnlich wie bei der humanen Protothekose verfahren (PRESSLER et al. 2005). Prinzipiell ist zu sagen, dass der Behandlungserfolg stark davon abhängt wie früh die Infektion diagnostiziert wird (RIBEIRO et al. 2009), und dass die Prognose auch bei lokal begrenztem Geschehen meist infaust ist.

Bei der Katze wurde bisher nur die kutane Form der Protothekose beobachtet (KAPLAN et al. 1976; DILLBERGER et al. 1988). Pathomorphologisch handelte es sich stets um pyogranulomatöse Entzündungen, aus denen bisher immer *P. wickerhamii* isoliert wurde. Bei diesen sehr seltenen Fällen der felines Protothekose wird analog zur kutanen humanen Form meist die chirurgische Exzision der betroffenen Hautpartien mit einer antimykotischen Behandlung kombiniert (GREENE et al. 2006).

### 2.2.3 Protothekosen anderer Spezies

FRESE und GEDEK (1968) berichteten erstmals über eine Protothekose bei einem zweijährigen Rehbock. Hierbei waren die kutanen Läsionen auf den Kopf und die Beine beschränkt, wobei die dazugehörigen Lymphknoten ebenfalls phagozytierte Prototheken aufwiesen, die als *P. zopfii* angesehen wurden. SUDMAN und KAPLAN (1973) identifizierten die Erreger wenig später durch immunhistochemische Methoden als *P. wickerhamii*.

Im Jahre 1975 berichtete METTLER über den Tod eines Flughundes, bei dem als Todesursache eine generalisierte Protothekose festgestellt wurde. Anhand morphologischer Untersuchungen und anschließender Immunfluoreszenz wurde *P. wickerhamii* als ätiologisches Agens identifiziert.

Neben Erkrankungen bei den eben genannten wild lebenden Säugetieren kommen auch bei Reptilien und Fischen Infektionen mit *Prototheca spec.* vor. GENTLES und BOND (1977) beschrieben eine Infektion bei atlantischen Lachsen, die mehrere Organe erfasste. Diese, über einige Jahre hinweg stattfindenden Ausbrüche in einer Lachsfarm, schrieben sie einer neuen Spezies *Prototheca salmonis* zu.

Auch aus der entzündeten Schwimmblase eines Karpfens konnten Prototheken isoliert werden. LOUPAL et al. (1992) war es jedoch nicht möglich, eine genauere taxonomische Einordnung des Erregers vorzunehmen.

Erst vor kurzem wurde bei einer weiteren Nutztierspezies der erste Fall einer Protothekose beschrieben: Eine Ziege erkrankte an einer nekrotisierenden, pyogranulomatösen Dermatitis im Kopfbereich (MACEDO et al. 2008). Nachdem sich die Erkrankung klinisch mit Dyspnoe, Stertor und Kachexie äußerte, wurde das Tier euthanasiert. Als Erreger wurde in diesem Fall *P. wickerhamii* identifiziert.

## 2.3 Protothekenmastitis des Rindes

### 2.3.1 Ätiopathogenese

Als Erreger der Protothekenmastitis des Rindes wird heute allgemein *P. zopfii* genannt. Bereits BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) unterteilten diese Spezies aufgrund ihrer biochemischen und serologischen Eigenschaften in drei Biotypen. Die von BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) und von BAUMGÄRTNER (1997) untersuchten Mastitisisolate waren dabei fast ausschließlich dem Biotyp II zuzuordnen. Jüngere molekularbiologische Untersuchungen an Mastitisisolaten, sowohl aus Deutschland wie auch aus Japan, zeigten ebenfalls, dass lediglich der frühere Biotyp zwei, nun Genotyp 2 von *P. zopfii*, mit der bovinen Protothekenmastitis assoziiert zu sein scheint (MÖLLER et al. 2007; OSUMI et al. 2008). Inzwischen wurden sehr vereinzelt sowohl in Portugal (MARQUES et al. 2008) als auch in Deutschland (ROESLER 2008) Mastitisisolate als *P. blaschkeae* identifiziert.

Die Infektion mit *P. zopfi* erfolgt in der Regel über den Strichkanal, wobei Zitzenverletzungen ebenfalls als Eintrittspforte für die Erreger angesehen werden. Die Ausbreitung im Euter geschieht von dort aus galaktogen-aszendierend, wobei stark sezernierende Alveolen offensichtlich günstige Vermehrungsbedingungen bieten, da sich die meisten Krankheitsfälle bei frischlaktierenden Kühen zeigen (LERCHE 1952; FRANK et al. 1969; SCHÖNBORN und SEFFNER 1977). Auch aus dem Kot von Rindern konnten regelmäßig Prototheken isoliert werden. Dies führte zur Hypothese, dass es möglicherweise auch durch hämatogene oder lymphogene Ausbreitung zur Besiedlung des Euters kommen könnte (WILHELM et al. 1992). Mit Vermehrung der Erreger in den Alveolarlumina des Euters geht eine Alveolarepithelschädigung und -degeneration und ein anschließender Übertritt der Prototheken in das Euterparenchym einher. Noch immer ist nicht bekannt, wie es zum Untergang der Alveolarepithelzellen kommt. SEFFNER (1994) jedoch vermutet, dass diese Vorgänge auf einer Toxinwirkung beruhen. Eine wichtige Beobachtung hinsichtlich der Erregerausbreitung ist auch die Tatsache, dass bereits mehrfach *P. zopfi* in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gefunden wurden. Die Organismen werden dabei vorrangig in Makrophagen angetroffen, sind aber intakt und vermehren sich scheinbar im phagozytierten Zustand (CHEVILLE et al. 1984; JENSEN et al. 1998). Dies scheint einer der Hauptgründe für die Chronizität der Erkrankung zu sein, denn durch Granulom- und Abszessbildung versucht der Körper zwar die Erreger vom gesunden Eutergewebe abzugrenzen, diese bleiben jedoch vermehrungsfähig und können somit zu einer intermittierenden Ausscheidung über die Milch führen. Alveolarepitheluntergang und die Zubildung von Bindegewebe in den betroffenen Euterabschnitten sind irreversibel und führen so zu einem ständigen Rückgang der Milchleistung.

### 2.3.2 Klinik

Die Protothekenmastitis des Rindes beginnt als akute bis subakute Entzündung der Milchdrüse und geht später in der Regel in ein chronisches Stadium über. Neben der Ausprägung einer klinischen Mastitis werden aber auch klinisch inapparent infizierte Tiere und intermittierende Erregerausscheider beobachtet (SCHICK und KUTZER 1982). Bei der klinisch apparenten Mastitis finden sich sowohl sicht- als auch tastbare Veränderungen: Die betroffenen Viertel zeigen auch nach dem Ausmelken ein pralles, mitunter ballonartiges Aussehen und sind von sehr derber Konsistenz. Störungen des Allgemeinbefindens treten nur vereinzelt auf und trotz der eindrücklichen Veränderungen am Euterparenchym sind die wenigsten Tiere dort schmerzempfindlich. Auch weitere Kardinalsymptome einer Entzündung, wie Rötung und Ödembildung fehlen gewöhnlich (SCHÖNBORN und SEFFNER 1977; SEFFNER 1994; COSTA et al. 1996). Die Milchleistung sinkt in kürzester Zeit oder kommt ganz zum Erliegen, wobei der Milchzellgehalt mäßig bis stark ansteigt. Im späteren Verlauf stellen sich auch Veränderungen des Milchsekrets ein. Diese reichen von einer schleimigen Beschaffenheit des Sekrets bis zum Auftreten von

weißen, quarkähnlichen Ausfällungen (GEDEK und WEBER 1978; GRUNERT et al. 1996). Die Erkrankung beginnt meist in einem Viertel, breitet sich dann aber oft auf das gesamte Euter aus. Im chronischen Stadium kommt es zur Atresie der betroffenen Viertel und bei Palpation sind klein- bis großknotige Veränderungen zu tasten. In der Mehrzahl aller Fälle kommt es zum vollständigen Funktionsverlust des Drüsenepithels, gefolgt vom vollständigen Sistieren der Milchproduktion (SCHÖNBORN und SEFFNER 1977; JENSEN et al. 1998).

### 2.3.3 Pathomorphologie

Bei der Sektion eines mit *P. zoppii* infizierten Euterviertels fallen lediglich im Bereich des Drüsengewebes pathologische Abweichungen auf. Die Schnittfläche stellt sich in diesem Bereich graubraun verfärbt dar und ist mitunter von fein- oder grobhöckriger Beschaffenheit (SEFFNER 1994). Pathohistologisch handelt es sich bei der Protothekenmastitis des Rindes um eine pyogranulomatöse Entzündung, die beinahe ausschließlich im Alveolarbereich lokalisiert ist, und die im Verlauf der Erkrankung an Stärke und Ausbreitung zunimmt (MCDONALD et al. 1984b). In der frühen Phase der Entzündung sind intraalveolär unzählige Prototheken in unterschiedlichen Vermehrungsstadien vorhanden. Diese liegen nicht nur frei im Alveolarlumen vor, sondern auch phagozytiert in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (TUZUKI 1987). JENSEN et al. (1998) beobachteten, dass die durch Makrophagen phagozytierten Prototheken zum Teil noch in einem vermehrungsfähigen Stadium waren. Dieses Phänomen könnte zumindest teilweise für die Chronizität der Erkrankung verantwortlich sein. Später kommt es zur ballonierenden Degeneration und Hyperplasie der Alveolarepithelzellen, die Basallamina wird zusehends zerstört (FURUOKA et al. 1989). Von diesen Schädigungen sind nicht alle Alveolen eines Drüsenläppchens in gleichem Maße betroffen, manche Drüsenläppchen scheinen als Ganzes unverändert (HODGES et al. 1985; JENSEN et al. 1998). Im chronischen Stadium kommt es zur vermehrten Immigration verschiedener Zellpopulationen in das interalveoläre Gewebe und zur Proliferation von Bindegewebe (SCHÖNBORN und SEFFNER 1977). Durch Granulombildung wird versucht, die offensichtlich schwer verdaulichen Erreger zu demarkieren, wobei die sich dabei entwickelnden Granulome keinem bestimmten Granulomtyp zugeordnet werden können. Es kommen Histiozyten, Epitheloidzellen und Riesenzellen vom Langhanstyp, aber auch Lymphozyten und Plasmazellen in typisch konzentrischer Schichtung vor (JENSEN et al. 1998). Die oft in einer betroffenen Herde auftretenden intermittierenden Ausscheider lassen vermuten, dass es sich um infektiöse Granulome handelt, in denen die Prototheken eine lange Zeit persistieren können.

### 2.3.4 Diagnostik

Die Diagnostik der Protothekenmastitis erfolgt routinemäßig durch den kulturellen Erregernachweis aus der Milch oder durch einen gefärbten Milchsedimentausstrich (SCHICK und KUTZER 1982). Beim kulturellen Nachweis wird ein Teil einer Milchprobe auf ein festes Nährmedium ausgestrichen und inkubiert. Prototheken können auf unterschiedlichen Agar-Nährmedien wie zum Beispiel auf dem MacConkey-, dem Kimmig-, dem Bierwürze-, dem Kartoffel-Dextrose- und auch auf Blut-Agar wachsen. Allerdings wird für optimales Wachstum Sabouraud-Glukose-Agar eingesetzt (AALBAEK et al. 1998). Zur Unterdrückung bakterieller Begleitflora können diese mit einem Antibiotikum, meist findet Chloramphenicol Einsatz, versetzt werden. Da bei stark kontaminierten Proben *Prototheca spec.* leicht durch Bakterien und Pilze überwachsen werden können, wurde von PORE (1973) ein für alle Spezies sehr gut funktionierendes Selektivmedium entwickelt. Aufgrund der Ähnlichkeit mit Hefen erfolgt nach der kulturmorphologischen Beurteilung die mikroskopische Betrachtung der Kolonien. Alternativ zum kulturellen Nachweis kann, wie bereits erwähnt, auch ein Milchsedimentausstrich angefertigt werden. Die Ausstrichpräparate sowohl der Kolonien als auch des Milchsediments können unterschiedlich gefärbt werden. Am häufigsten findet Lactophenol-Baumwollblau Anwendung, aber auch die Methylenblau-, Methenamin-Silbernitrat-, PAS-, Giemsa-, Gridley- und die Gram-Färbung eignen sich (BERKHOF et al. 1982; SEFFNER 1994). DEUTZ und KUTTIN (1990) entwickelten den für Pilze und Algen gleichermaßen geeigneten Fluoreszenz-Farbstoff Fungiquel®. Dieser Farbstoff hat sich jedoch ebenso wie der von PAL et al. (1990) entwickelte Farbstoff „PHOL“ in der Routinediagnostik nicht durchgesetzt. Inzwischen stehen zur schnellen Differenzierung der *Prototheca*-Spezies auch kommerziell erhältliche Testkits zur Verfügung. Dabei handelt es sich um die Identifikationssysteme API 20C® und 50C® und Rapid Yeast Plus®, die es aufgrund unterschiedlicher Assimilationsmuster erlauben *P. zopfii*, *P. wickerhamii* und *P. stagnora* zu unterscheiden und ebenso *Candida*-Spezies abzugrenzen (PADHYE et al. 1979; AALBAEK et al. 1998). Das Rapid Yeast Plus®-System erkennt *Prototheca* als Gattung dabei schnell und spezifisch, zeigt aber hinsichtlich der Speziesunterscheidung große Schwächen (ESPINEL-INGROFF et al. 1998). Da aus Protothekenmastitiden meist der Genotyp 2 von *P. zopfii* isoliert wurde, erachteten ROESLER et al. (2003) es für notwendig, die damaligen Biotypen I, II und III von *P. zopfii* ebenfalls biochemisch differenzieren zu können. Dafür etablierten sie eine Methode mittels des Identifikationssystems BBL Crystal™ (Beckton-Dickinson, Sparks, USA) unter Nutzung von 50 Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Bei serologischen Untersuchungen an vier erkrankten Kühen wies DION (1982) erstmals spezifische Antikörper gegen Prototheken sowohl im Blut- als auch im Milchserum nach. Dieser Nachweis gelang mittels Immundiffusionstest, welcher sich jedoch für die Routinediagnostik auf Grund des hohen zeitlichen Aufwands als ungeeignet erwies. BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1987) fanden als Ergänzung zur kulturellen Untersuchung von Einzelgemelken ein serodiagnostisches Verfahren

zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Antigen von *P. zopffii*. Mittels Gegenstromelektrophorese konnte so die Diagnostik klinischer und subklinischer Protothekenmastitiden präzisiert werden. Schon damals befanden die Autoren, dass es „in weiterführenden Untersuchungen zu prüfen wäre, ob durch den Einsatz empfindlicherer Testmethoden eine Erhöhung der Sensitivität des Antikörpernachweises zu erreichen ist“. Von JENSEN et al. (1998) wurde daraufhin ein indirekter ELISA entwickelt, durch den es aber ebenfalls nicht möglich war erkrankte und nicht erkrankte Tiere sicher zu unterscheiden. Erst ROESLER et al. (2001) gelang es, durch die Entwicklung eines ELISA zur Identifizierung klinisch und subklinisch erkrankter Tiere, eine serologische Diagnostik der Protothekenmastitis zu etablieren. Sie demonstrierten, dass akut infizierte Tiere den höchsten Immunglobulin (Ig)G-Spiegel im Blut, sowie die höchsten IgA- und IgG1-Spiegel in der Milch aufweisen. Zwar zeigen chronisch erkrankte Kühe keinen signifikant anderen Gehalt an spezifischen Antikörpern im Blut und im Milchserum gegenüber akut infizierten Tieren, wohl aber gegenüber nicht infizierten Tieren. Somit war es erstmals möglich, beispielsweise bei Bestandssanierungen auf Herdenebene, mit einem serologischen Screening infizierte Kühe sicher zu erkennen.

### 2.3.5 Therapie und Bekämpfung

Trotz unzähliger Versuche eine geeignete Therapie gegen die Protothekenmastitis des Rindes zu finden, erweist sich diese bis dato als therapieresistent. Es wurden bisher mehrheitlich *In-vitro*-, aber auch einige *In-vivo*-Untersuchungen zur Empfindlichkeit von *Prototheca spec.* gegenüber unterschiedlicher Antibiotika, Antimykotika und Antiparasitika durchgeführt. Bezüglich der Gruppe der Antibiotika zeigte sich *P. zopffii in-vitro* am empfindlichsten gegenüber Vertreter der Aminoglykoside und der Polypeptidantibiotika. Gentamicin hemmt in ausreichend hoher Konzentration ungefähr 40% der klinischen Isolate von *P. zopffii* und ist somit der effektivste Wirkstoff der Gruppe der Aminoglykoside. In der Gruppe der Polypeptidantibiotika ist dies Polymixin B (MCDONALD et al. 1984a; SHAHAN und PORE 1991; GRUNERT et al. 1996). Unter den Antimykotika erwiesen sich Amphotericin B und Nystatin als Polyenantibiotika und einige Azole als wirksam (LAMPEN und ARNOW 1961; SEGAL et al. 1976; MARQUES et al. 2006). Bei den Therapieversuchen mehrerer Autoren an natürlich und experimentell infizierten Tieren konnten zwar verschiedene positive Effekte beobachtet werden, aber es kam bei keinem Tier zu einer vollständigen Heilung. So führten bei einem experimentell infizierten Milchrind intrazisternale Applikationen von Tetra- und Levamisolhydrochlorid-Präparaten zu einer Senkung der Ausscheidungsrate der Erreger über die Milch und bewirkten eine Verbesserung der klinischen Symptome (BERGMANN 1993a; BERGMANN 1993b). Auch bei COSTA et al. (1996) führte die Behandlung natürlich erkrankte Tiere mit Thiomersal und Cephalosporinen zum völligen Sistieren der Algenausscheidung und eine Behandlung mit Nystatin und Dimethylsulfoxid zum Abklingen der klinischen Mastitisanzeichen, aber eine

funktionelle Wiederherstellung des Eutergewebes war nicht herbeizuführen. Einerseits scheinen die *in-vitro* recht gut wirksamen Stoffe *in-vivo* wegen der bereits vorhandenen Parenchymschäden nicht richtig wirken zu können, andererseits müssten vieler der Stoffe so hoch dosiert werden, dass sie selbst zu massiven Gewebeschädigungen im Euter führen würden. Weiterhin kann wegen der pathomorphologischen Veränderungen am Euter und der Tatsache, dass sich die Prototheken auch in den körpereigenen Zellen befinden davon ausgegangen werden, dass es schwierig ist, ausreichend hohe Wirkstoffkonzentrationen am Wirkort herbeizuführen, und dass die dabei zu verwendenden großen Applikationsvolumina einen Therapieversuch unwirtschaftlich machen (GEDEK und WEBER 1978; DE VARGAS et al. 1998). Somit bleiben als Bekämpfungsmaßnahmen in einem betroffenen Betrieb lediglich hygienische Maßnahmen und schnellstmögliche Identifizierung und Merzung der infizierten Tiere. Es wurde auch schon versucht, infizierte Tiere lediglich abzusondern und diese Gruppe wegen der Übertragung der Erreger über das Melkgeschirr nach der gesunden Gruppe zu melken, allerdings gelangten die Autoren letztendlich ebenfalls zur Auffassung, dass es besser sei die betroffenen Tiere der wirtschaftlichen Verwertung zuzuführen (RÖSLER und HENSEL 2003). Die zu ergreifenden allgemeinen hygienischen Maßnahmen betreffen einerseits die ordnungsgemäße Reinigung und Desinfektion des Melkgeschirrs und der Umgebung sowie die Beseitigung von möglichen Erregerreservoirien wie beispielsweise dauerhaft feuchte, schlecht drainierte Stellen und andererseits Maßnahmen am Tier selbst. Als algizide Desinfektionsmittel für die Behandlung des Melkgeschirrs sowie des Melk- und Haltungsbereiches haben sich quaternäre Ammoniumverbindungen für geeignet erwiesen. Am Tier selbst gilt das Zitzentauchen mit jodhaltigen (SCHUSTER und SCHUSTER 1982; SCHICK und KUTZER 1982; SEFFNER 1987) oder natriumhypochlorithaltigen (SALERNO et al. 2009) Präparaten als beste Prophylaxe. Andere Resistenzstudien beschäftigen sich mit der Wirksamkeit weniger bekannter Wirkstoffe: TORTORANO et al. (2008) untersuchten zwanzig klinische Protothekenisolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber zwei ätherischen Ölen. Allerdings zeigte sich *P. zopfii* als wenig empfindlich gegenüber Bergamotte- und Teebaumöl. Erfolg versprechendere Ergebnisse lieferten LEE et al. (2004). Sie entdeckten, dass sämtliche, der von ihnen verwendeten *P. zopfii*-Isolate hochempfindlich gegenüber Laktoferrin waren. Trotz dieser Neuerungen bleibt die Protothekenmastitis des Rindes eine der am schwierigsten zu behandelnden Mastitiden (KIRK 1991).

### 2.3.6 Epizootiologie

Wie bei den meisten anderen Infektionen, die durch Pilze oder Hefen hervorgerufen werden, wird bisher angenommen, dass es sich auch bei der Protothekenmastitis des Rindes um eine Faktorenkrankheit handelt. Die Tatsache, dass der Erreger zwar in der Umwelt weit verbreitet ist, aber als Mastitiserreger eine untergeordnete

Rolle spielt, stützt diese Annahme (BAUMGÄRTNER 1997). Beispielsweise machte *P. zopfi* im Jahre 1996 am Gesamtspektrum der nachgewiesenen Mastitiserreger in West-Brandenburg lediglich 1,3% und auf Landesebene in Dänemark 0,05% aus (AALBAEK et al. 1998; TENHAGEN et al. 1999). Innerhalb einer Herde gibt es manchmal nur sporadische Erkrankungen, teilweise breitet sich das Geschehen aber auch rasch aus und wird endemisch (WILHELM et al. 1992). Endemische Fälle wurden bisher vorwiegend aus Großbetrieben mit Managementproblemen und aus Ländern mit subtropischem Klima berichtet, wobei in einem Bestand in Brasilien bis zu 87% der Tiere infiziert waren (SEFFNER 1994; COSTA et al. 1996; SCHLENSTEDT et al. 1997). Der Verseuchungsgrad der Umgebung korreliert oftmals mit dem der Herde, und so spielt das Vorhandensein eines erregerefreundlichen Milieus eine große Rolle (JANOSI et al. 2001). Die Verbreitung erfolgt zum Teil durch die Tiere selbst, denn nach oraler Aufnahme über Tränkwasser oder Futter passieren Prototheken unbeeinflusst den Magen-Darm-Trakt und werden über den Kot wieder ausgeschieden (SCHUSTER und BLASCHKE-HELLMESSEN 1983; ENDERS und WEBER 1993a). JANOSI et al. (2001) postulieren gar, dass Kälber, welche Prototheken-Milch über die Mutter aufgenommen haben am meisten zur Verbreitung beitragen. Allerdings dürfte dieser Übertragungsweg angesichts der heutigen Haltungsformen nur noch einen geringen epizootologischen Einfluss haben. Die Tenazität von *P. zopfi* und *P. wickerhamii* ist gegenüber der meisten äußeren Einflüssen als relativ hoch einzuschätzen. Sie tolerieren pH-Werte zwischen 2,1 und 10,9, weisen eine hohe NaCl-Toleranz sowohl in festen als auch flüssigen Nährmedien auf und sind durch Bildung von Hypnozoosporen gegenüber Austrocknung recht resistent (PRINZ 1988). In feuchtem, substratreichem Milieu finden sie jedoch optimale Wachstumsbedingungen vor und werden demnach vermehrt in der Nähe von Tränkebecken und in sich zersetzenden Futterresten gefunden (BAUMGÄRTNER 1997). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung beschreiben JANOSI et al. (2001) ein gehäuftes Auftreten von Protothekenmastitiden in Beständen mit Weidegang. Die Übertragung von Tier zu Tier erfolgt über kontaminiertes Melkzeug. So dürfte daher für das Angehen der Infektion bei einem Individuum die Menge der in der Umwelt vorhandenen Erreger sowie die hygienischen Verhältnisse und Melkbedingungen eine Rolle spielen (SEFFNER 1987; ANDERSON und WALKER 1988). Die Mehrheit der Autoren geht davon aus, dass für die Ansiedlung und Ausbreitung der Prototheken noch verschiedene andere prädisponierende Faktoren von Bedeutung sind. Mechanische Schädigungen des Euters und der Zitzen durch unsachgemäßes Melken und vorausgegangene Antibiotikabehandlungen werden hier genannt (SCHICK und KUTZER 1982; HODGES et al. 1985). Weiterhin werden vermehrt Infektionen bei vorangegangener Verabreichung von Antibiotika und Anwesenheit anderer mastitisassoziierter Keime im Euter beobachtet (SCHLENSTEDT et al. 1997). Ein Synergismus von euterpathogenen Bakterien und *P. zopfi* ist noch nicht bewiesen, wird aber von vielen Seiten vermutet (SEFFNER 1987; JANOSI et al. 2001). Von einer Protothekenmastitis bei einer Färse wurde bisher noch nie berichtet. Frühlaktierende Rinder scheinen hingegen besonders oft betroffen zu sein (SPALTON 1985; COSTA et al. 1996). Ob die Anzahl der Kalbungen das Auftreten

der Infektion beeinflusst wird ebenfalls noch kontrovers diskutiert. FRANK et al. (1969) und WILHELM et al. (1992) beschreiben eine höhere Prädisposition für junge Tiere, wohingegen TENHAGEN et al. (1999) behaupten, dass die Wahrscheinlichkeit, an einer Protothekenmastitis zu erkranken wächst, je öfter die Kuh laktiert. Prädisponierend und für den Verlauf der Erkrankung entscheidend, so sind sich WILHELM et al. (1992) und TANIYAMA et al. (1994) sicher, ist die Vorbehandlung mit immunsuppressiven Therapeutika wie beispielsweise mit Corticosteroiden. Trotz einiger weniger Autoren wie GEDEK und WEBER (1978), die postulieren, dass bei der Ansiedlung und Ausbreitung von Prototheken im Euter prädisponierende Faktoren keine Rolle spielen, gelten Prototheken letztlich noch immer als opportunistische Erreger, die erst bei Vorliegen prädisponierender Faktoren eine pathogene Wirkung entfalten (WEBER und ENDERS 1993).

### 2.4 Experimentell induzierte Protothekosen

Es wurden bisher zahlreiche Infektionsversuche mit verschiedenen *Prototheca spec.* an unterschiedlichen Säugetieren und mit unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt. Im Rahmen ihrer umfangreichen Studien an *P. ciferrii*, welches inzwischen als Synonym zu *P. zopfii* identifiziert wurde, untersuchten NEGRONI und BLAISTEN (1941) auch die Pathogenität der vermeintlich neuen Protothekenspezies indem sie sie intravenös, intratestikulär, intraperitoneal und subkutan mehreren Kaninchen und Meerschweinchen applizierten. LERCHE (1952) isolierte erstmals „ovale oder längsovale, meist runde, lichtbrechende, doppelt konturierte Gebilde“ aus einem an Mastitis erkrankten Milchrind und stellte fest, dass es sich hierbei um einen Vertreter der Gattung *Prototheca* handeln musste. Um entscheiden zu können, ob es sich wirklich um pathogene Organismen handelte oder nur um einen Zufallsbefund führte auch er Infektionsversuche an verschiedenen Säugetieren, unter anderem an zwei Rindern, durch. Auch aus Fällen von menschlichen Protothekosen wurden die gewonnenen Isolate in Pathogenitätsstudien an Labortieren untersucht (DAVIES et al. 1964; KLINTWORTH et al. 1968). Um das pathogene Potenzial verschiedener Protothekaspezies untereinander und auch gegenüber der Gruppe der Hefen abzugrenzen wurden Rinder und verschiedener Nager infiziert, beobachtet und histologisch und pathologisch untersucht (SCHIEFER und GEDEK 1968; JENSEN und AALBAEK 1994). Von DION (1982) und von MCDONALD et al. (1984b) wurden je ein bis zwei Milchrinder mit klinischen *Prototheca*-Isolaten intrazisternal infiziert und über mehrere Wochen hinweg beobachtet, um den Verlauf der Mastitis und den Effekt der Erreger auf verschiedene klinische Parameter, und nicht zuletzt auf das Eutergewebe selbst zu untersuchen. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse waren von großer Bedeutung für erfolgreiche Bestandssanierungen. Mehrmals wurden auch Kühe infiziert um potenzielle Therapieschemata zu erproben (FRANK et al. 1969; BERGMANN 1993b). Die Reaktionen auf die einzelnen experimentellen Infektionen fielen, obwohl sie zum Teil in ähnlicher Weise durchgeführt worden

waren, sehr unterschiedlich aus, und so setzten es sich DE CAMARGO et al. (1980) zum Ziel herauszufinden, welchen Einfluss die Inokulationsstellen bei *P. zopfii*, *P. wickerhamii* und *P. stagnora* auf Hasen, Mäuse, Ratten und Meerschweinchen haben. WILHELM et al. (1992) führten vergleichende Versuche mit den drei unterschiedlichen Varianten von *P. zopfii* an Meerschweinchen durch und zeigten, dass alle von ihnen verwendeten Prototheken nach oraler Applikation ohne ihre Eigenschaften verändert oder sich vermehrt zu haben wieder mit dem Kot ausgeschieden wurden. Sie wiesen außerdem nach, dass es nur durch Gabe von hohen Mengen an Immunsuppressiva zu einer Dissemination der Erreger kam. Ähnliche Beobachtungen machten auch JENSEN und AALBAEK (1994) und demnach werden die Vertreter der Gattung *Prototheca* als mikrobielle Opportunisten und ihre Virulenz als gering ausgeprägt eingeschätzt (SCHÖNBORN und SEFFNER 1977; HORIUCHI et al. 1991). Die wenigen experimentell infizierten Rinder entwickelten, bis auf eine Ausnahme, alle eine für den Erreger typische klinische Mastitis. Die anschließenden histologischen Untersuchungen zeigten im Gegensatz zu den meisten Gewebeschnitten der experimentell infizierten Nager deutliche pathologische Abweichungen. Diese Tatsache erklärt METTLER (1983) damit, dass die, bei den Infektionen verwendeten Isolate, ausnahmslos aus klinischen Mastitiden stammen und somit vielleicht nur krank machen würden, weil sie an die Umgebung „Euter“ adaptiert sind.

Vergleichende experimentelle Infektionen von Kühen mit *P. blaschkeae* und den verschiedenen Genotypen von *P. zopfii* erfolgten jedoch noch nicht.

## **3 Tiere, Material und Methoden**

### **3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau**

Um die Virulenzunterschiede von *P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae*, dem früheren Biotyp 3 von *P. zopfii*, und deren Bedeutung bei der Protothekenmastitis des Rindes zu untersuchen wurde ein Modell zur experimentellen Infektion von Milchrindern entwickelt. Zunächst wurde bei einem Tier durch intramammäre Applikation unterschiedlicher Protothekenkeimzahlen ein Dosisfindungsversuch durchgeführt. Die hierbei ermittelte Dosis von  $1 \times 10^6$  KbE wurde daraufhin bei allen Tieren eingesetzt. Dabei wurde ein Teil der Tiere mit allen drei Erregern gleichzeitig infiziert um interindividuelle Schwankungen zu vermeiden. Da sich bei diesem Schema der Infektion, welches im weiteren als „Mischinfektion“ bezeichnet werden wird, die systemischen Effekte, wie beispielsweise die Immunantwort, der einzelnen Erreger überlagern, wurde außerdem jeweils ein Tier mit nur einem der drei Erreger infiziert.

Im Anschluss an die experimentelle Infektion wurden die Tiere über einen Zeitraum von drei Wochen gemäß Tabelle 4 untersucht und beprobt. Am Versuchsende wurden die Rinder euthanasiert, sezirt und die gewonnenen Organproben histopathologisch und mikrobiologisch ausgewertet.

### **3.2 Tiere**

Insgesamt wurden sieben Milchrinder der Rasse Holstein-Friesian infiziert, die aus drei verschiedenen Betrieben stammten. In keinem der Betriebe waren zuvor jemals Prototheken nachgewiesen worden. Die ausgewählten Tiere waren zwischen drei und viereinhalb Jahre alt und befanden sich in der ersten oder zweiten Laktation. Die Anzahl der Melktage schwankte zwischen 368 und 649, wobei die Tagesmilchleistung zu Beginn der Studie bei keinem Tier unter 20 Litern lag.

Tabelle 4: Untersuchungs- und Probennahmeschema.

Versuchstag	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Einstellung	X																						
klinische Untersuchung	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Milchprobe			X*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Milchmenge	X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Blutprobe			X*	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X		X			X
Kotprobe			X*	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X			X		X			X

\* = Probennahme vor Infektion

### 3.3 Stämme

Die bei den experimentellen Infektionen verwendeten Protothekenstämme sind in der folgenden Tabelle 5 dargestellt. Unter den dort aufgeführten Nummern sind die drei Stämme in der Sammlung von Algenkulturen des Instituts für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen (SAG) hinterlegt. Bei den verwendeten Stämmen handelt es sich jeweils um die Typstämme von *P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae* (ROESLER et al. 2006).

**Tabelle 5: Übersicht über die in den Infektionsversuchen eingesetzten *Prototheca*-Stämme.**

Bezeichnung	Quelle	Herkunft
<i>P. zopfii</i> Genotyp 1 (SAG 2063)	Rinderfäzes	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 33a)
<i>P. zopfii</i> Genotyp 2 (SAG 2021)	Rindermastitis	Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
<i>P. blaschkeae</i> (SAG 2064)	Humane Onychomykose	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der TU Dresden (Stamm-Nummer: 106)

### 3.4 Infektion

#### 3.4.1 Herstellung der Inokulationskulturen

Für die Herstellung der Inokulationskultur wurde jeder Keim zunächst für 48 Stunden bei 37 °C auf Sabouraud 4%-Glucose-Agar (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) angezüchtet. Anschließend wurde eine Reinkultur des Erregers in 200 ml vorgewärmte Sabouraud 2%-Glucose-Bouillon (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) verbracht und für weitere 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für optimales Wachstum wurden die Flüssigkulturen 4-6 mal pro Tag geschwenkt. Um den Titer der Algensuspension zu ermitteln wurde anschließend eine Verdünnungsreihe hergestellt, auf Sabouraud 4%-Glucose-Agar ausgespatelt und für 36 Stunden bei 37 °C kultiviert. Die restliche Algensuspension wurde während dieser 36 Stunden bei 4 °C gelagert. Eine mögliche Vermehrung oder ein Absterben der Prototheken bei 4 °C war vorher untersucht und nicht beobachtet worden. Nach Berechnung der Konzentration der

Protothekensuspension wurde durch Verdünnung mit PBS (siehe Anhang Kapitel 9.1) eine Gesamtkeimzahl von  $1 \times 10^6$  KbE in 50 ml eingestellt.

### 3.4.2 Infektionsversuche

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Regierungspräsidium Leipzig, Braustraße 2, 04107 Leipzig genehmigten Versuchsvorhabens (TVV 22/06, erteilt am 09.01.2007) durchgeführt.

Nachdem die Versuchstiere in den Herkunftsbetrieben klinisch und mikrobiologisch bezüglich ihrer Eutergesundheit untersucht worden waren, wurden diese entweder einzeln oder zu zweit in den Stall der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig verbracht. Wie im ursprünglichen Betrieb, wurden die Kühe zweimal pro Tag gemolken, hatten ständig Zugang zu Trinkwasser und wurden mit Heu, Grassilage und Kraftfutter gefüttert. Die Einstreu im Versuchsstall bestand aus Stroh.

Die Infektion der Versuchskühe fand stets nach dem Nachmittagsmelken statt. Zunächst wurden die Tiere klinisch untersucht und gemäß Tabelle 4 beprobt. Anschließend wurde das Euter sorgsam gereinigt und die Inokulationskulturen über eine Zitzenkanüle in die entsprechende Zitzenzisterne verbracht.

Das erste Rind diente, wie bereits erwähnt, der Dosisfindung. Hierbei wurden alle Euterviertel mit *P. zopfii* Genotyp 2 infiziert, jedoch mit unterschiedlicher Protothekenkeimzahl. In je ein Viertel wurden  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^8$  KbE instilliert. Aufgrund der klinischen, bakteriologischen und histopathologischen Ergebnisse dieses Tieres wurden für den Rest des Versuchs  $1 \times 10^6$  KbE als Infektionsdosis verwendet.

Anschließend wurden drei Tiere in je einem Viertel mit *P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und mit *P. blaschkeae* infiziert, wobei das vierte Euterviertel als Kontrollviertel diente. Die genaue Belegung mit den einzelnen Genotypen beziehungsweise Spezies alternierte und kann in Tabelle 6 eingesehen werden.

Bei den Tieren, die abschließend mit nur einer Protothekenspezies beziehungsweise nur einem Genotyp infiziert wurden, erfolgte die Infektion in den kontralateral gelegenen Vierteln, sodass hier zwei Viertel als Kontrollviertel dienten.

**Tabelle 6: Infektionsdosis und -keim der einzelnen Tiere und Euterviertel.**

	Euterviertel			
	VL	HL	HR	VR
<b>Tier 1</b>	GT 2 (1 x 10 <sup>2</sup> KbE)	GT 2 (1 x 10 <sup>4</sup> KbE)	GT 2 (1 x 10 <sup>6</sup> KbE)	GT 2 (1 x 10 <sup>8</sup> KbE)
<b>Tier 2</b>	GT 1	Kontrollviertel	GT 2	<i>P. blaschkeae</i>
<b>Tier 3</b>	<i>P. blaschkeae</i>	GT 2	GT 1	Kontrollviertel
<b>Tier 4</b>	GT 2	<i>P. blaschkeae</i>	Kontrollviertel	GT 1
<b>Tier 5</b>	GT 2	Kontrollviertel	GT 2	Kontrollviertel
<b>Tier 6</b>	GT 1	Kontrollviertel	GT 1	Kontrollviertel
<b>Tier 7</b>	Kontrollviertel	<i>P. blaschkeae</i>	Kontrollviertel	<i>P. blaschkeae</i>

VL = vorne links; HL = hinten links; HR = hinten rechts; VR = vorne rechts; GT 1 = *P. zopfii* Genotyp 1; GT 2 = *P. zopfii* Genotyp 2. Die Infektionsdosis lag bei allen Tieren außer Tier 1 bei 1 x 10<sup>6</sup> KbE.

### 3.5 Probenentnahme und Probenbearbeitung

Während des gesamten Versuchszeitraums wurden die Tiere täglich einer klinischen Untersuchung und dem Euteruntersuchungsgang modifiziert nach ROSENBERGER (1990) unterzogen. Weiterhin wurden täglich Milchproben und jeden zweiten beziehungsweise dritten Tag Blut- und Kotproben gewonnen.

#### 3.5.1 Blutproben

Die Entnahme der Blutproben erfolgte nach ordnungsgemäßer Desinfektion durch Punktion der Schwanzvene mittels einer Einmalkanüle (Microlance<sup>TM</sup>3-Kanülen, Ø/L 1,2x40 mm; Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Für die Gewinnung von Blutserum wurden Monovetten (Monovette® 9 ml; Fa. Sarstedt, Nümbrecht) und für die hämatologische Untersuchung EDTA-Blut (Kabevette® 10 ml; Fa. Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Eisenroth) verwendet. Für die Herstellung des Serums wurde das Blut nach vollständiger Gerinnung mit einem Glasstab vom Gefäßrand gelöst und bei 2800 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum in 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Deckel (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) pipettiert und bis zur serologischen Auswertung bei -21 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des großen Blutbildes wurde durch das Labor der Medizinischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig unter Verwendung des Hämatologiesystems ADVIA 120 (Fa. Bayer Diagnostics, München) vorgenommen.

### 3.5.2 Kotproben

Die rektal entnommenen Proben wurden in zwei Ansätzen untersucht. Zum einen wurde 1 g Kot in 9 ml PBS suspendiert und von dieser Suspension 100 µl als Direktausstrich auf PIM-Agar (siehe Anhang Kapitel 9.1) aufgebracht. Ferner wurden 10 g Kot in 90 ml Sabouraud 2%-Glucose-Bouillon eingewogen und für 24 Stunden bei 37 °C aerob inkubiert. Von dieser Voranreicherung wurden dann ebenfalls 100 µl auf den selektiven PIM-Agar ausgestrichen. In beiden Fällen wurden die Agar-Platten bei 37 °C aerob für insgesamt sieben Tage bebrütet, wobei sie in 24-stündigem Abstand auf Wachstum von Prototheken kontrolliert wurden.

### 3.5.3 Milchproben

Die Entnahme des Milchsekrets erfolgte stets nach dem Morgenmelken. Zunächst wurden die Zitzen mit Zellstoff gereinigt und anschließend desinfiziert (Sterilium®; Fa. Bode, Hamburg). Dann wurden die ersten 6-8 Milchstrahlen verworfen und eine ausreichende Sekretmenge in die vorbereiteten Probengefäße (Zentrifugen-Röhrchen; Fa. Sarstedt, Nümbrecht) ermolken.

#### 3.5.3.1 California-Mastitis-Test

In die vier Schalen einer schwarzen Prüfplatte wurden aus jedem Euterviertel etwa 2 ml Milch gegeben. Zu jeder Milchprobe wurden anschließend etwa 2 ml Testflüssigkeit (CMT-Test-Schalmtestflüssigkeit; Fa. Bovivet, Sainte-Croix, Kanada) hinzugefügt und unter langsamen, kreisenden Bewegungen wurden diese beiden Komponenten vermischt. Das Ausmaß der Reaktion der Milch und der Testflüssigkeit miteinander diente zur semiquantitativen Beurteilung der Milchezahl.

#### 3.5.3.2 Leitfähigkeit der Milch

Die absolute Leitfähigkeit (mS/cm) der Milchsekrete der einzelnen Euterviertel wurde mit dem Leitfähigkeitsmesser Konduktometer OK 102/1 (Fa. Radelkis, Budapest) durchgeführt. Vor den Messungen wurde das Gerät täglich kalibriert. Die Temperatur der Milchproben schwankte dabei lediglich zwischen 19 und 21 °C.

### **3.5.3.3 Chloridgehalt der Milch**

Der Chloridgehalt der Milch wurde mittels Teststäbchen (Merckoquant®; Fa. Merck, Darmstadt) nach Herstellerangaben erhoben.

### **3.5.3.4 Mikrobiologische Untersuchung der Milch**

Um die Menge der in der Milch vorhandenen Erreger quantifizieren zu können wurden 25 µl Milch im Dreifachansatz auf Sabouraud 4%-Glucose-Agar mit Chloramphenicol (0,5 mg/ml) (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) ausgetropft. Weitere 25 µl wurden in einer Mikrotiterplatte (Zellkulturplatten 96F; Fa. TPP, Trasadingen, CH) in 10er-Schritten mit PBS bis zu einer Verdünnung von 1:100.000 verdünnt und ebenfalls im Dreifachansatz ausgetropft. Nach 48-stündiger aerober Inkubation bei 37 °C konnte die Keimzahl durch Auszählen und Mittlung der Anzahl der Kolonien pro Verdünnungsstufe bestimmt werden. Parallel dazu wurde mit 100 µl Milch ebenfalls auf Sabouraud 4%-Glucose-Agar mit Chloramphenicol ein Verdünnungsausstrich vorgenommen und nach 48-stündiger aerober Bebrütung bei 37 °C beurteilt. Bei dieser Methode konnte das Wachstum lediglich semiquantitativ als „schwach“, „mäßig“ und „gut“ eingeordnet werden. Teilweise konnten durch diese Methoden keine Erreger mehr nachgewiesen werden. Alle Milchproben wurden daher zusätzlich im Verhältnis 1:10 mit Sabouraud 2%-Glucose-Bouillon aerob bei 37 °C für 24 Stunden angereichert und anschließend auf Sabouraud 4%-Glucose-Agar mit Chloramphenicol als Verdünnungsausstrich aufgebracht. Das Wachstum nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C unter aeroben Bedingungen wurde auch hier semiquantitativ als „schwach“, „mäßig“ oder „gut“ bewertet.

### **3.5.3.5 Herstellung von Milchserum**

Zur Gewinnung des Milchserums wurden 10 ml Milch mit 0,2 U Chymosin (Rennin® von *Mucor miehei*; Fa. Fluka, Seelze) versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben bei 2500 x g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, um den Rahm am darauffolgenden Tag gut entfernen zu können. Das so separierte Milchserum wurde dann abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -21 °C aufbewahrt.

### 3.6 Sektion

Am 20. Tag nach intramammärer Infektion wurden die Tiere per Bolzenschuss betäubt und durch Blutentzug getötet. Anschließend wurden jedem Versuchstier, je nach Anzahl der vorhandenen Euterlymphknoten, zwischen 42 und 46 Gewebeprobe unter sterilen Kautelen entnommen.

Pro Euterviertel wurden aus dem Alveolarbereich, dem Bereich der großen Milchgänge und der Drüsenzisterne je zwei Gewebeprobe entnommen. Des weiteren wurde zudem der Strichkanal mit einer Tupferprobe untersucht. Teile der folgenden weiteren Gewebe wurden ebenfalls für die anschließende mikrobiologische Untersuchung gewonnen:

**Tabelle 7: In den Infektionsversuchen untersuchte Gewebeprobe.**

<b>Gewebeprobe</b>	<b>Abkürzung</b>
Leber	Le
Leberlymphknoten	Lely
Niere links	Ni li
Nierenlymphknoten links	Nily li
Niere rechts	Ni re
Nierenlymphknoten rechts	Nily re
Lunge	Lu
Lungenlymphknoten	Luly
Jejunallymphknoten	Jely
Kolonlymphknoten	Koly
Kniefaltenlymphknoten links	Kn li
Kniefaltenlymphknoten rechts	Kn re
Iliofemorallymphknoten links	Ili li
Iliofemorallymphknoten rechts	Ili re
Milz	Mi
Muskulatur	Mu

Zusätzlich wurde von jedem ausgebildeten Euterlymphknoten eine Gewebeprobe entnommen.

### 3.6.1 Mikrobiologische Untersuchung der Gewebeproben

Nach Entnahme der Gewebeproben wurden diese zunächst in 70%igem Ethanol (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) geschwenkt und anschließend abgeflammt. Mit einer sterilen Schere wurden je 5 g der Proben zerkleinert und in einen Stomacherbeutel (Fa. Seward, London, UK) eingewogen. Im Anschluss daran wurden zu jeder Probe 45 ml Sabouraud 2%-Glucose-Bouillon gegeben. Um das Gewebe zu homogenisieren wurde es anschließend mit einem Stomacher (Stomacher 400; Fa. Seward, London, UK) auf höchster Stufe für 2 Minuten bearbeitet. Diese Suspension wurde, wie bereits im Kapitel 3.5.3.4 näher beschrieben, in 10-er Schritten im Mikrotitersystem verdünnt und auf Sabouraud 4%-Glucose-Agar-Platten ausgetropft. Das verbliebene Homogenisat wurde zur Anreicherung für 48 Stunden bei 37 °C unter aeroben Verhältnissen inkubiert. Zum qualitativen Nachweis der Erreger wurden daraufhin je 100 µl sowohl ausgestrichen als auch ausgespatelt und nach 48-stündiger aerober Bebrütung bei 37 °C ausgewertet. Diejenigen Kolonien, die aufgrund ihrer Kulturmorphologie nicht eindeutig als Prototheken zu identifizieren waren, wurden lichtmikroskopisch verifiziert. Hierzu wurden geringe Anteile der Kolonie mit einer Impföse in einen Tropfen PBS auf einem Objektträger eingerieben, mit einem Tropfen Lactophenolblau (Fa. Merck, Darmstadt) versetzt und mit einem Deckglas (Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) versehen. Anschließend wurde das Präparat im Lichtmikroskop betrachtet.

### 3.7 Histologische Untersuchungen

Ausreichend große Teile der bei der Sektion entnommenen Gewebeproben wurden umgehend in 5%iges neutral gepuffertes Formaldehyd (Roti®-Histofix 4%; Fa. Carl Roth, Karlsruhe) verbracht und für 24 Stunden darin fixiert. Anschließend wurden sämtliche Organe nach Standardverfahren im Einbettautomaten (Hypercenter; Fa. Shandon, Frankfurt) in Paraplast (Fa. Vogel, Gießen) eingebettet. Von den Paraplast-Blöcken wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Fa. Reichert-Jung, Wien, A) 3-4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger (Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und einer routinemäßigen Hämalaun-Eosin-Färbung (H.-E.) (ROMEIS und BÖCK 1989) unterzogen. Zum Schutz der Präparate wurden die Objektträger noch im Eindeckautomaten (SCA-5600; Fa. Sakura Finetek, Staufen) mit Folie eingedeckt.

Die lichtmikroskopische Beurteilung erfolgte an einem Standardmikroskop (CH-2; Fa. Olympus, Hamburg).

Sowohl die Herstellung als auch die Beurteilung der hier beschriebenen Gewebeschnitte erfolgte dankenswerterweise durch das Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

### 3.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um den Verlauf der Antikörperantwort der Immunglobulinklasse A und der IgG-Subklasse 1 im Milchserum zu untersuchen wurde ein indirekter ELISA, modifiziert nach ROESLER et al. (2001) verwendet.

#### 3.8.1 Plattencoating

Zunächst wurden die betreffenden Protothekenkulturen auf Sabouraud 4%-Glucose-Agar aerob bei 37 °C für 48 Stunden angezüchtet. Bei den einzelnen Eutervierteln diente die bei der Infektion verwendete Protothekenspezies beziehungsweise der eingesetzte Genotyp als Coating-Antigen, sodass zum Beispiel die Sera des Viertels, welches mit *P. zopfi* Genotyp 1 infiziert worden war auf einer mit Genotyp 1 gecoateten Platte ausgewertet wurden. Anschließend wurden die Kulturen mit 4 ml Beschichtungspuffer (siehe Anhang Kapitel 9.1) von der Agarplatte abgeschwemmt und unter Zuhilfenahme einer Zählkammer nach Neubauer (Fa. Brand, Wertheim) die Gesamtkeimzahl der gewonnenen Suspension ermittelt. Daraufhin wurde diese durch Verdünnen mit Beschichtungspuffer auf  $1 \times 10^7$  Protothekenzellen/ml eingestellt. Hiervon wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten (Maxisorp®; Fa. Nunc Ltd., Roskilde, DK) je 100 µl pro Well einpipettiert. Die befüllten Platten wurden anschließend mit Folie versiegelt und auf einem Horizontalschüttler (MTS 2/4 digital; Fa. IKA®, Staufen) bei 300 U/min für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät (Ultrawash Plus™; Fa. Dynex Technologies, Berlin) viermal mit je 300 µl Waschpuffer (=PBS-0,05%Tween® 20 siehe Anhang Kapitel 9.1) gewaschen, dann kräftig auf Papiertüchern ausgeklopft und bei Raumluft getrocknet. Um unspezifische Bindungsstellen an der Oberfläche der ELISA-Wellen zu blockieren wurde in jedes Well 100 µl Blockierungspuffer (siehe Anhang Kapitel 9.1) gegeben und die Platten dann erneut für 1 Stunde bei 37 °C auf dem Rüttler inkubiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten abermals viermal gewaschen, ausgeklopft und getrocknet. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie mit Folie bedeckt bei -21 °C aufbewahrt.

#### 3.8.2 ELISA-Durchführung

Um den Verlauf der Antikörperantwort während der experimentell induzierten Protothekemastitis darstellen zu können wurden die Milchsera der Infektionstage 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 20 untersucht. Als Positivstandard diente ein Gemisch der Sera aller drei infizierten Viertel des mischinfizierten Tieres 2 am 20. Tag der Infektion. Als Negativkontrolle diente ein Serumpool klinisch und kulturell negativer Tiere.

Zuerst wurde durch eine Schachbretttitration die am besten geeigneten Serum- und Konjugatverdünnungen ermittelt. Diese stellten sich wie folgt dar:

**Tabelle 8: Gebrauchsverdünnungen der im ELISA eingesetzten Milchserumproben und der sekundären Antikörper.**

<b>Konjugat:</b>	<b>Konjugat-Verdünnung:</b>	<b>Proben-Verdünnung:</b>
IgG1	1 : 2500	1 : 250
IgA	1 : 1000	1 : 100

Die Serumproben und die Positiv- und Negativkontrolle wurden zunächst mit PBS verdünnt und dann im Doppelansatz zu je 100 µl pro Well aufgetragen. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C auf dem Horizontalschüttler und ein anschließender viermaliger Waschschrift mit Waschpuffer. Die gewaschenen Platten wurden auf Papiertüchern kräftig ausgeklopft und im nächsten Schritt wurden die folgenden sekundären mit Peroxidase konjugierten Antikörper eingesetzt: Ziege-anti-Rind IgG1 (Fa. Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) und Ziege-anti-Rind IgA (Fa. AbD Serotec, Oxford, UK). Diese wurden mit PBS-0,05%Tween® 20 entsprechend der in Tabelle 8 genannten Konzentrationen verdünnt und jedes Well wurde mit 100 µl Gebrauchsverdünnung beschickt. Die darauffolgende Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten. Die Platten wurden dann abermals viermal gewaschen und anschließend ausgeklopft. Pro Well wurden nun 100 µl einer Wasserstoffperoxid (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) beinhaltenden Substratlösung (siehe Anhang Kapitel 9.1) aufgetragen, welche als Chromogen ABTS (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) beinhaltete. Nach 15-minütiger Inkubation, bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler, wurde die Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm durch einen ELISA Reader (Multiskan Ascent®; Fa. Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) abgelesen. Um den zeitlichen Verlauf der Immunantwort darstellen zu können wurden die Mittelwerte (MW) der gemessenen OD der Negativkontrolle (NK) und der Positivkontrolle (PK) ermittelt und der Proben-OD%-Wert nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Proben-OD\%-Wert} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}{\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}$$

### 3.9 Realtime PCR

Um die bei den mischinfizierten Versuchstieren aus dem Euter abgesiedelten Erreger sicher als *P. blaschkeae*, *P. zopfii* Genotyp 1 oder Genotyp 2 identifizieren zu können wurde eine sondenbasierte qualitative Realtime PCR eingesetzt.

#### 3.9.1 Extraktion der DNA aus den Gewebeproben

Die DNA der Erreger wurde nicht direkt aus den Gewebeproben extrahiert, sondern aus den Kulturen, die aus dem angereicherten Homogenisat isoliert wurden (siehe Kapitel 3.6.1). Zunächst wurden von diesen Reinkulturen mittels eines Glasstabes Kulturmaterial abgenommen und in 100 µl Reinstwasser resuspendiert. Ein Tropfen dieser Suspension wurde als Nativpräparat lichtmikroskopisch betrachtet um sicher zu stellen, dass es sich dabei um *Prototheca spec.* handelt. Unter Verwendung einer Ultraschallsonde (Ultraschallprozessor UP 200S; Fa. Dr. Hielscher, Teltow) wurden die Zellen bei einer Amplitude von 100 % und einer Pulsfrequenz von 0,5 für 30 Sekunden aufgeschlossen. Die Proben wurden dabei vor, während und nach der Ultraschallbehandlung auf Eis gelagert.

Die anschließende DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini Kit® (Fa. Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers. Die daraus gewonnene DNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.9.2 Primer, Sonden und Reaktionsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden *Prototheca*-spezifische Primer (Fa. biomers.net, Ulm) (siehe Tabelle 9) und für die einzelnen Spezies beziehungsweise Genotypen sequenzspezifische, mit verschiedenen Farbstoffen markierte, Sonden eingesetzt, deren Emissionsmaxima in unterschiedlichen Bereichen lagen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 9: Bei der Realtime PCR eingesetzte Primer.

Target	Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
<i>P. zopfii</i> Genotyp 1	Q-PzopfGT1 f	GCAGGGAGGTAGTGACAATACGT
	Q-PzopfGT1 r	GCAGGGAGGTAGTGACAATACGT
<i>P. zopfii</i> Genotyp 2	Q-PzopfGT2 f	GCAGGGAGGTAGTGACAATACGTA
	Q-PzopfGT2 r	GCAGGGAGGTAGTGACAATACGT
<i>P. blaschkeae</i>	Q-Pblasch f	GCAGGGAGGTAGTGACAATACGT
	Q-Pblasch r	GCAGGGAGGTAGTGACAATACGT

Tabelle 10: Bei der Realtime PCR eingesetzte Sonden.

Target	Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
<i>P. zopfii</i> Genotyp 1	Q-PzopfGT1 Pr	HEX-CCGAACCTTTCAGTTTGGCATCCG-BHQ1
<i>P. zopfii</i> Genotyp 2	Q-PzopfGT2 Pr	FAM-CCGAACTATCAGTTTGGCAATCGAAAT-BHQ1
<i>P. blaschkeae</i>	Q-Pblasch Pr	Cy5-CGATGCCGGGCCAACG-BHQ1

Die verwendeten TaqMan®-Sonden (Fa. bimoers.net, Ulm) hybridisierten zunächst, flankiert von den zwei Primern, an die Template-DNA (engl. template = Matrize) ohne messbare Reporterfarbstoffemission. Diese wurde zu diesem Zeitpunkt von einem ebenfalls an die Sonde konjugierten *Quencher* (engl. to quench = löschen) absorbiert. Als Quencher diente bei allen eingesetzten Sonden der Black Hole Quencher BHQ1, der als Besonderheit das von den Reportern aufgenommene Licht nicht als Licht anderer Wellenlänge emittiert, sondern als Wärme. Diese sogenannten dark, black-hole oder non-fluorescent Quencher unterdrücken daher die Lichtemission der Reporter wesentlich besser und interferieren auch wesentlich weniger bei der Elongationsphase, dem der Primer- und Sondenhybridisierung folgenden Schritt. Die Taq-Polymerase führt dabei nicht nur zur Amplifikation des DNA-Produktes, sondern auch zur Hydrolyse der Sonde, wobei sich der Reporter und der Quencher räumlich voneinander entfernen und somit nun die spezifische Wellenlänge des Reporterfarbstoffes detektiert werden kann.

In Tabelle 11 sind die Anwendungskonzentrationen der Oligonukleotide dargestellt. Als Mastermix kam der Absolute™ QPCR Mix (AB-Mix) (Fa. ABgene House, Epsom, UK), der den passiven Referenzfarbstoff ROX schon beinhaltet, zum Einsatz.

Tabelle 11: Anwendungskonzentrationen der Oligonukleotide für die Realtime PCR.

Oligonukleotid	Konzentration
Q-PzopfGT1 f	800 nm
Q-PzopfGT1 r	800 nm
Q-PzopfGT2 f	500 nm
Q-PzopfGT2 r	500 nm
Q-Pblasch f	600 nm
Q-Pblasch r	600 nm
Q-PzopfGT1 Pr	600 nm
Q-PzopfGT2 Pr	200 nm
Q-Pblasch Pr	400 nm

Bei jedem PCR-Lauf wurden eine Negativkontrolle und die drei Positivkontrollen von *P. blaschkeae*, *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. zopfii* Genotyp 2 mitgeführt. Bei der auch als „Non-Template-Control“ (NTC) bezeichneten Negativkontrolle wurde statt eines Templates DNA-freies Wasser eingesetzt. Für die DNA-Extraktion der Positivkontrollen wurden die entsprechenden Infektionsstämme in Reinkultur auf Sabouraud 4% Glucose-Agar-Platten kultiviert und genauso behandelt wie die Kulturen aus den Organproben.

Die sondenbasierte Realtime PCR wurde mit dem Realtime-Thermocycler MX 3000P® (Fa. Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 15 Minuten wurde die Two-step PCR mit den folgenden Amplifikationsbedingungen durchgeführt: Denaturierung, 95 °C für 30 Sekunden; Annealing (inklusive Hybridisierung der Sonden und Verlängerung des Amplikons), 58 °C für 1 Minute. Die durchgeführten PCRs umfassten jeweils 40 Zyklen.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Für die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse der elektrischen Leitfähigkeit und der quantitativen Erregerausscheidung mit der Milch sowie für den quantitativen Erregernachweis in den verschiedenen Euterabschnitten wurde das Programm SPSS Version 11.5 verwendet. Die exakten Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test errechnet und können im Anhang in den Tabellen 17 und 18 eingesehen werden.

Die Präsentation oben genannter Daten erfolgte durch PlotIT Version 3.2 und notched Boxplots wobei die dargestellten Whiskers jeweils den größten respektive kleinsten Wert der Daten darstellen. Ein p-Wert von <0.05 wurde jeweils als signifikant angesehen.

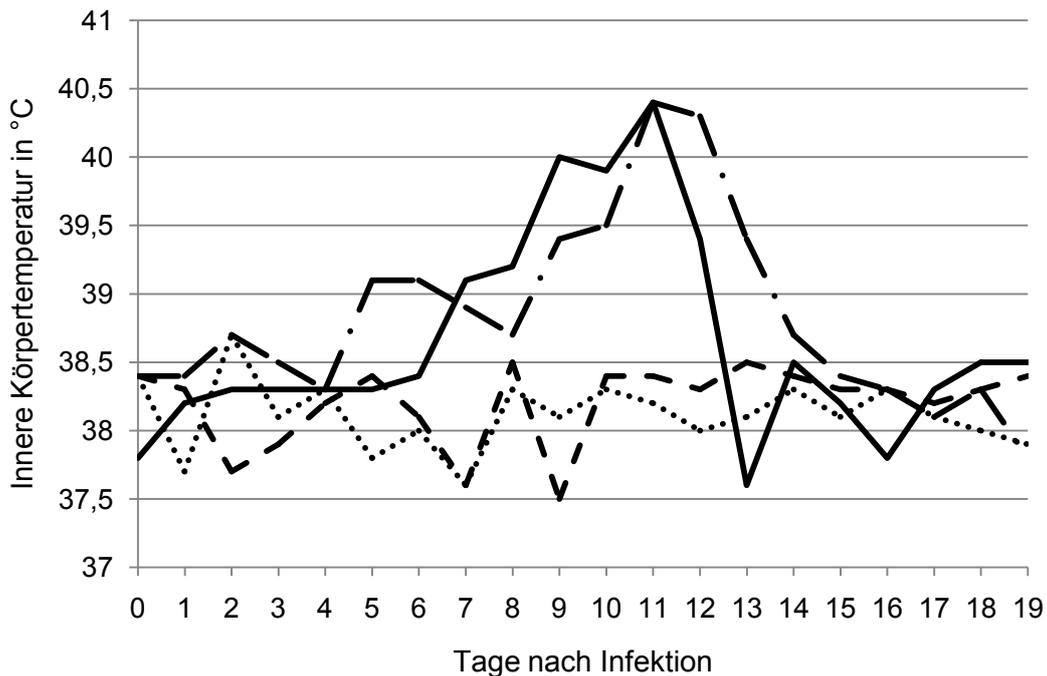
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Parameter

Die Messung der **inneren Körpertemperatur** mittels eines elektrischen Thermometers in der Mastdarmampulle erfolgte morgens zwischen 6 und 7 Uhr und abends zwischen 16 und 18 Uhr. Die Einteilung erhöhter Werte in die verschiedenen Grade von Fieber erfolgte nach ROSENBERGER (1990). Hierbei werden Körpertemperaturen zwischen 39,0 und 40,0 °C als *leichtes*, solche von 40,0 bis 41,0 °C als *mittelgradiges* und von 41,0 bis 42,0 °C als *hohes Fieber* bezeichnet.

Beim ersten Versuchstier, welches zur Dosisfindung diente, stellte sich am zweiten Tag nach Infektion aller Viertel mit jeweils unterschiedlichen Dosen von *P. zopfii* Genotyp 2 hohes Fieber ein. Die innere Körpertemperatur lag hierbei über mehrere Stunden zwischen 40,5 und 41,6 °C. Als sich das Allgemeinverhalten des Tieres zusätzlich mittelgradig bis hochgradig verminderte, wurde es mit 30 mg Metamizol-Natrium/kg Körpergewicht (Metapyrin; Fa. Serum-Werk-Bernburg AG) behandelt. Daraufhin wurde das Tier ruhig und aufmerksam, die innere Körpertemperatur sank wieder ab und bewegte sich nun im physiologischen Bereich.

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, konnten bei den mit *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae* monoinfizierten Rindern über den gesamten Versuchszeitraum keine erhöhten Werte der Körpertemperatur festgestellt werden. Sowohl bei der ausschließlich mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Kuh als auch bei jedem der drei mischinfizierten Versuchstiere, die unter anderem auch mit *P. zopfii* Genotyp 2 infiziert worden waren, trat zeitweise teils leichtes, teils mittelgradiges Fieber auf.



**Abbildung 3: Innere Körpertemperatur der Versuchstiere im Verlauf der Infektion.** Die Werte des mit Genotyp 1 von *P. zopfii* infizierten Tieres werden durch die gestrichelte Linie, des mit dem Genotyp 2 von *P. zopfii* infizierten Tieres durch die fortlaufende Linie und des mit *P. blaschkeae* infizierten Rindes durch die gepunktete Linie dargestellt. Das arithmetische Mittel der Werte der drei mischinfizierten Tiere wird durch die Strichpunktlinie repräsentiert.

Abgesehen von dem bereits beschriebenen kurzzeitig verminderten Allgemeinverhalten der Dosisfindungskuh waren alle Rinder spätestens zwölf Stunden nach der Einstallung in den Versuchsstall und während des gesamten Versuchszeitraumes ruhig und aufmerksam. Bei keinem weiteren Tier wurde ein pathologischer Befund hinsichtlich des **Allgemeinverhaltens** erhoben.

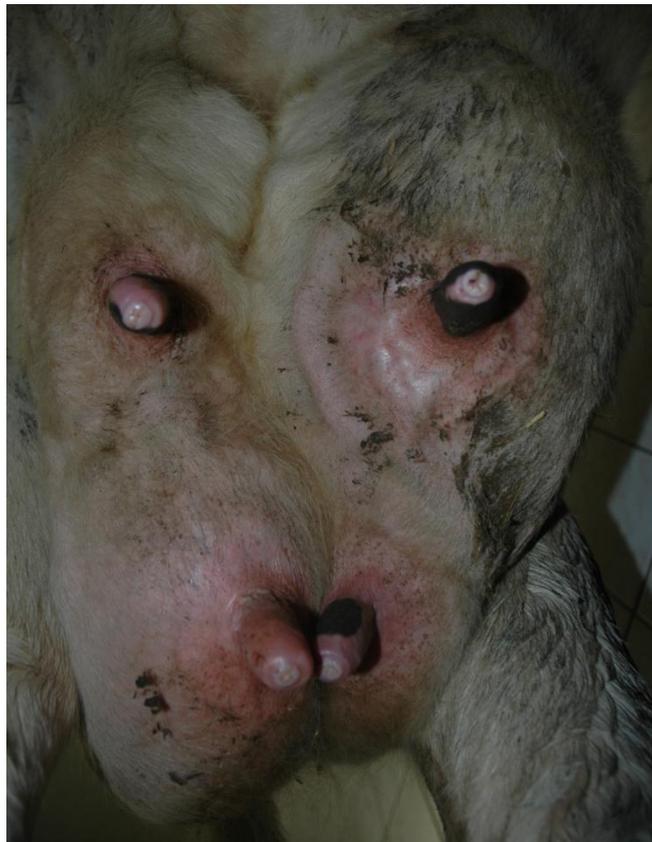
Auch die **Futteraufnahme**, der **Puls**, die **Atmung**, die **Pansenbewegungen** und der **Kotabsatz** waren bei jedem Tier zu jeder Zeit physiologisch.

#### 4.1.1 Euteruntersuchung

Bei der täglichen **Adspektion** des Euters wurde auf seine **Symmetrie**, etwaige **mechanische Schädigungen** und auf Abweichungen von der physiologischen **Hautfarbe** geachtet. Auffallend hierbei war, dass jedes der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel stark vergrößert war. Diese Vergrößerung trat stets zwischen dem 3. und 6. Tag *post infectionem* (*p.i.*) erstmals auf und führte zu einer starken Asymmetrie des Euters (siehe auch Abbildung 4 und 5). Diese hielt in allen Fällen bis zur Euthanasie der Tiere an.



**Abbildung 4: Hochgradig vergrößertes Euterviertel bei Tier 3.** Die Infektion der Viertel erfolgte vorne links mit *P. blaschkeae*, hinten links mit *P. zopfii* Genotyp 2 und hinten rechts mit *P. zopfii* Genotyp 1. Das vordere rechte Euterviertel diente als Kontrollviertel.



**Abbildung 5: Hochgradig vergrößerte Euterviertel bei Tier 5.** Die Infektion der Viertel erfolgte vorne links (im Bild oben rechts) und hinten rechts (im Bild unten links) mit *P. zopfii* Genotyp 2. Das vordere rechte und das hintere linke Euterviertel dienten als Kontrollviertel.

Bei Tier 1 war das vordere rechte mit  $1 \times 10^8$  KbE infizierte Viertel bereits nach weniger als 48 Stunden stark vergrößert, während das mit  $1 \times 10^6$  KbE infizierte Viertel erst 5 Tage nach der Infektion anschwell. Bei dem mischinfizierten Tier 4 vergrößerte sich zusätzlich zum mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten vorderen linken Viertel das mit *P. blaschkeae* infizierte hintere linke Viertel. Bei diesem Tier war die gesamte linke Euterhälfte außerdem gerötet und der Kniefaltenlymphknoten derselben Seite stark vergrößert. Auch die **Oberflächentemperatur** der linken Euterhälfte dieses Rindes war an einem Versuchstag pathologisch verändert und wurde mit „heiß“ befundet.

Im Anschluss an die Adspektion erfolgte die Palpation der einzelnen Euterabschnitte, bei der zunächst auf die **Druckempfindlichkeit** geachtet wurde. Lediglich bei Tier 4 (mischinfiziert) kam es über einen längeren Zeitraum zu unterschiedlich starker Schmerzhaftigkeit. Am Tag 8, 9, 11, 12, 14 und 17 *p.i.* reagierte dieses Rind bei der Palpation des mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten vorderen linken Viertels empfindlich. Am 13. Tag *p.i.* war das betroffene Viertel sogar hochgradig schmerzhaft und die Kuh konnte dort nicht gemolken werden. Nach ordnungsgemäßer Desinfektion wurde an diesem Tag das Milchsekret dieses Viertels mittels Milchablasskanüle gewonnen.

Die **Abziehbarkeit** der Euterhaut von ihrer Unterlage wurde ebenfalls täglich am ausgemolkenen Euter untersucht. Besonders Tier 4 (mischinfiziert) wies in dieser Hinsicht über einen längeren Zeitraum einen pathologischen Befund auf: Vom 11. Tag *p.i.* bis zum Tag der Euthanasie waren bestimmte Bereiche der Euterhaut nicht abziehbar. Zunächst war am 11. und 12. Tag *p.i.* der ventrale Bereich des vorderen linken, mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertels nicht abziehbar. Von Tag 13 bis 16 *p.i.* war dieser Zustand dann auf die ganze ventrale linke Euterhälfte ausgeweitet, um dann vom 17. bis 20. Tag *p.i.* wieder auf den ventralen Bereich des vorderen linken Viertels beschränkt zu sein. Bei dieser Kuh war in diesen Bereichen ein ausgeprägtes Ödem vorhanden. Lediglich vom 18. bis zum 20. Tag *p.i.* war zwar die Abziehbarkeit der Euterhaut nicht erhalten, bei starkem Druck auf das Gewebe war allerdings kein offensichtliches Ödem mehr zu verzeichnen. Bei Tier 5, welches auf dem vorderen linken und hinteren rechten Viertel mit *P. zopfii* Genotyp 2 infiziert worden war, konnte die Euterhaut zunächst vorne links im ventralen Bereich nicht mehr abgezogen werden. Ein Tag später, am 14. Tag *p.i.*, und auch am 15. Tag *p.i.* zeigten beide infizierten Viertel einen pathologischen Befund. Dieses Tier zeigte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine durch Druckpalpation feststellbare Ödembildung am Euter, während die Tiere 2 und 3 für jeweils nur einen Tag Ödeme im ventralen Bereich der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel zeigten. Bei Tier 2 geschah dies am 3. Tag *p.i.* und bei Tier 3 am 18. Tag *p.i.*.

## Ergebnisse

**Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Euteruntersuchung der mit den unterschiedlichen Erregern infizierten Euterviertel.** GT 1 = die fünf Euterviertel, welche mit *P. zopfii* Genotyp 1 infiziert worden sind; GT 2 = die fünf Euterviertel, welche mit *P. zopfii* Genotyp 2 infiziert worden sind ; *P. bl.* = die fünf Euterviertel, welche mit *P. blaschkeae* infiziert worden sind. - = die fünf Viertel zeigten alle über den gesamten Versuchszeitraum hinweg einen negativen Befund; + = eines oder mehrere der fünf Viertel zeigte zu einem Zeitpunkt einen positiven Befund.

	Schwellung	Rötung	vermehrte Wärme	Schmerzhaftigkeit	keine Abziehbarkeit	Euter diffus verhärtet
<b>GT 1</b>	- (0 / 5)	- (0 / 5)	- (0 / 5)	- (0 / 5)	- (0 / 5)	- (0 / 5)
<b>GT 2</b>	+ (5 / 5)	+ (1 / 5)	+ (1 / 5)	+ (1 / 5)	+ (5 / 5)	+ (5 / 5)
<b><i>P. bl.</i></b>	+ (1 / 5)	+ (1 / 5)	+ (1 / 5)	- (0 / 5)	+ (1 / 5)	- (0 / 5)

Bei der Palpation der **Euterlymphknoten** waren vor Versuchsbeginn alle tastbaren Lymphknoten normal groß. Da während des Versuchsverlaufes die mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel enorm vergrößert waren, konnten die *Lymphonodi mammarii* oft nicht mehr ertastet werden. Lediglich bei Tier 2 konnte man am 2. Tag *p.i.* eine geringgradige Schwellung des linken caudalen Euterlymphknotens feststellen, welcher sich dann am 3. Tag *p.i.* hochgradig vergrößert zeigte. Auch bei diesem Tier waren ab diesem Zeitpunkt Teile des Euters so vergrößert, dass eine Palpation der Lymphknoten nicht mehr möglich war. Lediglich bei den nicht mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Tieren 6 und 7 war auf beiden Seiten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine Vergrößerung der Lymphknoten zu erkennen.



**Abbildung 6: Hochgradig vergrößerter Euterlymphknoten der rechten Euterhälfte bei Tier 2.** Dieses Rind war zuvor vorne links mit dem Genotyp 1 von *P. zopfii*, hinten rechts mit dem Genotyp 2 von *P. zopfii* und vorne rechts mit *P. blaschkeae* infiziert worden. Das hintere linke Viertel diente als Kontrolle.

Die **Konsistenz** des Euterparenchyms eines jeden Viertels wurde wie folgt beurteilt:

- obB Eutergewebe insgesamt feinkörnig und weich
- I Eutergewebe insgesamt grobkörnig, aber weich
- II Eutergewebe allgemein grobkörnig-derb mit einzelnen Knoten
- III Eutergewebe allgemein grobknotig
- IV Eutergewebe grobknotig mit einzelnen diffusen Verhärtungen
- V Eutergewebe insgesamt diffus verhärtet
- VI Eutergewebe akut geschwollen (vermehrt warm und schmerzhaft)

Bei Tier 1 wurde für die Viertel, die mit  $1 \times 10^2$  und  $1 \times 10^4$  KbE infiziert worden waren vom 1. bis zum 4. Tag *p.i.* eine „I“ vergeben, während bei dem mit  $1 \times 10^8$  KbE infizierten Viertel bereits ab dem 1. Tag *p.i.* eine „V“ vergeben wurde. Das Eutergewebe des Viertels, welches mit der Dosis von  $1 \times 10^6$  KbE, die auch im weiteren Versuch verwendet wurde, infiziert worden war, zeigte sich am 1. Tag *p.i.* grobknotig mit einzelnen Verhärtungen (IV), am 2. und 3. Tag insgesamt grobkörnig, aber weich (I), am 4. Tag dann allgemein grobkörnig-derb mit einzelnen Knoten (II) und ab dem 5. Tag insgesamt diffus verhärtet (V). Die anderen mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel waren ebenfalls alle ab einem bestimmten Tag diffus verhärtet: Bei Tier 2 (mischinfiziert) war dies ab dem 2. Tag, bei Tier 3 (mischinfiziert) ab dem 4. Tag und bei Tier 4 (mischinfiziert) ab dem 5. Tag *p.i.*. Das Tier, welches auf zwei Vierteln mit dem Genotyp 2 infiziert wurde, entwickelte im vorderen linken Viertel ab dem 2. Tag und im hinteren rechten Viertel ab dem 4. Tag *p.i.* dieselben Symptome. Die diffuse Verhärtung des Parenchyms dieser Euterviertel hielt in allen Fällen bis zum Versuchsende an.

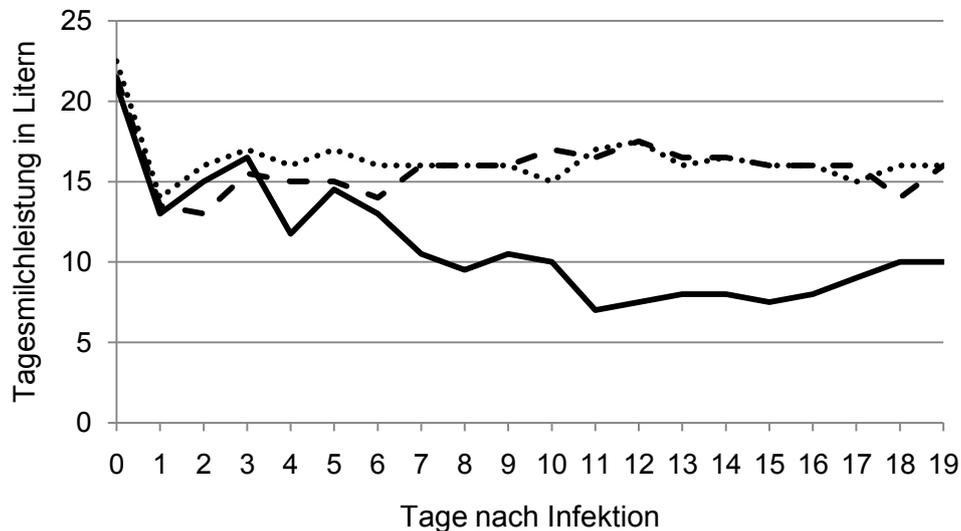
Sowohl die mit *P. zopfii* Genotyp 1, als auch die mit *P. blaschkeae* infizierten Euterviertel waren stets insgesamt feinkörnig und weich (obB). Bei keinem der Kontrollviertel gab es Veränderungen hinsichtlich des Palpationsbefundes während des Zeitraums der Infektion.

### 4.1.2 Milchleistung

Bei jedem der Tiere wurde sowohl beim Morgenmelken als auch beim Nachmittagsmelken die Milchmenge erfasst. Aus der Summe der beiden Werte ergab sich die Tagesmilchleistung. Der Verlauf der Milchleistung jener Rinder, die nur mit einem der Erreger infiziert wurden, ist in Abbildung 7 dargestellt.

Nachdem am ersten Tag nach Infektion bei allen drei Tieren die Tagesmilchleistung um circa 38% abfiel, lagen die Tagesmilchleistungen der mit *P. zopfii* Genotyp 1 beziehungsweise mit *P. blaschkeae* infizierten Kühe anschließend konstant bei circa 16 Litern. Die Milchleistung des mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Rindes hingegen

sank bis auf 7 Liter pro Tag ab und lag an den letzten zwei Versuchstagen vor Euthanasie bei 10 Litern.



**Abbildung 7: Milchmenge der monoinfizierten Versuchstiere im Verlauf der Infektion.** Die Werte des mit Genotyp 1 von *P. zopfii* infizierten Tieres werden durch die gestrichelte Linie, des mit dem Genotyp 2 von *P. zopfii* infizierten Tieres durch die durchgezogene Linie und des mit *P. blaschkeae* infizierten Rindes durch die gepunktete Linie dargestellt.

## 4.2 Milchuntersuchung

### 4.2.1 Sensorische Veränderungen

Die Milch eines jeden Viertels wurde zunächst sensorisch auf Veränderungen überprüft. Hierbei wurde das Sekret in eine schwarze Mastitistestschale gemolken und hinsichtlich des **Aussehens** und des **Geruchs** beurteilt.

Für die Erfassung des adspektorischen Sekretbefundes diente folgender Schlüssel:

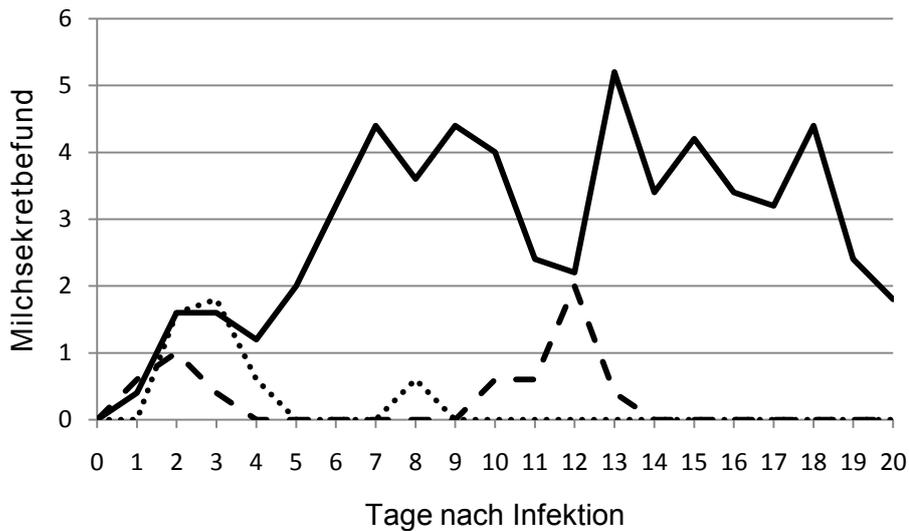
- 0 Sekret sinnfällig unverändert
- 1 Milchcharakter erhalten, wässrige Konsistenz, ohne Flocken
- 2 Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken
- 3 Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken
- 4 Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken
- 5 Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken
- 6 Milchcharakter völlig aufgehoben

Bei den mit Genotyp 1 von *P. zopffii* infizierten Vierteln stellten sich die Ergebnisse zwischen den mischinfizierten Kühen und der Kuh, die ausschließlich mit diesem Genotyp infiziert worden war, sehr unterschiedlich dar. Von den mischinfizierten Rindern zeigte lediglich die Milch von Tier 3 am 12. Tag *p.i.* viele grobe Flocken bei erhaltenem Milchcharakter (4). Bei dem ausschließlich mit Genotyp 1 infizierten Tier zeigten sowohl das vordere linke als auch das hintere rechte Viertel an verschiedenen Tagen Abweichungen vom Normalbefund: Der intramammären Instillation sehr zeitnah wurde das Sekret vom hinteren rechten Viertel bereits am 1. Tag *p.i.* mit „3“, und am 2. Tag *p.i.* mit „2“ befundet. Ebenfalls am 2. Tag *p.i.* traten beim Sekret des hinteren rechten Viertels bei erhaltenem Milchcharakter einige grobe Flocken auf (3). Am 3. Tag *p.i.* wurde das Sekret dieses Viertels dann mit „2“ beurteilt und war anschließend bis zum 9. Tag *p.i.* wieder sinnfällig unverändert. Vom 10. bis zum 12. Tag *p.i.* wurde das Sekret des vorderen linken Viertels dann wieder mit „3“ befundet, wobei am 12. Tag *p.i.* auch die Milch des anderen infizierten Viertels derartig sinnfällig verändert war.

Verwendete man *P. blaschkeae* als Infektionserreger, zeigten sich bei den damit instillierten Vierteln ebenfalls Abweichungen bei der sensorischen Untersuchung. Bei den mischinfizierten Tieren wurde das Sekret bei Tier 2 am 3. Tag *p.i.* mit „3“ beurteilt und bei Tier 4 am 8. Tag *p.i.* ebenso. Die mit dieser Spezies infizierten Viertel von Tier 7 zeigten beide ein sehr ähnliches Bild: am 2. Tag *p.i.* wurde die Milch jeweils mit „4“ bewertet, am 3. Tag *p.i.* jeweils mit „3“ und beim vorderen rechten Viertel waren auch noch am 4. Tag *p.i.* einige grobe Flocken bei erhaltenem Milchcharakter zu finden (3).

Die Befunde der Adspektion des Milchsekrets der mit dem Genotyp 2 von *P. zopffii* infizierten Euterviertel stellten sich so heterogen dar, dass auf eine Beschreibung an dieser Stelle verzichtet wird. Der genaue Verlauf dieser Befunde kann jedoch im Anhang in Tabelle 19 eingesehen werden. Lediglich bei den mit diesem Erreger infizierten Vierteln kam es zeitweise dazu, dass der Milchcharakter weitgehend verloren bis völlig aufgehoben war (5 beziehungsweise 6).

Das Milchsekret der Kontrollviertel zeigte teilweise ebenfalls sinnfällige Veränderungen: Zum einen waren bei Tier 4 (mischinfiziert) am 13. Tag *p.i.* wenige kleine Flocken zu erkennen und zum anderen waren die Gemelke beider Kontrollviertel von Tier 5 (monoinfiziert mit *P. zopffii* Genotyp 2) am 11. Tag *p.i.* vorwiegend flockig und der Milchcharakter war weitgehend verloren (5).

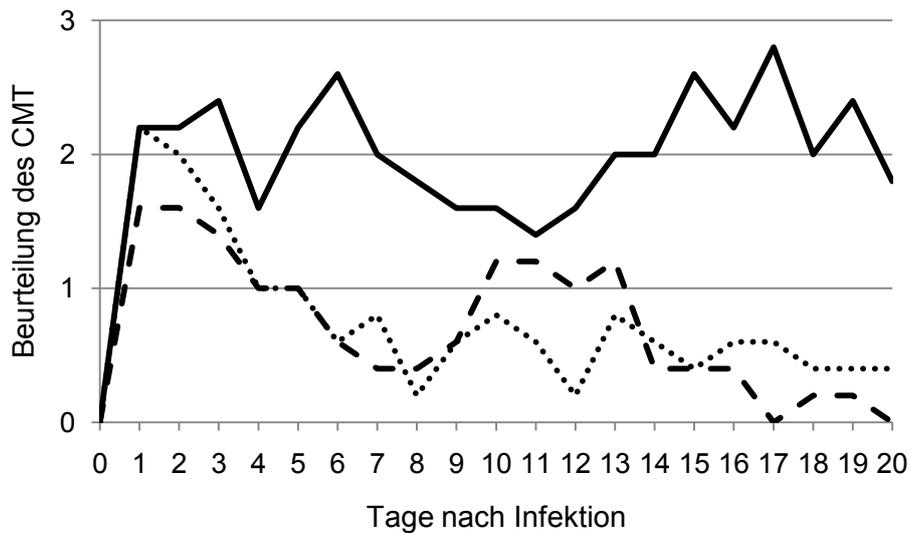


**Abbildung 8: Verlauf der Befunde der sensorischen Milchuntersuchung.** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der Werte der mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Viertel, die fortlaufende Linie die der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Euterviertel und die gepunktete Linie die der mit *P. blaschkeae* infizierten Viertel dar. 0 = Sekret sinnfälliger unverändert; 1 = Milchcharakter erhalten, wässrige Konsistenz, ohne Flocken; 2 = Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken; 3 = Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken; 4 = Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken; 5 = Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken; 6 = Milchcharakter völlig aufgehoben.

Abweichungen der **Farbe** und des **Geruchs** der Milch kamen ausschließlich bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Eutervierteln vor. Das Sekret war hierbei stets ab dem 13. Tag *p.i.* bis zur Euthanasie sinnfälliger verändert. Die Milch war leicht gelblich und roch fade. Der typisch süßliche, leicht fettige Geruch war überhaupt nicht mehr ausgeprägt. Tier 4 zeigte diese Anzeichen bereits ab dem 7. Tag *p.i.*

### 4.2.2 California-Mastitis-Test

Die semiquantitative Bestimmung der Zellzahl in der Milch wurde täglich bei allen Eutervierteln durchgeführt. Abbildung 9 zeigt das arithmetische Mittel der bei den mit dem jeweils gleichen Erreger infizierten Viertel erhobenen Werte des California-Mastitis-Testes. Pro dargestellten Messpunkt wurde somit aus fünf erhobenen Werten das arithmetische Mittel gebildet.



**Abbildung 9: Verlauf der Ergebnisse des California-Mastitis-Testes während des Versuchszeitraumes.** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der Werte der mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Viertel, die fortlaufende Linie die der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel und die gepunktete Linie die der mit *P. blaschkeae* infizierten Viertel dar. 0 = keine Reaktion von Testflüssigkeit und Milch; 1 = geringe Schlierenbildung im Gemisch aus Testflüssigkeit und Milch; 2 = deutliche Schlierenbildung im Gemisch aus Testflüssigkeit und Milch; 3 = das Gemisch aus Testflüssigkeit und Milch floss nicht auseinander.

Am 1. und 2. Tag *p.i.* wurde der Wert 3 bei den infizierten Vierteln abhängig vom Infektionskeim beinahe gleich häufig vergeben. Weder die Infektion mit *P. zopfii* Genotyp 1 noch die mit *P. blaschkeae* führten allerdings über den 2. Tag *p.i.* hinaus zu derart hohen Zellzahlen.

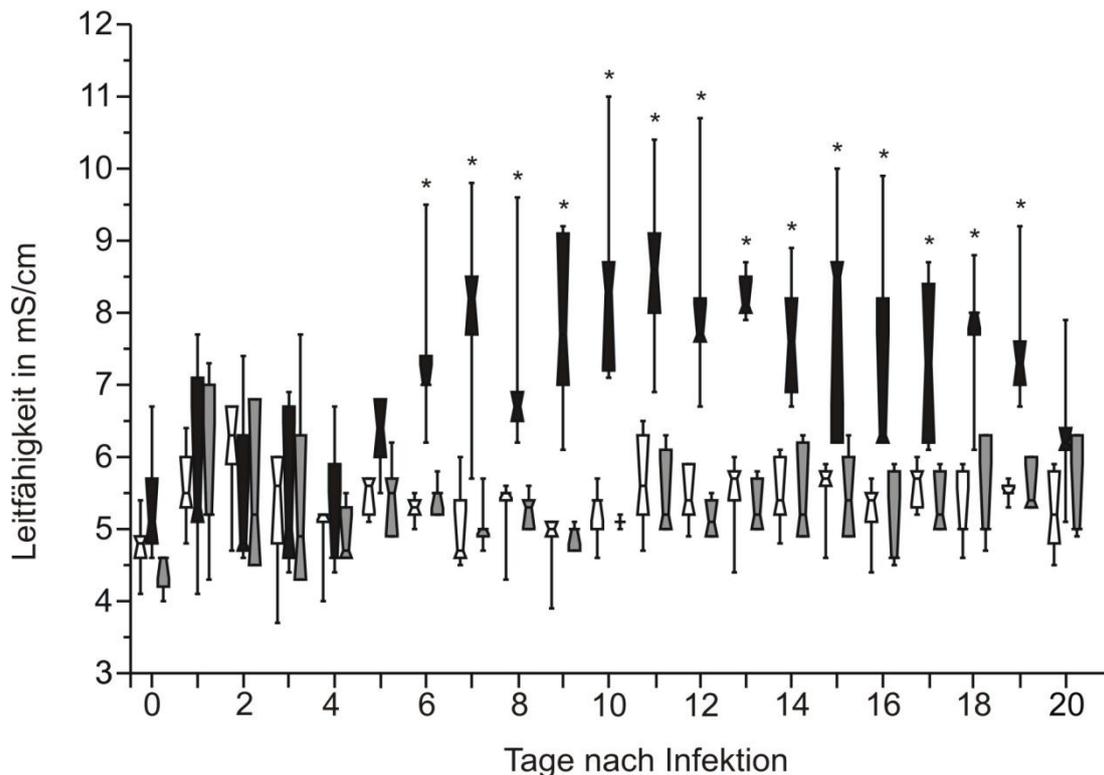
Die Kontrollviertel der Versuchstiere zeigten teilweise ebenfalls geringe Schlierenbildung (1). Bei Tier 3 ereignete sich dies am 9. Tag *p.i.*, bei Tier 4 am 13. und 18. Tag *p.i.* und bei dem vorderen linken Viertel von Tier 7 am 5. und 13. Tag *p.i.* Lediglich bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Tier kam es häufiger zur Ausbildung von Schlieren (1). Dies ereignete sich am 1., 11., 12. und 18. Tag *p.i.* und betraf stets beide Kontrollviertel.

Die Kontrollviertel des ausschließlich mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Tieres zeigten zu keiner Zeit eine Reaktion von Testflüssigkeit und Milch.

#### 4.2.3 Elektrische Leitfähigkeit

Die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit der Milch wurde stets im Viertelanfangsgemelk vorgenommen. Während es bei den Gemelken der mit *P. zopfii* Genotyp 1 und der mit *P. blaschkeae* infizierten Viertel einzig in den ersten Tagen nach der Infektion zu einer leichten Erhöhung dieses Parameters kam, löste die intramammäre Instillation von *P. zopfii* Genotyp 2 eine gegenüber der anderen zwei Erreger signifikante Erhöhung der Leitfähigkeit zwischen dem 6. und dem 19. Tag *p.i.* aus (siehe Abbildung 10). Die absolute Leitfähigkeit von Milchproben mit

einer Temperatur von circa 20° C sollte niedriger als 7,0 mS/cm sein. Werte höher als der Referenzbereich traten am 1. Tag *p.i.* bei zwei der fünf Proben, die aus mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln stammten, und am 3. Tag *p.i.* bei einer der fünf Proben auf. Die Ergebnisse der Milchproben der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel waren sehr oft höher als 7,0 mS/cm, die Werte der Proben der Viertel, welche zuvor mit *P. zopfii* Genotyp 1 infiziert worden waren, lagen nie außerhalb des Referenzbereichs.



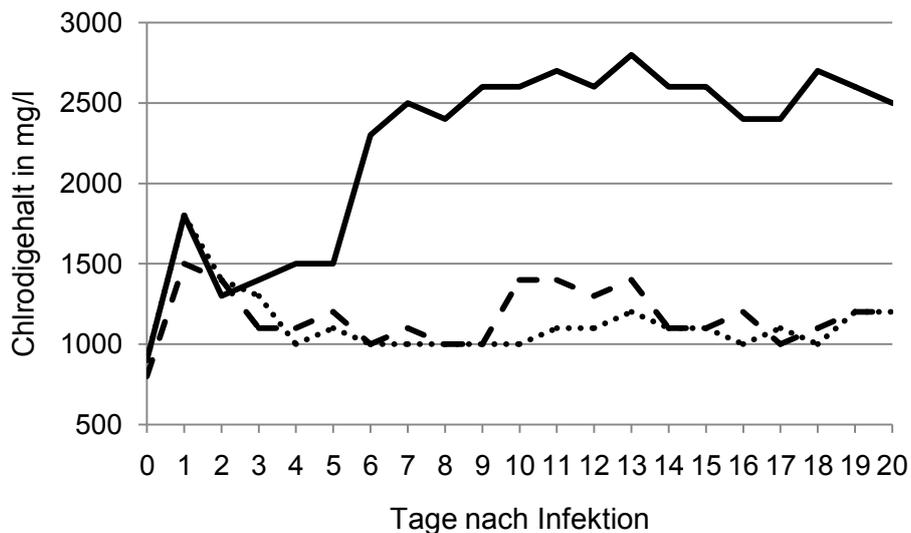
**Abbildung 10: Elektrische Leitfähigkeit der Milch der unterschiedlich infizierten Euterviertel im Verlauf des Versuchs.** Die weißen Notched-Boxen stellen die Ergebnisse der mit Genotyp 1 von *P. zopfii* infizierten Viertel dar. Die schwarzen Notched-Boxen stellen die Ergebnisse der mit Genotyp 2 von *P. zopfii* infizierten Viertel und die grauen Notched-Boxen die Ergebnisse der mit *P. blaschkeae* infizierten Euterviertel dar. mS/cm = Millisiemens pro Zentimeter; \* = signifikanter Unterschied gegenüber den anderen zwei Erregern.

#### 4.2.4 Chloridgehalt

Die Messung des Chloridgehaltes erfolgte semiquantitativ mittels Teststäbchen. Die Messergebnisse wurden so zwischen 500, 1000, 1500 und  $\geq 3000$  mg Chlorid pro Liter abgestuft. Nach dem internationalen Einheitensystem müssen Stoffmengen korrekterweise in „Mol“ angegeben werden, darauf wird bei dieser Darstellung

jedoch verzichtet. Der Referenzbereich des Chloridgehalts der Milch liegt zwischen 23 und 33 mmol/l, dies entspricht 815 beziehungsweise 1170 mg/l.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, war der Chloridgehalt der Milch der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel ab dem 6. Tag *p.i.* bis zum Versuchsende stark erhöht. Die Milch der mit *P. zopfii* Genotyp 1 und der mit *P. blaschkeae* infizierten Viertel zeigte am 1. und 2. Tag *post infectionem* stark erhöhte Werte. Danach jedoch sank der Chloridgehalt wieder ab, wobei bei den Gemelken der so infizierten Vierteln auch noch zu späteren Versuchszeitpunkten oftmals Chloridgehalte von 1500 mg/l verzeichnet wurden.



**Abbildung 11: Chloridgehalt der Milch der infizierten Euterviertel während des gesamten Versuchszeitraumes.** Bei den dargestellten Linien handelt es sich um das arithmetische Mittel der Ergebnisse der mit dem jeweiligen Typ infizierten Euterviertel. Die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert der Ergebnisse der mit Genotyp 1 von *P. zopfii* infizierten Viertel dar, die fortlaufende Linie die Ergebnisse der mit Genotyp 2 von *P. zopfii* infizierten Viertel und die gepunktete Linie repräsentiert die Ergebnisse der mit *P. blaschkeae* infizierten Viertel. mg/l = Milligramm pro Liter.

### 4.3 Blut

Die hämatologische Untersuchung des Blutes fand zu den Zeitpunkten 0., 2., 5., 7., 9., 12., 15., 17. und 20. Tag *post infectionem* statt. Als Referenzwerte wurden die vom Labor angegebenen Werte verwendet.

Bei der Auswertung des kleinen Blutbildes konnten lediglich Abweichungen der Gesamtleukozytenzahl festgestellt werden. Eine **Leukopenie** bestand bei Tier 2 (mischinfiziert) geringgradig ausgeprägt am 5. Tag *p.i.* und mittelgradig ausgeprägt am 7. Tag *p.i.*. Zu einer geringgradigen **Leukozytose** hingegen kam es bei Tier 7 (monoinfiziert mit *P. blaschkeae*) am 9. Tag *p.i.*.

Betrachtete man im Differentialblutbild die Zusammensetzung der Leukozyten, so bestanden unter anderem zahlreiche Abweichungen vom Normalbefund bei der

Population der **neutrophilen Granulozyten**. Zu einer sowohl relativen als auch absoluten Erhöhung der **stabkernigen neutrophilen Granulozyten** kam es am 5. Tag *p.i.* bei zwei der insgesamt sieben Tiere. Eine mittelgradige Erhöhung dieser jungen, unausgereiften neutrophilen Granulozyten zeigte zu diesem Zeitpunkt Tier 2 (mischinfiziert) und eine sowohl hochgradige relative Erhöhung mit 21% (Referenzbereich: 0-3%) als auch eine hochgradige absolute Erhöhung mit 1,05 G/l (Referenzbereich: 0-0,3 G/l) zeigte Tier 3 (mischinfiziert). Am 12. Tag *p.i.* waren die Werte bei Tier 2 und 4 (beide mischinfiziert) geringgradig und bei Tier 3 (mischinfiziert) mittelgradig erhöht. Über diese Zeitpunkte hinaus zeigte lediglich Tier 3 pathologische Anstiege der stabkernigen neutrophilen Granulozyten: am 15. Tag *p.i.* einen mittelgradigen und am 17. Tag *p.i.* einen geringgradigen Anstieg.

Die Ergebnisse der Untersuchung auf **segmentkernige neutrophile Granulozyten** fiel zwischen den einzelnen Tieren sehr heterogen aus: Bei Tier 6 (monoinfiziert mit *P. zopfii* Genotyp 1) kam es zunächst zu einer geringgradigen Erniedrigung der reifen Neutrophilen am 2. Tag *p.i.* und dann am 9. Tag *p.i.* (geringgradig ausgeprägt) und am 20. Tag *p.i.* (hochgradig ausgeprägt) zur Erhöhung.

Andere Versuchstiere zeigten während des Versuchszeitraums nur Erhöhungen (Tier 4 mittelgradig am 12. und 17. Tag *p.i.* und am 15. und 20. Tag *p.i.* hochgradig. Tier 7 am 5. und 7. Tag *p.i.* mittelgradig und am 0. und 9. Tag *p.i.* hochgradig) der reifen neutrophilen Granulozyten, andere wiederum stets nur geringgradige Erniedrigungen (Tier 1: 6. Tag; Tier 2: 5. und 7. Tag, Tier 5: 9. Tag *p.i.*) und die Ergebnisse von Tier 3 wichen nie von den Referenzwerten ab.

Bei vier Versuchstieren kam es zeitweise zu einer mittelgradigen **Lymphopenie**. Bei Tier 2 (mischinfiziert) ereignete sich dies am 2., 15. und 20. Tag *p.i.*, bei Tier 3 und 4 (beide mischinfiziert) am 5., 12., 15. und 20. Tag *p.i.* und bei Tier 5 (monoinfiziert mit *P. zopfii* Genotyp 2) am Tag der Euthanasie.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Veränderungen im Blutbild insgesamt sehr schwach und relativ unspezifisch waren.

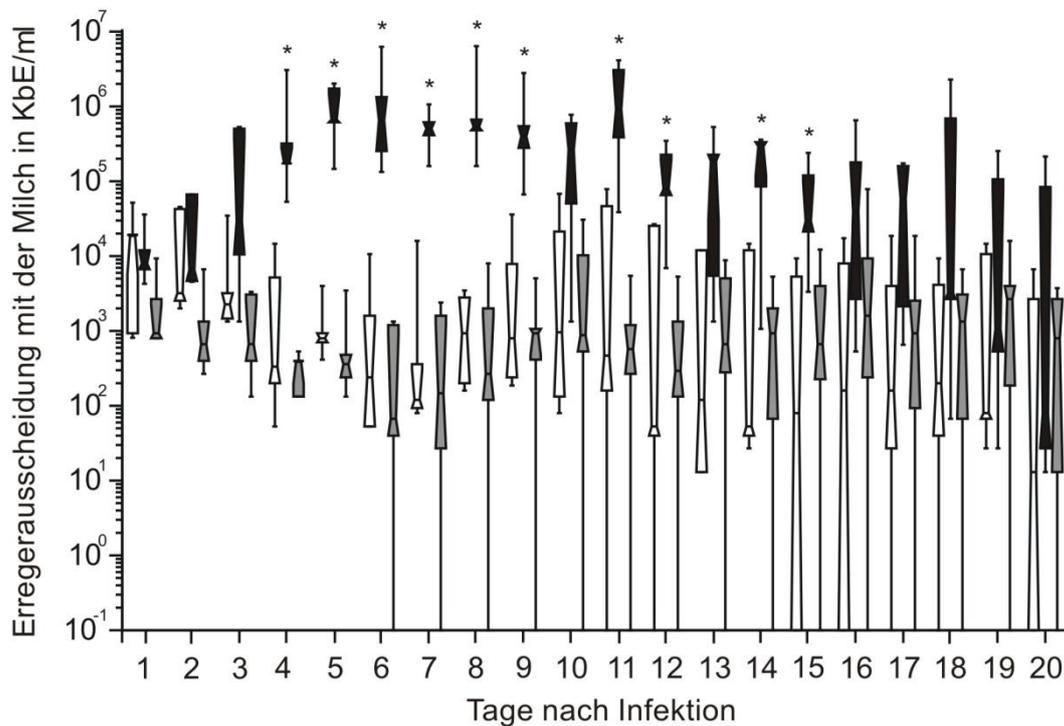
## 4.4 Mikrobiologische Untersuchungen

### 4.4.1 Erregerausscheidung mit der Milch

Wie bereits in Kapitel 3.5.3.4 beschrieben, wurde die Ausscheidung der Prototheken über die Milch durch drei verschiedene Verfahren ermittelt:

1. Quantitativer Nachweis mittels Mikrotitermethode
2. Direkter Verdünnungsausstrich
3. Verdünnungsausstrich der in Sabouraud-Bouillon angereicherten Proben

Die quantitative Erhebung der Erregerausscheidung ist in Abbildung 12 dargestellt. *P. zopfii* Genotyp 2 wurde am 3. Tag *p.i.* bereits signifikant mehr ausgeschieden als *P. blaschkeae*. Im weiteren Verlauf war bis zum 16. Tag *p.i.* die Ausscheidung vom Genotyp 2 von *P. zopfii* meist sogar signifikant höher sowohl gegenüber der von *P. zopfii* Genotyp 1 als auch der von *P. blaschkeae*.



**Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der quantitativen Erregerausscheidung mit der Milch.** Die weißen Notched-Boxen stellen die Ergebnisse der mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Viertel dar, die schwarzen Notched-Boxen die Werte der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel und die grauen Notched-Boxen repräsentieren die Werte der mit *P. blaschkeae* infizierten Euterviertel. KbE/ml = Koloniebildende Einheit pro Milliliter; \* = signifikanter Unterschied gegenüber der anderen zwei Erreger.

Wie bereits in Abbildung 12 ersichtlich waren teilweise im Milchsekret der mit *P. zopfii* Genotyp 1 und mit *P. blaschkeae* infizierten Euterviertel bei dem angewendeten Mikrotiterverfahren keine Kolonien mehr nachweisbar. Betrachtete man in diesen Fällen ergänzend die Ergebnisse des angereicherten Verdünnungsausstriches, so waren bei den mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Vierteln neun der insgesamt zehn Fälle bei dieser Methode letztendlich doch positiv. Die bei beiden Methoden negativ befundete Milchprobe stammte von Tier 3 (mischinfiziert) am 20. Tag *post infectionem*.

Auch bei Infektion mit *P. blaschkeae* war bei insgesamt fünfzehn Untersuchungen kein Erregerwachstum durch die quantitative Mikrotitermethode nachweisbar. Der angereicherte Verdünnungsausstrich der Milchproben war in zehn der fünfzehn Fälle jedoch positiv. Die sowohl in der Mikrotitermethode als auch beim angereicherten Verdünnungsausstrich negativ befundeten Proben stammten alle von einem Tier (Tier 2, mischinfiziert) und den Entnahmezeitpunkten 14., 16., 17., 19. und 20. Tag *p.i.*

#### 4.4.2 Erregerausscheidung mit dem Kot

Es wurden weder bei den direkten Verdünnungsausstrichen auf PIM-Agar noch bei den angereicherten Kotsuspensionen *Prototheca spec.* nachgewiesen.

#### 4.4.3 Kultureller Nachweis in Gewebeproben

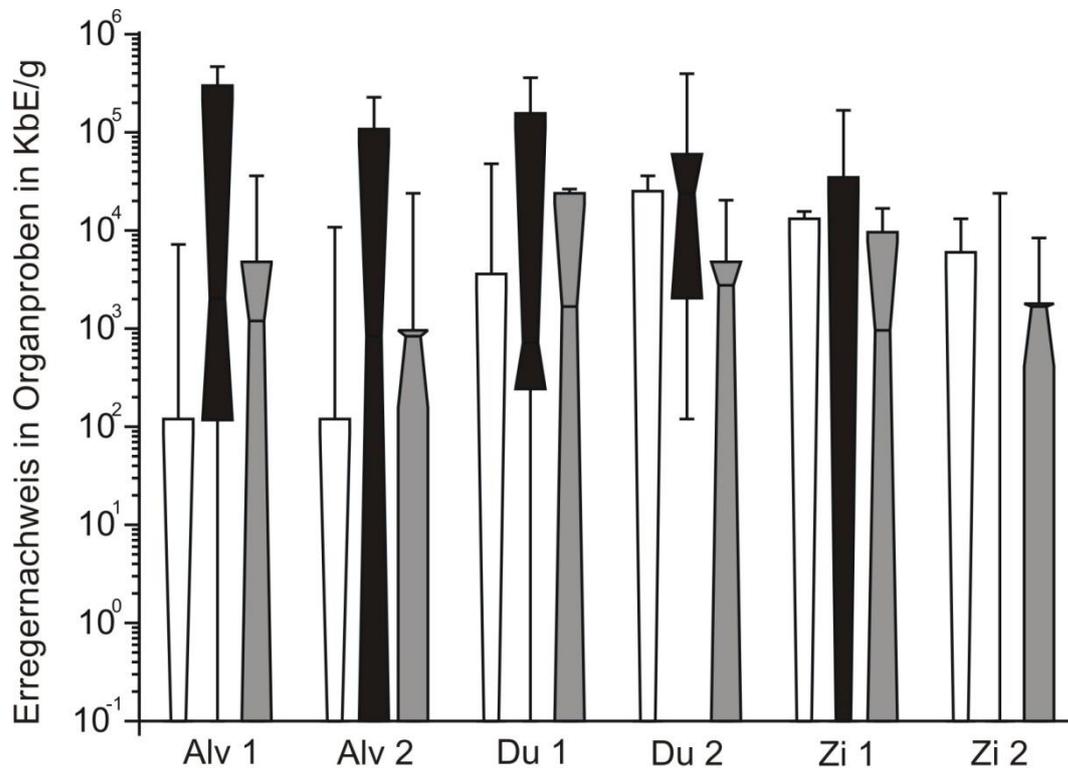
Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der an unterschiedlichen Stellen im Euterparenchym entnommenen Gewebeproben **qualitativ** miteinander, so fällt auf, dass lediglich bei den mit *P. blaschkeae* infizierten Eutervierteln negative Ergebnisse bei den angereicherten Proben auftraten (Tabelle 13). Bei den mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Vierteln betrug die Nachweisrate bei den direkt aus den Gewebehomogenisaten angefertigten Ausstrichen stets 40%, und bei den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln 60%. Die Nachweisraten bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln variierten beim direkten Ausstrich stärker und bewegten sich zwischen 20 und 100%.

**Tabelle 13: Nachweisraten der Erreger in den beprobten Euterabschnitten bei den unterschiedlichen mikrobiologischen Anzuchtverfahren.** Alv 1/2 = Alveolarbereich, Lokalisation 1/2; Du 1/2 = große Milchgänge, Lokalisation 1/2; Zi 1/2 = Drüsenzisterne, Lokalisation 1/2.

	<i>P. zopfii</i> Genotyp 1		<i>P. zopfii</i> Genotyp 2		<i>P. blaschkeae</i>	
	direkt	ange-reichert	direkt	ange-reichert	direkt	ange-reichert
<b>Alv 1</b>	40%	100%	80%	100%	60%	80%
<b>Alv 2</b>	40%	100%	60%	100%	60%	80%
<b>Du 1</b>	40%	100%	80%	100%	60%	80%
<b>Du 2</b>	40%	100%	100%	100%	60%	100%
<b>Zi 1</b>	40%	100%	40%	100%	60%	80%
<b>Zi 2</b>	40%	100%	20%	100%	60%	80%

Betrachtet man die Besiedlung der einzelnen Parenchymabschnitte untereinander **quantitativ**, so konnten weder zwischen den einzelnen Lokalisationen, noch beim Vergleich der mit den unterschiedlichen Spezies beziehungsweise Typen von *Prototheca* infizierten Viertel miteinander signifikante Unterschiede ausgemacht werden (siehe Abbildung 13).

Bei keinem der Kontrollviertel konnten mittels der verwendeten mikrobiologischen Untersuchungsmethoden Erreger nachgewiesen werden.



**Abbildung 13: Quantitativer Erregernachweis in den verschiedenen Euterabschnitten.** Die weißen Notched-Boxen stellen die Ergebnisse der mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Eutervierteln dar, die schwarzen Notched-Boxen die Werte der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln und die grauen Notched-Boxen repräsentieren die Besiedlung der Euterabschnitte mit *P. blaschkeae*. Alv 1/2 = Alveolarbereich, Lokalisation 1/2; Du 1/2 = große Milchgänge, Lokalisation 1/2; Zi 1/2 = Drüsenzisterne, Lokalisation 1/2. KbE/g = Koloniebildende Einheiten pro Gramm.

In den Euterlymphknoten wurden regelmäßig Prototheken sowohl im direkten Ausstrich als auch nach 48-stündiger Anreicherung nachgewiesen: Die Probe einer der zwei rechten Euterlymphknoten bei Tier 1 und des linken Euterlymphknotens bei Tier 4 (mischinfiziert) war bei beiden Anzuchtmethoden positiv. Bei Tier 5, welchem kontralateral *P. zopfii* Genotyp 2 instilliert worden war, wurden ebenfalls sowohl in der quantitativen Untersuchung als auch nach Anreicherung in beiden rechten und in einem der zwei linken Euterlymphknoten Prototheken gefunden.

Bei vielen Parenchymproben konnte erst nach Anreicherung in Sabouraud 2% Glucose-Bouillon eine Besiedlung nachgewiesen werden: Bei Tier 1 in beiden linken und in einem Euterlymphknoten der rechten Seite, in Milz, Muskel, der linken Niere und beidseits in den Iliofemorallymphknoten. Der linke Euterlymphknoten war bei Tier 2 (mischinfiziert) positiv, und bei Tier 3 (mischinfiziert) war einer der beiden linken und beide *Lymphonodi mammarii* der rechten Seite mit Prototheken kolonisiert. Der im Strichkanal des vorderen linken Euterviertels von Tier 4 (mischinfiziert) entnommene Tupfer und die Gewebeprobe des linken Kniefaltenlymphknotens führten in Bouillon angereichert ebenfalls zu Koloniewachstum. Die in der direkten quantitativen Untersuchung negativ befundene

Gewebeprobe des Euterlymphknotens der linken Seite von Tier 5 (monoinfiziert mit *P. zopfii* Genotyp 2) zeigte nach Anreicherung doch gutes Wachstum der Erreger und wurde zusammen mit den Proben des vorderen linken und hinteren rechten Strichkanals positiv befundet. Weiterhin konnten Kolonien sowohl bei der ausgestrichenen als auch bei der ausgespatelten angereicherten Probe des linken Iliofemorallymphknotens bei Tier 5 beobachtet werden. Tier 6 (monoinfiziert mit *P. zopfii* Genotyp 1) wies bei der direkten Mikrotitermethode keinerlei positive Proben außerhalb des Euters auf, nach Anreicherung zeigten jedoch die Lymphknoten beider Euterhälften und der Strichkanal des vorderen linken Viertels eine Kolonisation mit Prototheken. Einzig bei Tier 7, welches zuvor mit *P. blaschkeae* infiziert worden war, konnten weder in den Euterlymphknoten noch in den extramammären untersuchten Geweben Erreger gefunden werden.

Lediglich eine Gewebeprobe außerhalb des Euters führte sowohl in der quantitativen als auch in der angereicherten Methode zu Koloniewachstum: der rechte Iliofemorallymphknoten von Tier 5.

#### 4.4.4 Genotypisierung der Reisolat mittels Realtime PCR

Die Ergebnisse aller aus den Reisolaten gewonnenen und mittels der qualitativen Realtime PCR analysierten DNA-Präparationen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Bei der Analyse der Kolonien, die aus den Parenchymproben der einzelnen Euterviertel stammten, wurde bei allen untersuchten Proben der entsprechende Infektionskeim identifiziert.

Bei den aus den Euterlymphknoten isolierten Prototheken handelte es sich in 8% der Fälle um *P. blaschkeae*, bei 25% der Fälle um *P. zopfii* Genotyp 1 und in über der Hälfte der Fälle um *P. zopfii* Genotyp 2. Bei einem der mischinfizierten Tiere wurden in einem Euterlymphknoten sowohl *P. zopfii* Genotyp 2 als auch *P. blaschkeae* isoliert.

Außerhalb des Euters respektive der Euterlymphknoten wurden bei zwei Rindern Prototheken mikrobiologisch nachgewiesen, wobei es sich bei beiden Tieren um den Genotyp 2 von *P. zopfii* handelte. Bei dem mit allen drei Erregern infizierten Tier 4 wurde dieser Genotyp im linken Kniefaltenlymphknoten gefunden, und bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 2 monoinfizierten Tier 5 wurde er in den Proben der Iliofemorallymphknoten beidseits vorgefunden.

## Ergebnisse

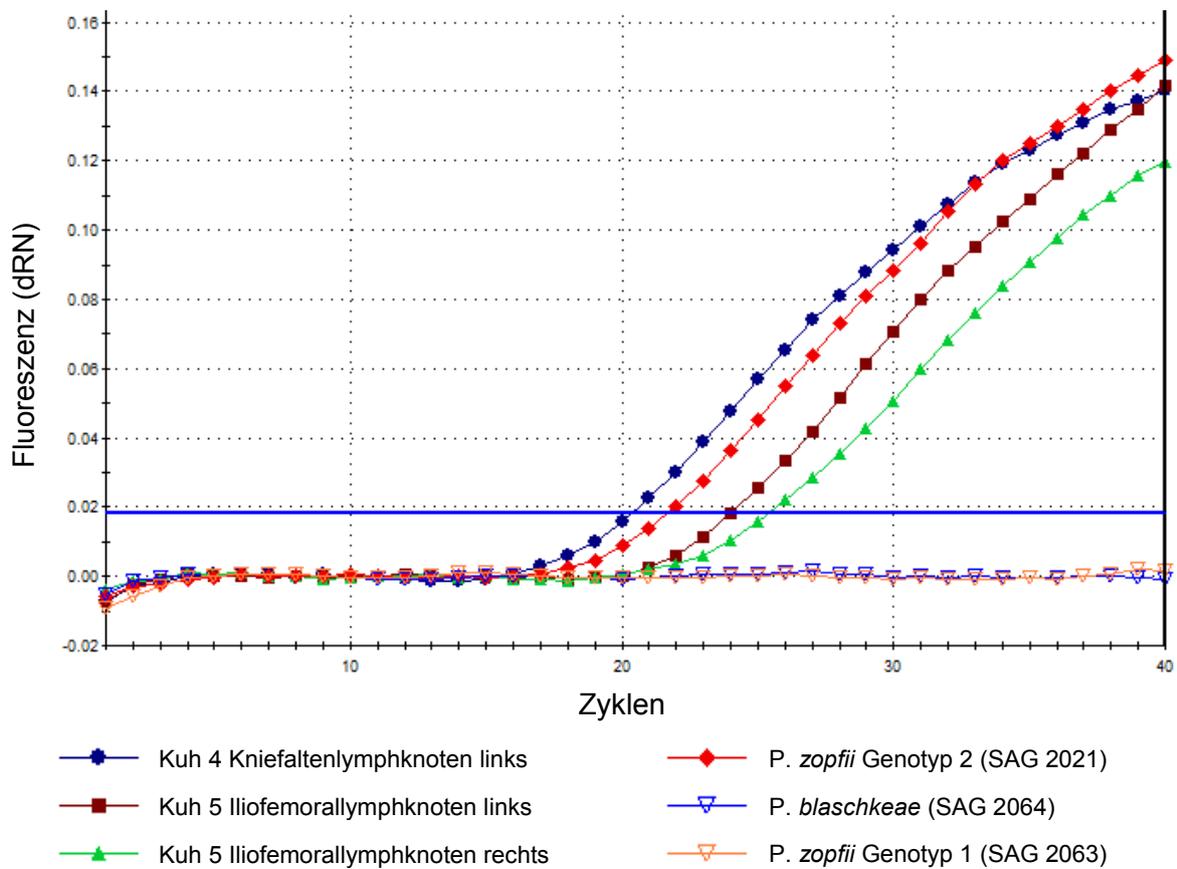
---

**Tabelle 14: Identifikation der aus den Gewebeproben gewonnenen Erreger mittels Realtime PCR.** VL = vorderes linkes Viertel; HL = hinteres linkes Viertel; HR = hinteres rechtes Viertel; VR = vorderes rechtes Viertel; St = Strichkanal; Ely = Euterlymphknoten; li = links; re = rechts; Ili = Iliofemorallymphknoten; Kn = Kniefaltenlymphknoten; GT 1 = *P. zopfii* Genotyp 1; GT 2 = *P. zopfii* Genotyp 2; *P. bl.* = *P. blaschkeae*.

	mischinfiziert			monoinfiziert		
	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6	Tier 7
<b>VL</b>	GT 1	<i>P. bl.</i>	GT 2	GT 2	GT 1	
<b>HL</b>		GT 2	<i>P. bl.</i>			<i>P. bl.</i>
<b>HR</b>	GT 2	GT 1		GT 2	GT 1	
<b>VR</b>	<i>P. bl.</i>		GT 1			<i>P. bl.</i>
<b>Ely 1 li</b>	GT 2	GT 1	GT 2	GT 2	GT 1	
<b>Ely 2 li</b>				GT 2		
<b>Ely 1 re</b>		GT 2		GT 2	GT 1	
<b>Ely 2 re</b>		<i>P. bl.</i> GT 2		GT 2		
<b>Ili li</b>				GT 2		
<b>Ili re</b>				GT 2		
<b>Kn li</b>			GT 2			

Die bei jeder Messung mitgeführten Positivkontrollen der drei Infektionserreger erbrachten stets das spezies- beziehungsweise genotypspezifische positive Ergebnis. Die Negativkontrollen zeigten hingegen stets einen negativen Befund.

## Ergebnisse



**Abbildung 14: Amplifikationskurven der drei außerhalb des Euters gefundenen Protothekenisolate mittels *P. zopfii* Genotyp 2-spezifischer Realtime PCR. dRn = delta normalized reporter; SAG = Stammsammlung für Algenkulturen Göttingen.**

### 4.5 Patho-/Histologische Untersuchungen

Bei der Sektion der Rindereuter wurden bei jedem der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel abnorme makroskopische Befunde erhoben. Die Schnittfläche stellte sich hier fein- bis grobhöckrig dar und war deutlich gelbbraun verfärbt (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Euterparenchym eines mit *P. zopfii* Genotyp 2 (links im Bild) und eines mit *P. blaschkeae* (rechts im Bild) infizierten Viertels.

Bei einem Tier (Tier 4, mischinfiziert) waren bereits makroskopisch einige Granulome im Gewebe der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel zu erkennen. Die mikroskopische Betrachtung der mit Hämalaun-Eosin gefärbten Präparate der einzelnen Euterabschnitte brachte deutliche Unterschiede hinsichtlich des Auftretens und der Ausprägung der durch die Erreger induzierten Mastitis zutage. Die Einteilung der Mastitiden nach pathologisch-anatomischen Gesichtspunkten erfolgte nach RENK (DAHME und WEISS 1999). Bei keinem der Tiere traten in einem mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Euterviertel Anzeichen einer Mastitis auf. Zur Ausbildung einer Mastitis pyogranulomatosa kam es in allen mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln und in drei von fünf Fällen bei Infektion mit *P. blaschkeae* (siehe Tabelle 15).

Das histologische Erscheinungsbild des Parenchyms der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Euterviertel war im Alveolarbereich dadurch gekennzeichnet, dass einzelne Alveolen, teils auch die Alveolen eines ganzen Läppchens, dilatiert waren. Die Alveolarlumina waren dabei oft massiv mit Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten gefüllt. In vielen Bereichen unterlagen die Alveolarepithelzellen einer vakuoligen Degeneration, die teilweise bis zur Abschilferung führte. Das Alveolarepithel war schwer geschädigt und in einigen Bereichen atrophisch, in anderen hyperplastisch. Im Interstitium waren regelmäßig lymphoplasmazelluläre Ansammlungen mit Beteiligung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zu verzeichnen. Neben den beschriebenen Zellansammlungen und -untergängen, und der Dilatation der Alveolen kam es in bestimmten Arealen auch zur interstitiellen Fibrosierung. Bei allen der so infizierten

Euterviertel waren auch Granulome mit Beteiligung von massenhaft neutrophilen Granulozyten ausgebildet. Diese Beobachtungen prägten somit das Bild einer Mastitis pyogranulomatosa. In den nekrotischen, zentralen Bereichen dieser Granulome waren neben Zelldetritus auch zahlreiche Prototheken zu finden. Die bei Tier 4 (mischinfiziert) bereits makroskopisch sichtbaren Granulome bestanden zentral ebenfalls aus Prototheken enthaltendem nekrotischen Parenchym. Hier war jedoch offensichtlich, dass teilweise lediglich Kapselbestandteile der Prototheken, aber auch völlig unbeschädigte Prototheken im zerstörten Gewebe anzutreffen waren. Diese nekrotischen Bereiche wurden durch massenhaft vorhandene Makrophagen, aber auch eosinophile und neutrophile Granulozyten und massiver Bindegewebszubildungen demarkiert. In seltenen Fällen wurden auch Riesenzellen vom Langhanstyp angetroffen.

Bei der histologischen Betrachtung des Euterparenchyms der mit *P. blaschkeae* infizierten Euterviertel stellte sich bei drei der insgesamt fünf Euterviertel das histologische Erscheinungsbild ähnlich wie bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln dar. Allerdings war die Ausprägung der Veränderungen im Allgemeinen nicht so stark.

Besonders auffällig bei der histologischen Untersuchung der Gewebeschnitte war weiterhin eine oft ausgeprägte Infiltration mit eosinophilen Granulozyten, bei der diese sowohl in den Alveolarlumina als auch im Interstitium lokalisiert waren.

Neben deren Ansammlung im Euter wurde auch eine teils hochgradige Infiltration der untersuchten Lymphknoten und der Milz mit dieser Zellpopulation festgestellt.

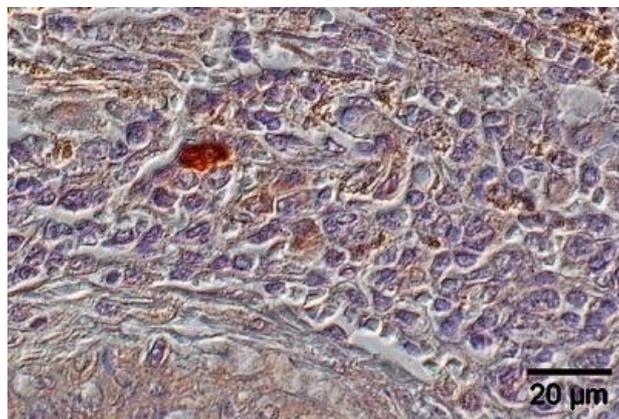
Des Weiteren wurden bei der mikroskopischen Untersuchung der H.-E.-gefärbten Präparate bei jedem Versuchstier in jedem Viertel auffällig viele Milchsteine vorgefunden.

## Ergebnisse

**Tabelle 15: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der mit Hämalaun-Eosin gefärbten Euterparenchymproben.** T = Tier; VL = vorderes linkes Euterviertel; HL = hinteres linkes Euterviertel; HR = hinteres rechtes Euterviertel; VR = vorderes rechtes Euterviertel; obB = ohne besonderen Befund, 1 = geringgradig; 2 = mittelgradig; 3 = hochgradig.

Infektionserreger	Viertel	Art der Mastitis (pathohistologisch)	Grad der Mastitis (pathohistologisch)	Eosinophilie
<b><i>P. zopfii</i> Genotyp 1</b>	T2 VL	obB	obB	obB
	T3 VR	obB	obB	obB
	T4 VR	obB	obB	obB
	T6 VL	obB	obB	1-2
	T6 HR	obB	obB	1
<b><i>P. zopfii</i> Genotyp 2</b>	T2 HR	pyogranulomatosa	2	3
	T3 HL	pyogranulomatosa	2	3
	T4 VL	pyogranulomatosa	3	3
	T5 VL	pyogranulomatosa	1-2	3
	T5 HR	pyogranulomatosa	1-2	3
<b><i>P. blaschkeae</i></b>	T2 VR	obB	obB	obB
	T3 VL	interstitialis	1	2
	T4 HL	pyogranulomatosa	3	3
	T7 VR	pyogranulomatosa	1-2	3
	T7 HL	pyogranulomatosa	1-2	3

Neben der Färbung mit Hämalaun-Eosin wurde bei jeder Parenchymprobe eine spezifische immunhistochemische Reaktion durchgeführt. In vielen Fällen waren dadurch strukturell vollständige Prototheken in verschiedenen Entwicklungsstufen eindeutig zu identifizieren, teilweise jedoch wurden Strukturen angefärbt, bei denen nur der Verdacht ausgesprochen werden konnte, es könne sich um Bestandteile, wie zum Beispiel die leeren Hüllen der Mutterzellen, der Grünalgen handeln.



**Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von *P. zopfii* Genotyp 2 in der Milz des monoinfizierten Tieres 1** (Foto: Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig).

Vergleicht man die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen der Euterlymphknoten und extramammären Gewebe mit denen der histologischen Untersuchung (in Tabelle 16 dargestellt) so fällt auf, dass es bei Tier 1 und 6 bei der mikrobiologischen Untersuchung in mehr Fällen zu einem Erregernachweis kam als bei der immunhistochemischen Reaktion. Bei Tier 1 handelte es sich dabei um die Proben des linken Euterlymphknotens, der linken Niere und der Muskulatur und bei Tier 6 um die Gewebeproben des rechten und linken Euterlymphknotens. Andererseits kam es auch bei der Immunhistochemie zur positiven Befundung verschiedener Parenchymproben, die mikrobiologisch keinen Erregernachweis hervorbrachten. Diese Proben sind in Tabelle 16 grau hinterlegt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Proben der Tiere 4 und 5 konnte man feststellen, dass neben den morphologisch gut abgrenzbaren Prototheken noch andere Strukturen auf diesen spezifischen Nachweis positiv reagierten. Bei näherer Betrachtung stellte sich heraus, dass es sich hierbei um Makrophagen handelte.

**Tabelle 16: Übersicht über den immunhistologischen Erregernachweis in den Gewebeproben (die hier nicht aufgeführten Gewebeproben wurden stets negativ befundet).** Ely = Euterlymphknoten; re = rechts; li = links; Kn = Kniefaltenlymphknoten; Ili = Iliofemorallymphknoten; Dosisf. = Tier des Dosisfindungsversuchs; misch. = mit allen drei Erregern infizierte Rinder; GT 2 = das mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierte Rind; GT 1 = das mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierte Rind; *P. bl.* = das mit *P. blaschkeae* infizierte Rind; verd. = verdächtige Strukturen; - = negativ; + = Prototheken positiv; M. = Makrophagen positiv. Bei den grau hinterlegten Feldern handelt es sich um immunhistochemisch positive Proben, die mikrobiologisch negativ befundet wurden.

	<b>Tier 1</b> (Dosisf.)	<b>Tier 2</b> (misch.)	<b>Tier 3</b> (misch.)	<b>Tier 4</b> (misch.)	<b>Tier 5</b> (GT 2)	<b>Tier 6</b> (GT 1)	<b>Tier 7</b> ( <i>P. bl.</i> )
<b>Ely re</b>	verd.	+	+	M.	M. +	-	-
<b>Ely li</b>	-	+	+	M.	M. +	-	verd.
<b>Kn</b>	-	+	+	M.	-	-	-
<b>Ili</b>	verd.	+	+	M. +	M. +	-	-
<b>Milz</b>	verd.	-	+	M. +	-	-	-

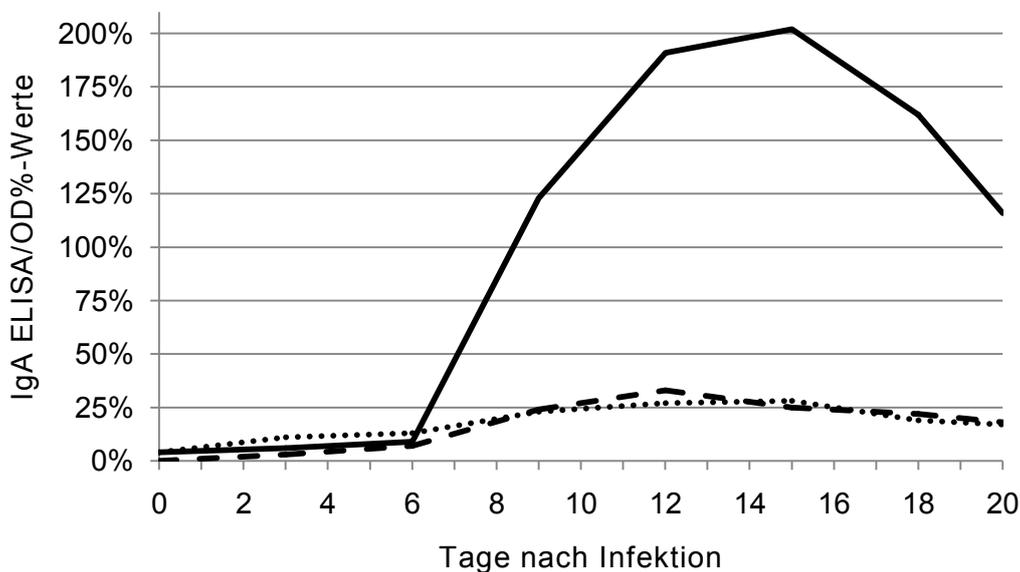
#### 4.6 ELISA

Bei den mischinfizierten Tieren wurde die Antikörperspiegelkinetik aus der Untersuchung der Milchseren der Infektionstage 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 20 ermittelt. Bei den monoinfizierten Tieren wurden die Milchseren der Infektionstage 7, 10 und 14 zusätzlich zu den oben genannten Versuchstagen mitgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.8.1 beschrieben, wurden die Milchseren der infizierten Viertel auf mit dem jeweiligen Infektionserreger gecoateten ELISA-Platten gemessen. Die Seren der Kontrollviertel der mischinfizierten Tiere wurden einmalig mit jedem der drei Erreger als Coating-Antigen untersucht. Bei den monoinfizierten Rindern

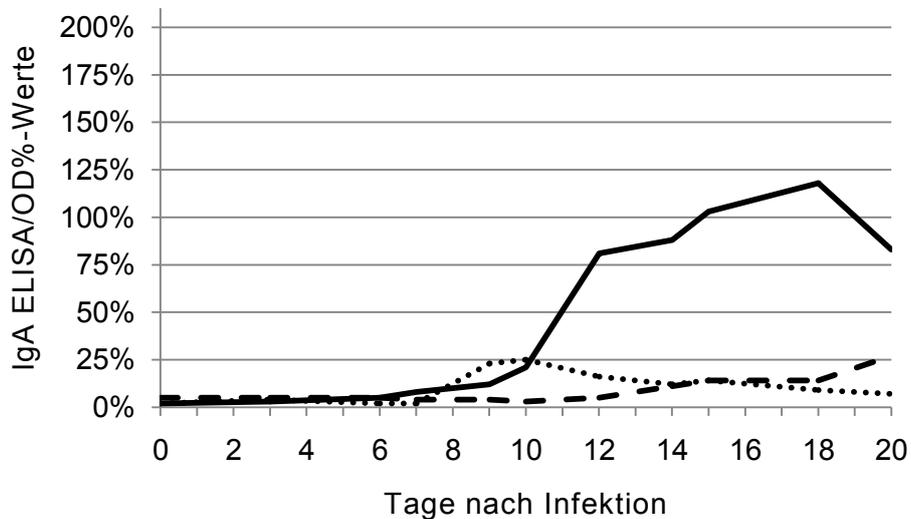
wurden beide Kontrollviertel gegen den verwendeten Infektionserreger im ELISA ausgewertet.

Die durch den ELISA-Reader gemessenen Extinktionswerte wurden durch die in Kapitel 3.8.2 angegebene Formel in Prozent (OD%) der auf den Platten mitgeführten Positivkontrollen umgerechnet.

Wie in den Abbildungen 17 und 18 deutlich zu sehen ist, war der Anti-*P. zopfii* Genotyp 2-IgA-Spiegel stets deutlich höher als der gegen die zwei anderen Erreger gerichtete IgA-Spiegel. Bei den mischinfizierten Tieren stiegen die IgA-Spiegel alle ab dem 6. Tag *p.i.* an, erreichten im Falle der gegen *P. zopfii* Genotyp 1 gerichteten Antikörper ihr Maximum am 12. Tag *p.i.*, im Falle der gegen *P. zopfii* Genotyp 2 gerichteten Antikörper am 15. Tag und der verhaltene Anstieg der Immunglobuline A gegen *P. blaschkeae* erreichte sein Maximum am 15. Tag *p.i.*. Bei den monoinfizierten Rindern stieg der gegen *P. zopfii* Genotyp 2 gerichtete IgA-Spiegel bis zum maximal 1,2-fachen Wert der Positivkontrolle an und sank nach Erreichen des Maximums am 18. Tag *p.i.* nur leicht wieder ab. Die Anti-*P. zopfii* Genotyp 1- und Anti-*P. blaschkeae*-IgA-Spiegel blieben bei den monoinfizierten Tieren stets auf einem niedrigen Niveau und waren in ihrem Verlauf uneinheitlicher ausgeprägt: die IgA-Spiegel des mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Tieres stiegen, mit leichten temporären Schwankungen, bis zum Ende des Versuchszeitraumes hin an, um am 20. Tag *p.i.* bei 27 OD% zu liegen. Die IgA-Spiegel des mit *P. blaschkeae* infizierten Rindes jedoch, erreichten ihr Maximum von 25 OD% bereits am 10. Tag *p.i.* und fielen bis zum Versuchsende hin auf 7 OD%.



**Abbildung 17:** Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der gleichzeitig mit allen drei Erregern infizierten Versuchstiere (Coating-Antigen = Infektionserreger). Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der drei OD%-Werte der Milchseren, die aus den mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Eutervierteln gewonnen wurden dar, die fortlaufende Linie diejenigen der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel und die gepunktete Linie repräsentiert das arithmetische Mittel der aus den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln gewonnenen Milchserumproben.

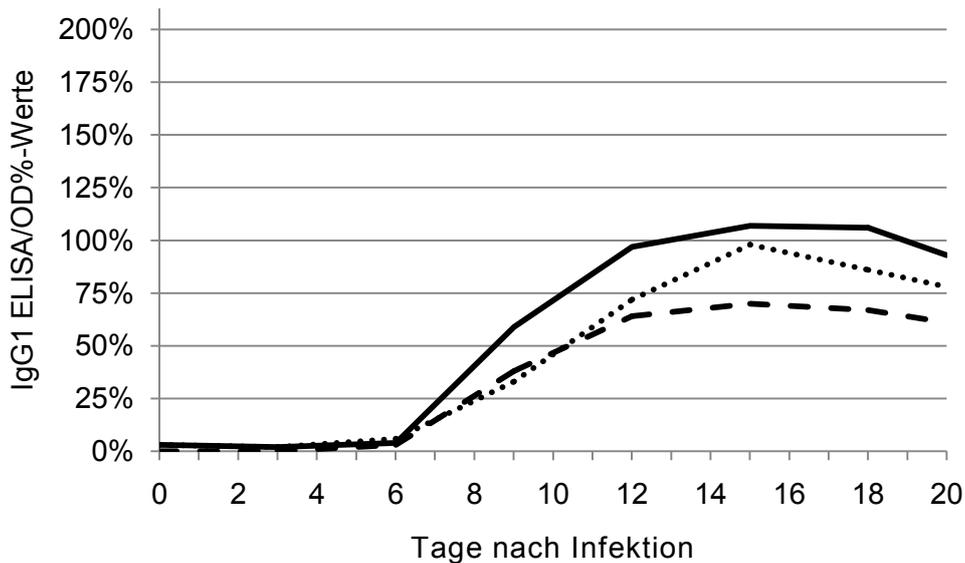


**Abbildung 18: Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere (Coating-Antigen = Infektionserreger).** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der zwei OD%-Werte der Milchseren, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Tier 6 gewonnen wurden dar, die fortlaufende Linie diejenigen, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Tier 5 ermolken wurden und die gepunktete Linie repräsentiert das arithmetische Mittel der aus den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln gewonnenen Milchserumproben von Tier 7.

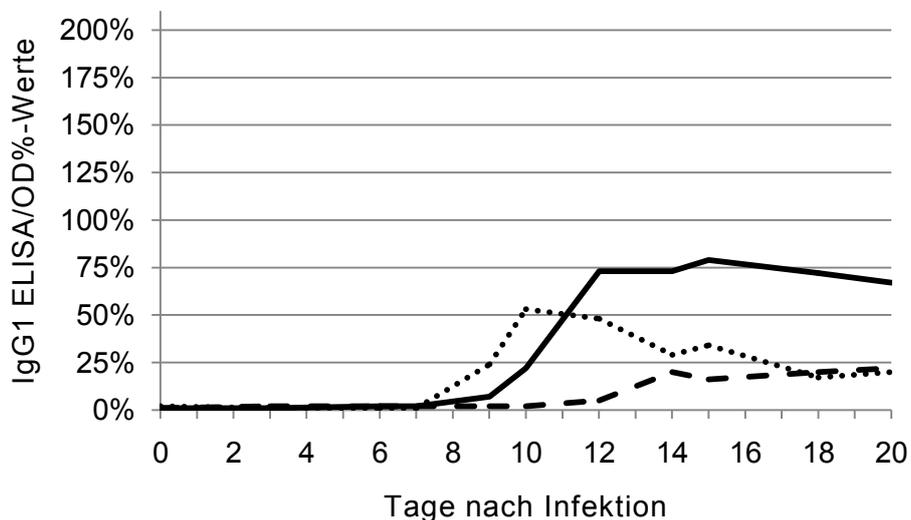
Die Unterschiede der IgG1-Spiegel bei der Gruppe der mischinfizierten Kühe waren bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei den in Abbildung 17 dargestellten IgA-Spiegeln, doch auch hier lagen die Mittelwerte der Anti-*P. zopfii* Genotyp 2 IgG1-Spiegel höher als die der zwei anderen Erreger und stiegen ebenfalls ab dem 6. Tag *p.i.* (Abbildung 19). Die Maxima der Verlaufskurven lagen hier in allen Fällen am 15. Tag *p.i.* vor. Der Höchstwert der gegen *P. blaschkeae* gerichteten IgG1 lag bei 98 OD% und war somit nur wenig niedriger als das ebenfalls am 15. Tag *p.i.* erreichte Maximum von 107 OD% der gegen *P. zopfii* Genotyp 2 gerichteten Immunglobulin G1-Fraktion. Die gegen *P. zopfii* Genotyp 1 gerichteten Immunglobuline der Subklasse G1 stiegen auf 70 OD% und lagen somit ebenfalls recht nah an den Maxima der zwei anderen Verläufe.

Auch bei Betrachtung der Ergebnisse der Milchseren der monoinfizierten Versuchstiere im Hinblick auf den IgG1-Antikörper-Spiegel war die immunologische Reaktion auf den Genotyp 2 von *P. zopfii* stärker ausgeprägt als gegen die zwei anderen Erreger (Abbildung 20). Die IgG1-Werte im Milchserum lagen jedoch, anders als bei den IgA-Werten dieser Infektionsgruppe, nie höher als bei den entsprechenden Positivkontrollen. Die gegen die jeweiligen Erreger gerichteten Immunglobuline G1 erreichten ihre Maximalspiegel beinahe zu den gleichen Zeitpunkten des Versuchs wie die Immunglobulin A-Gehalte. Die Maximalwerte der einzelnen erregerspezifischen Antikörper lagen im Falle von *P. zopfii* Genotyp 1 bei 22 OD%, bei *P. zopfii* Genotyp 2 bei 79 OD% und bei den gegen *P. blaschkeae* gerichteten Immunglobulinen G1 bei 53 OD%.

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der gleichzeitig mit allen drei Erregern infizierten Versuchstiere (Coating-Antigen = Infektionserreger).** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der drei OD%-Werte der Milchseren, die aus den mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Eutervierteln gewonnen wurden dar, die fortlaufende Linie diejenigen der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel und die gepunktete Linie repräsentiert das arithmetische Mittel der aus den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln gewonnenen Milchserumproben.



**Abbildung 20: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere (Coating-Antigen = Infektionserreger).** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der zwei OD%-Werte der Milchseren, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Tier 6 gewonnen wurden dar, die fortlaufende Linie diejenigen, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Tier 5 ermolken wurden und die gepunktete Linie repräsentiert das arithmetische Mittel der aus den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln gewonnenen Milchserumproben von Tier 7.

Bei Bestimmung der Höhe der erregerspezifischen IgA-Spiegel im Milchserum der Kontrollviertel der mischinfizierten Tiere waren die höchsten gemittelten OD%-Werte am Tag 12 *p.i.* zu verzeichnen (siehe Anhang Abbildung 21). Zu beachten ist hierbei, dass die gegen *P. zopfii* Genotyp 1 spezifischen Antikörper mit 41 OD% zu diesem Zeitpunkt den höchsten Wert aufwiesen, und dass in den Kontrollvierteln, welche mikrobiologisch stets als nicht infiziert diagnostiziert wurden, der IgA-Antikörperspiegel gegen diesen spezifischen Erreger somit höher lag als in den infizierten Vierteln selbst. Die Untersuchung der Kinetik der IgA-Spiegel im Milchserum der Kontrollviertel der monoinfizierten Versuchstiere zeigte, dass der Immunglobulin A-Gehalt des mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Tieres sehr niedrig war und über den gesamten Versuchszeitraum zwischen 3 und 5 OD% schwankte (siehe Anhang Abbildung 22). Die IgA-Spiegel der mit *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae* infizierten Rinder erreichten Maxima von 23 respektive 24 OD%.

Anders stellten sich die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Milch der Kontrollviertel der mischinfizierten Tiere auf IgG1 dar (siehe Anhang Abbildung 23): Ab dem 3. Tag *p.i.* stieg der Gehalt der spezifischen IgG1 kontinuierlich an, um bei allen drei Verläufen dann am 15. Tag *p.i.* ihr Maximum zu erreichen. Bei den gegen *P. zopfii* Genotyp 1 gerichteten Antikörpern lag dieses bei 70 OD%. In diesem Bereich bewegte sich auch der Maximal-Spiegel der gegen *P. zopfii* Genotyp 2 gerichteten Antikörper (74 OD%) und derjenige der Antikörper, die spezifisch gegen *P. blaschkeae* gerichtet waren (87 OD%). Nach dem 15. Tag *p.i.* sanken die Antikörpergehalte im Milchserum alle mit der beinahe gleichen Steigung ab. Bei den monoinfizierten Tieren schwankten die IgG1-Werte bis zum 6. Tag *p.i.* alle zwischen 1 und 3 OD% und stiegen dann alle unterschiedlich an (siehe Anhang Abbildung 24). Die Sera der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel zeigten im Verlauf zwei beinahe gleich hohe Maxima (12. Tag *p.i.*: 67 OD% und 15. Tag *p.i.*: 69 OD%). Die Anti-*P. blaschkeae*-IgA-Gehalte wiesen einen Höchstwert von 40 OD% am 10. Tag *p.i.* auf und schwankten anschließend bis zum Versuchsende zwischen 22 und 38 OD%. Die gegen *P. zopfii* Genotyp 1 gerichteten Antikörper erhöhten sich über den gesamten Versuchszeitraum zwar nur minimal, aber stetig und lagen zu Versuchsende bei 12 OD%.

## 5 Diskussion

Der Anteil der Mastitiden, die durch die Grünalpengattung *Prototheca* hervorgerufen werden, ist gegenüber der durch grampositiven und gramnegativen Bakterien induzierten Mastitiden zwar recht gering, die Prävalenz auf Herdenebene kann jedoch sehr hoch sein und führt dadurch bei den betroffenen Betrieben zu großen wirtschaftlichen Verlusten.

Die taxonomische Einordnung der Spezies *Prototheca zopfii* war in den letzten Jahren großen Veränderungen unterworfen und aus den von BLASCHKE-HELLMESSEN et al. (1985a) benannten drei Varianten von *P. zopfii* sind im Jahre 2006 durch molekularbiologische Methoden *P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae* hervorgegangen (ROESLER et al. 2006). Nachdem als Erreger der Protothekenmastitis über Jahrzehnte *P. zopfii* genannt wurde, verlangte die taxonomische Neuordnung nach einer genaueren Untersuchung hinsichtlich des ätiologischen Agens der Protothekenmastitis des Rindes. Die Tatsache, dass bei der Untersuchung von Mastitisisolaten nahezu ausschließlich der Genotyp 2 von *P. zopfii* isoliert wurde, führte zur Hypothese, dass im Sinne der Henle-Koch'schen-Postulate dieser Genotyp der Erreger der bovinen Protothekenmastitis sei. Zu dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vivo* Mastitis-Infektionsmodell etabliert. Um differenziertere Kenntnisse hinsichtlich eventuell vorhandener Unterschiede der Virulenz der drei Erreger zu erlangen, wurden die Reaktionen auf die intramammäre Infektion klinisch, mikrobiologisch und pathohistologisch beurteilt.

### 5.1 Etablierung eines Mastitis-Infektionsmodells

Modellhafte Untersuchungen zu pathogenetischen Fragestellungen und Erfolgsaussichten therapeutischer Ansätze bei der Protothekeninfektion des Rindes wurden schon mehrmals durchgeführt. Auffallend dabei waren die stark divergierenden Bedingungen der bisher unternommenen experimentellen intramammären Infektionen. Bei allen bisher an Rindern durchgeführten experimentellen Infektionen wurden lediglich ein oder zwei Tiere infiziert, wobei als Erreger meist *P. zopfii*, in einem Fall *P. moriformis* und in zwei Fällen taxonomisch nicht weiter identifizierte *Prototheca*-Isolate aus Rindermastitiden verwendet wurden. Die Infektionsdosis variierte bei den einzelnen Versuchen erheblich und wurde von der Hälfte der Autoren gar nicht bestimmt. In dieser Arbeit wurde deshalb zunächst bei einem Versuchstier ein Dosisfindungsversuch durchgeführt. Dieser diente zur Eruiierung zweier Fragestellungen:

1. Handelt es sich bei dem Erreger der klinischen Protothekenmastitis des Rindes um einen obligat pathogenen Erreger, der unabhängig von der Abwehrlage des befallenen Individuums eine Infektion hervorruft, oder ist der Erreger vielmehr fakultativ pathogen, also ein Opportunist?

### 2. Wie hoch muss die Infektionsdosis gewählt werden, um eine klinische Protothekenmastitis zu induzieren?

Nachdem beim ersten Versuchstier auch ohne Einsatz immunsuppressiver Medikamente sowohl bei der Dosis von  $1 \times 10^8$  KbE als auch bei der Dosis von  $1 \times 10^6$  KbE eine über den gesamten Versuchszeitraum persistierende klinische Mastitis hervorgerufen werden konnte, wurde die niedrigere der zwei Infektionsdosen für die darauffolgenden Infektionsversuche festgelegt.

Die Allgemein- und Eutergesundheit der Versuchstiere wurde zum größten Teil bei den bereits durch andere Autoren durchgeführten Infektionsversuchen nicht beachtet. Eine unterschiedliche systemische wie lokale Ausgangssituation der Abwehrbereitschaft könnte zu mangelnder Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen und so wurden im hier verwendeten Modell nur allgemein- und eutergesunde Rinder ähnlichen Alters, ähnlicher Laktationsleistung und mit einer ähnlichen Anzahl an Laktationen eingesetzt.

Bereits im Herkunftsbetrieb wurde die Milch der Tiere auf das Vorhandensein von Mastitiserregern mikrobiologisch untersucht. An diese Untersuchung schloss sich direkt nach Überführung in den Infektionsstall und einen Tag vor geplanter experimenteller Infektion nochmals eine mikrobiologische Untersuchung der Milch auf Columbia-Agar mit Blut und auf Sabouraud-Agar an, um eine Keimbesiedlung des Euters sicher ausschließen zu können. Um sicher zu stellen, dass es sich auch während des Versuchszeitraums stets um eine *Prototheca*-Reininfektion handelte, wurde von jedem Viertel zweimal pro Woche eine Milchprobe auf Columbia-Agar mit Blut untersucht.

Die Anzahl somatischer Zellen in der Milch ist unter Praxisbedingungen ein wichtiger Indikator für die Eutergesundheit und ein geeigneter Indikator zur Feststellung von Entzündungsvorgängen in der Milchdrüse (DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT 2002). Bei der Auswahl der Tiere wurde demnach darauf geachtet, dass das Sekret eines jeden Viertels zu Versuchsbeginn weniger als 200.000 Zellen pro Milliliter aufwies.

SCHIEFER und GEDEK (1968) infizierten bereits 1966 ein Versuchstier mit *P. zopfii* und ein weiteres mit einem von ihnen als *P. moriformis* identifizierten Isolat aus einer Rindermastitis. Die von ihnen beobachtete ungleiche Pathogenität der zwei Erreger könnte jedoch auch auf interindividuelle Unterschiede zurückgeführt werden. Um diesen Zusammenhang ausschließen zu können wurden beim vorliegenden Versuch drei Rinder mit allen drei Erregern (*P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae*), jeder in einem anderen Viertel, infiziert. Drei weitere Tiere wurden, um die spezifischen systemischen Auswirkungen der experimentellen Infektionen beurteilen zu können, mit jeweils nur einem Erreger infiziert.

Dass die bovinen Euterviertel als räumlich getrennte Kompartimente zu werten sind, wurde durch das Füllen von Eutervierteln mit verschiedenen gefärbten Injektionsmassen an Euterpräparaten belegt (NICKEL et al. 1996). Allerdings sind

die Bauch- und Schenkelviertel anatomisch nicht identisch aufgebaut. Der Verlauf der großen Milchgänge unterscheidet sich beispielsweise beträchtlich und je nach Euterform sind beachtliche Unterschiede in der Verteilung des Drüsengewebes und daraus resultierende Differenzen in der Milchleistung vorzufinden. Die Ergebnisse einiger Studien deuteten darauf hin, dass bei Schenkelvierteln häufiger eine Mastitis auftritt als bei Bauchvierteln. Andere Autoren wiederum bemerkten keine Unterschiede hinsichtlich der Mastitis-Inzidenz zwischen Vorder- und Hintervierteln (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1971). Um von diesen Tatsachen abhängige Effekte zu verhindern, wurde bei den mischinfizierten Tieren die Belegung der einzelnen Viertel alterniert (siehe Tabelle 6 Kapitel 3.4.2).

Das in dieser Arbeit etablierte Infektionsmodell bietet die Möglichkeit für diverse Modifikationen. So könnten Tiere in unterschiedlichen Laktationsstadien, verschiedener Rasse oder einer unterschiedlichen Anzahl durchlaufener Laktationen eingesetzt und miteinander verglichen werden. Des Weiteren besteht die Option einer sequenziellen Infektion innerhalb eines Individuums um verschiedene Phasen der Infektion vergleichend betrachten zu können. Bei diesen Überlegungen ist jedoch zu berücksichtigen, dass *In-vitro*-Methoden zwar oft nicht in der Lage sind Versuche an Tieren zu ersetzen, dass aber in jedem individuellen Fall die Notwendigkeit zur Durchführung eines Tierversuchs gewissenhaft hinterfragt werden muss.

### 5.2 Klinische Betrachtung

Stellt man die in der Literatur beschriebenen Ausführungen über das klinische Erscheinungsbild der klinischen Protothekenmastitis den Ergebnissen der in diesem Versuch erhobenen klinischen Parametern gegenüber, so kann gesagt werden, dass es lediglich bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Eutervierteln zur Ausprägung der typischen Anzeichen einer klinischen Protothekenmastitis kam. Bei der Adspektion und Palpation des Euters konnte nur bei diesen Vierteln das charakteristische pralle Aussehen und die derbe Konsistenz des Parenchyms beobachtet werden. Die einzig von SCHÖNBORN und SEFFNER (1977) geschilderten fokalen Verhärtungen infizierter Euterviertel wurden bei den durchgeführten Infektionsversuchen nie vorgefunden. Die Derbheit des Parenchyms bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 experimentell infizierten Vierteln war stets gleichmäßig stark und als diffuses Geschehen ausgebildet. Der Vorteil einer kontrollierten Infektion liegt unter anderem darin, dass der Zustand eines Organs zu Versuchsbeginn genauestens erhoben werden kann, sodass Veränderungen unter Einbeziehung aller einflussnehmenden Faktoren als Resultat einer Erreger-Wirt-Interaktion gewertet werden können. So wäre es denkbar, dass die von SCHÖNBORN und SEFFNER (1977) palpieren fokalen Verhärtungen ebenso als grobknotige chronische Veränderungen aus einer bereits vor der experimentellen Infektion durchlaufenen bakteriellen Mastitis resultierten.

Will man den durch den Genotyp 2 von *P. zopfii* bei den Versuchstieren ausgelösten klinischen Mastitiden Schweregrade zuordnen (DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT 2002), so wird ein weiteres typisches Charakteristikum der Protothekenmastitis offensichtlich: Bei der klassischen Einteilung in eine *geringgradige* (Vorliegen von Flocken in der Milch, insbesondere im Vorgemelk, ohne zusätzliche klinische Symptome des Euters) oder eine *mittel-* bis *hochgradige* (Ausprägung offensichtlicher Entzündungssymptome des Euters wie erhöhte Temperatur, Schmerzen und Schwellung; die Milch ist makroskopisch verändert und die Tiere zeigen häufig Fieber) Mastitis, entspricht das beobachtete Bild eher einer mittel- bis hochgradigen Form, ohne dass dabei die traditionellen Entzündungszeichen „Rötung“, „Überwärmung“ und „Schmerz“ entwickelt waren. Das Entzündungszeichen „Schwellung“ war bei den betroffenen Vierteln eindrücklich ausgeprägt und der besonders dramatische Rückgang der Milchleistung bei Tier 5 (monoinfiziert mit *P. zopfii* Genotyp 2) entspricht demnach dem Zeichen der „eingeschränkten Funktion“.

Die Ergebnisse der klinischen Betrachtung eines mischinfizierten Tieres jedoch unterschieden sich bedeutend von denen der anderen Versuchstiere und auch von den bisher in der Literatur beschriebenen Fällen: Von dem mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel sich über die gesamte Euterhälfte ausbreitend, traten zusätzlich zur Schwellung und zum Funktionsverlust die eigentlich für eine bakteriell bedingte schwerwiegende Mastitis typischen Anzeichen der Rötung, vermehrten Wärme und Schmerzhaftigkeit auf. Die bei Protothekenmastitiden selten auftretende Schmerzhaftigkeit wurde bereits bei anderen Autoren beschrieben (WENDT et al. 1994), die vorgefundene starke Rötung und Wärme nicht. Eine mögliche Erklärung für die stärkere Ausprägung der Entzündungszeichen bei diesem Tier wäre eine zusätzliche Besiedlung der Milchdrüse mit einem anderen Keim. Diese Hypothese konnte jedoch aufgrund der durchgeführten Kultur der Milchproben auf Blutagar verworfen werden. Betrachtet man das bei einer Mastitis auftretende Infektionsgeschehen und das daraus resultierende Krankheitsbild nicht nur von Seiten des eindringenden Mikroorganismus aus, sondern berücksichtigt, dass es bei Infektionen immer zu Erreger-Wirt-Interaktionen kommt, so wird klar, dass auch die immunologischen Reaktionen des Wirtes das klinische Bild modulieren. In diesem Fall war es also von besonderem Interesse die Ergebnisse der Untersuchungen mit denen der Versuchstiere, die diese Form der klinischen Ausprägung nicht gezeigt hatten, zu vergleichen. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Milch offenbarte hier keinerlei Unterschiede zu den anderen mit allen drei Erregern infizierten Versuchstieren und so konnte abschließend nicht geklärt werden warum es gerade bei diesem Individuum zu einer derartigen Abweichung gekommen war.

### 5.3 Milchuntersuchung

Die Beschreibung der Ergebnisse der sensorischen Untersuchung von Milchsekret, welches aus mit Prototheken besiedelten Eutervierteln gewonnen wurde, differiert in der Literatur erheblich. Teils wird lediglich von Flocken in normalem Milchsekret

gesprochen (SPALTON 1985), teilweise wird die Beschaffenheit des Milchsekrets aber auch als „quarkähnlich“ beschrieben (SEFFNER 1994). Unabhängig vom ins Euter instillierten Infektionserreger kam es im Rahmen dieser Arbeit zu adspektorischen Abweichungen der Milch vom Normalbefund. Bei Infektion mit *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae* blieb der Milchcharakter des Sekrets immer erhalten, zu manchen Zeitpunkten jedoch waren Flocken vorzufinden. Die Veränderungen beim Milchsekret der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel waren jedoch insgesamt drastischer (der Milchcharakter war zeitweise völlig aufgehoben und das ermolzene Sekret glich Molke) und sehr viel häufiger. Eine quarkähnliche Beschaffenheit konnte jedoch kein einziges Mal beobachtet werden. Da die zeitweise enormen Milchsekretveränderungen eine konsequente Bestimmung der absoluten Zellzahl (beispielsweise mittels Fossomatic®) unmöglich machte, erfolgte eine semiquantitative Erhebung der Zellzahl mittels California-Mastitis-Test. Diese zeigte allgemein, dass die somatische Zellzahl am ersten Tag nach Infektion, unabhängig vom Infektionserreger, deutlich anstieg. Danach sank diese in der Milch der mit *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae* infizierten Viertel wieder, während sie bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel zwar immer leicht schwankte, aber insgesamt sehr hoch blieb. Die Wirkungsweise des beim California-Mastitis-Tests eingesetzten Alkyl-Aryl-Sulfonats ist abschließend noch immer nicht geklärt. Die am weitesten verbreitete Meinung ist jedoch, dass nach Zerstörung der Zellmembran der somatischen Zellen in der Milch durch das Detergens, das Reagenz mit der DNA der vorhandenen Zellen einen in Gelform sichtbaren Komplex bildet (CHRIST 1961; ROSENBERGER 1990). Um zu eruieren, ob die starke initiale Erhöhung der Ergebnisse des California-Mastitis-Tests ganz oder teilweise auf eine Wirkung zwischen den instillierten Prototheken und der Testreagenz basiert, wurde die Wirkung des Alkyl-Aryl-Sulfonats auf die Lebensfähigkeit der Prototheken getestet (die Ergebnisse dieser quantitativen Untersuchungen sind nicht dargestellt). Die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen bei verschieden konzentriertem Alkyl-Aryl-Sulfonat offenbarten, dass das Reagenz die Vitalität der Prototheken nicht negativ beeinflusste und somit wahrscheinlich eine tatsächliche semiquantitative Aussage über die in der Milch vorhandenen Zellen lieferte.

Waren die Werte des California-Mastitis-Tests der mit *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae* infizierten Viertel kurz nach Instillation derselben in das Euter erhöht, so zeigten die so infizierten Viertel zu keinem Zeitpunkt eine abnorme Erhöhung bei der elektrischen Leitfähigkeit des Milchsekrets. Die Leitfähigkeit der Milch der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel hingegen war vom 6. bis zum 19. Tag *post infectionem* über den Referenzbereich hinaus deutlich erhöht. Beinahe gleichverlaufend stellte sich der Chloridgehalt der Milch der einzelnen Viertel dar. Diese Beobachtung spiegelt die Tatsache wieder, dass die elektrische Leitfähigkeit zwar auch bei gesunden Rindern von exogenen (beispielsweise pH-Wert, Melkintervall und Fettgehalt) und endogenen (beispielsweise Laktationsstadium und Rasse) Faktoren abhängt, in erster Linie jedoch durch die in der Milch enthaltenen Elektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid sowie durch den Laktosegehalt beeinflusst wird (KRAFT und DÜRR 1999). Die Änderungen der

Ionenkonzentrationsverhältnisse werden bei Mastitiden durch Gewebeschädigungen und Permeabilitätsveränderungen innerhalb des Drüsenparenchyms hervorgerufen. Ergo weisen diese Veränderungen auf Störungen der Blut-Euter-Schranke hin, welche auch bei anderen Mastitiden oft erst einige Tage nach Infektion auftreten (KRÖMKER 2007). Die Tatsache dass lediglich bei den mit Genotyp 2 von *P. zopfii* infizierten Vierteln eine derart starke Erhöhung des Elektrolytgehalts der Milch und eine so ausgeprägte Störung der Blut-Milch-Schranke beobachtet wurde, weist einmal mehr auf den pathogenen Charakter dieses Erregers gegenüber der anderen zwei in der Studie verwendeten Erreger hin. Weiterhin sollte diese Gegebenheit auch in Hinblick auf Therapieversuche berücksichtigt werden, denn zusätzlich zur lokalen, intramammären Behandlung, ist es bei einem Niedergang der Blut-Milch-Schranke einfach systemisch zu therapieren.

### 5.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Bei der Untersuchung der Erregerausscheidung über die Milch zeigte sich bereits am ersten Tag *post infectionem*, dass es allen drei Erregern möglich ist, sich im Medium Milch zu vermehren. Die ursprünglich jeweils insgesamt  $1 \times 10^6$  eingebrachten Koloniebildenden Einheiten pro Euterviertel vermehrten sich in weniger als 24 Stunden auf durchschnittlich  $1 \times 10^3$  KbE pro Milliliter Milch (zwischen Instillation der Erreger in das Euter und erster Probenentnahme lag stets ein morgendlicher Melkakt). Allgemein kann gesagt werden, dass zwei Grundvoraussetzungen für eine Vermehrung im Eutersekret eine funktionierende Laktoseverwertung und die Fähigkeit von nahezu anaerobem Wachstum sind. Im Schrifttum fehlen bis dato Aussagen, ob Vertreter der Gattung *Prototheca* im Stande sind Laktose zu verwerten. D-Glucose und D-Galaktose als Grundbausteine der Laktose werden sowohl von den zwei Genotypen von *P. zopfii* als auch von *P. blaschkeae* assimiliert, allerdings mit unterschiedlicher Intensität (BLASCHKE-HELLMESSEN et al. 1985a). Glucose wird dabei von den beiden Genotypen von *P. zopfii* gleich gut und in höherem Ausmaß assimiliert als von *P. blaschkeae*. Galaktose hingegen wird am intensivsten von *P. zopfii* Genotyp 1 assimiliert, gefolgt von *P. blaschkeae* und am schwächsten und langsamsten von *P. zopfii* Genotyp 2. Anaerobe Bedingungen führen zwar zu geringerer Wachstumsintensität als aerobe, prinzipiell ist es allerdings möglich Prototheken im anaeroben Milieu zu kultivieren (eigene Beobachtungen).

Betrachtet man die Ausscheidung der Erreger über die Milch in ihrer Quantität, so war über einen längeren Zeitraum hinweg ersichtlich, dass bei den mit dem Genotyp 2 von *P. zopfii* infizierten Eutervierteln signifikant mehr Prototheken ausgeschieden wurden als beim anderen Genotyp beziehungsweise der anderen Spezies. Diese Tatsache kann einerseits ein Zeichen dafür sein, dass *P. zopfii* Genotyp 2 im Eutermilieu bessere Bedingungen vorfindet um sich zu vermehren als die anderen zwei Erreger. Andererseits könnte diese Sachlage auch dadurch erklärt werden, dass bei diesem Erreger die Fähigkeit an Strukturen im Euter zu adhären weniger gut ausgeprägt ist als bei *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae*. Diese

Fragestellung könnte möglicherweise durch Euterbiopsien im Versuchszeitraum beantwortet werden. Jedoch ist durch die Entnahme von Biopaten mit entzündlichen Veränderungen zu rechnen, die dann das wahre Bild der Protothekenmastitis verfälschen würden.

Waren die Ergebnisse der quantitativen Erregerausscheidung mit der Milch der unterschiedlich infizierten Euterviertel in den ersten Tagen nach Infektion je nach Infektionserreger noch recht einheitlich, so war, vor allem den Genotyp 1 von *P. zopfii* betreffend, die Ausscheidungsrate gegen Ende des Versuchs hin sehr heterogen. Nichtsdestotrotz muss vermerkt werden, dass es bei keinem der drei Erreger regelmäßig zu einer vollständigen Eliminierung der Prototheken aus den infizierten Vierteln kam. Eine Verlängerung des Versuchszeitraumes könnte diesbezüglich Antworten bringen.

Von mehreren Autoren wurden bereits Prototheken im Kot von Rindern nachgewiesen (ENDERS und WEBER 1993a). Auch der Kot der in dieser Studie experimentell infizierten Kühe wurde daher regelmäßig mikrobiologisch untersucht. Selbst nach Anreicherung und Ausbringen auf Selektivagar konnten in keiner einzigen untersuchten Probe Prototheken gefunden werden. Berücksichtigt man den Umstand, dass ausschließlich bei OSUMI et al. (2008) die aus den Kotproben isolierten Prototheken auf die neueste taxonomische Einteilung in *P. zopfii* Genotyp 1 und 2 und *P. blaschkeae* hin untersucht wurden, und dass in dieser Studie 18 von 19 Kotproben und beinahe alle anderen Umweltproben als *P. zopfii* Genotyp 1 identifiziert wurden, so könnte man mutmaßen, dass es bei hohem Erregerdruck in der Umwelt zu reaktionsloser Darmpassage der ubiquitären Prototheken kommt. Bei der in der vorliegenden Studie durchgeführten experimentellen Infektion wäre es als Zusatz durchaus sinnvoll gewesen die Umgebung der Tiere wie beispielsweise die Einstreu, das Tränkwasser und das Melkgeschirr ebenfalls regelmäßig auf eine Kontamination mit Prototheken hin zu untersuchen um dadurch eventuell ergänzende epidemiologische Hinweise zu erlangen. Das beobachtete ubiquitäre Vorkommen von *P. zopfii* Genotyp 1 in der Umgebung von Milchkühen und die gleichzeitig fast ausschließliche Isolierung von *P. zopfii* Genotyp 2 aus Mastitiden müssen in diesem Zusammenhang bereits als deutliches Indiz für eine erhöhte Pathogenität von *P. zopfii* Genotyp 2 angesehen werden.

Neben der mikrobiologischen Erhebung der Erregerausscheidung über die Milch und über den Kot der Versuchstiere wurden nach Euthanasie derselben auch zahlreiche Gewebeprobe kulturell untersucht. Einerseits wurden dadurch neue Erkenntnisse hinsichtlich eventueller Ausbreitung der Erreger innerhalb des Organismus erwartet, andererseits sollte die Besiedlung der einzelnen Euterabschnitte miteinander verglichen werden. Von den extramammär entnommenen Proben wurden bei Tier 1 weitaus mehr Proben mikrobiologisch positiv befundet als bei den anderen Versuchstieren. Diese Tatsache und der positive Befund der Muskelprobe sprachen in hohem Maße dafür, dass es bei der Sektion des ersten Tieres zu zahlreichen Kontaminationen gekommen war. Die Probenentnahme wurde daraufhin optimiert und die Ergebnisse dieses Tieres flossen nicht in die allgemeine Auswertung bezüglich der Gewebebesiedlung mit ein. Ob die Ergebnisse des quantitativen Erregernachweises in den verschiedenen

Euterabschnitten tatsächlich die Besiedlungsdichte widerspiegelt muss trotz optimaler Entnahmetechnik kritisch hinterfragt werden. Die Euthanasie der Tiere erfolgte zwar jeweils direkt im Anschluss an das morgendliche Melken, allerdings war es vor allem bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln nicht möglich, das Euterviertel vollständig auszumelken, sodass bei der Sektion stets noch Milch zwischen den einzelnen Drüsenabschnitten desselben Viertels fluktuierte.

### 5.5 Realtime PCR

Die in dieser Arbeit eingesetzte Multiplex-Realtime-PCR erwies sich als äußerst geeignet zur Bearbeitung größerer Probenmengen. Sie eröffnet die Möglichkeit, Genomfragmente mehrerer Pathogene gleichzeitig nachzuweisen und stellt somit eine spezifische und zeitsparende Alternative zu den ansonsten routinemäßig durchgeführten Assimilationstests dar.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Kulturen, die aus den Euterlymphknoten isoliert worden waren zeigten, dass alle drei Erreger über das subkutane Lymphgefäßnetz in die *Lymphonodi mammarii* gelangten. Allerdings wurde der Genotyp 2 von *P. zopfii* dort weitaus häufiger vorgefunden als *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae*. Über den Abfluss der Lymphe aus dem Euter herrscht in der Literatur nach wie vor Uneinigkeit. Einig ist man sich darüber, dass ein Teil der Lymphe zu den Euterlymphknoten fließt. Die in diesem Versuch erhobenen Beobachtungen bestätigen die Meinung von DYCE et al. (1991), dass das tributäre Gebiet der Euterlymphknoten nicht scharf abgegrenzt benannt werden kann, sondern dass ein Teil der Lymphe nacheinander durch zwei oder mehrere Lymphknoten fließt und dass die medialer gelegenen, tieferen Euterlymphknoten die Lymphe aus beiden Euterhälften sammeln. In fünf von sechs Fällen konnten bei den hier durchgeführten Infektionsversuchen die Infektionskeime in einem kontralateral gelegenen Euterlymphknoten gefunden werden.

In den *Lymphonodi iliofemorales* und den *Lymphonodi subiliaci* wurde ausschließlich der Genotyp 2 von *P. zopfii* nachgewiesen. Ob dies nun ein Hinweis darauf ist, dass lediglich dieser Erreger über weitere Strecken des Lymphgefäßsystems wandert beziehungsweise transportiert wird oder ob dies schlicht ebenfalls einem direkten Abfluss aus dem Euter entspricht, ist an dieser Stelle nicht zu klären. Von manchen Autoren wird sowohl von den *Lymphonodi subiliaci* (HOSPES und SEEH 2009) als auch von den *Lymphonodi iliofemorales* (KOCH und BERG 1993) behauptet, dass ein Teil ihres tributären Gebiets das Euter selbst ist. Neuere Untersuchungen zeigen, dass der Genotyp 2 von *P. zopfii* in ausgeprägterem Maße von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert wird, gleichzeitig jedoch schlechter durch die phagozytierenden Zellen inaktiviert wird als der Genotyp 1 von *P. zopfii* und *P. blaschkeae* (EIDNER et al. 2008). Dies könnte einerseits zur Ausbreitung des Genotyps 2 von *P. zopfii* beitragen und scheint außerdem ein Pathogenitätsfaktor dieses Erregers zu sein.

Vergleicht man die Ergebnisse der aus der Kultivierung der Gewebeproben gewonnenen und anschließend mittels Realtime PCR genotypisierten Kulturen mit

den in der immunhistochemischen Reaktion positiv befundeten Organproben (siehe Tabelle 16), so wurden durch die mikrobiologische Kultivierung weniger Proben als positiv befundet als beim immunhistochemischen Nachweis. Dies könnte einerseits darauf zurück zu führen sein, dass das bisher etablierte kulturelle Nachweisverfahren eine Sensitivität von unter 100 % aufweist, oder aber dadurch, dass bei der immunhistochemischen Reaktion lediglich Protothekenstrukturen angefärbt wurden und sich beispielsweise in den positiv befundeten Proben der Milz der Tiere 3 und 4 keine intakten, vermehrungsfähige Prototheken befanden sondern lediglich Teile von Prototheken. Ungeachtet dessen wäre es von großem Interesse, die bei der immunhistochemischen Reaktion positiv befundeten Gewebeschnitte zu entparaffinieren und einer qualitativen Realtime PCR zu unterziehen.

### 5.6 Histologische Untersuchungen

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Sektionen der Euter waren die makroskopischen Differenzen der Schnittflächen der unterschiedlich infizierten Viertel außerordentlich eindrucksvoll. Die Farbe und Oberfläche der Schnittfläche des Euterparenchyms der mit *P. zopfii* Genotyp 1, der mit *P. blaschkeae* infizierten Viertel und der Kontrollviertel war in keinem der Fälle pathologisch verändert. Die mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel hingegen zeigten über die gesamten Bereiche des Parenchyms hinweg stets die bereits in einigen wenigen Literaturstellen beschriebene graubraune Farbe (siehe Abbildung 15) (SEFFNER 1994). Die einzig bei MCDONALD et al. (1984b) beschriebene blassrosa-graue Verfärbung des Euterparenchyms bei einer an Protothekenmastitis erkrankten Kuh wurde bei keinem der hier untersuchten Euterviertel beobachtet. Auch die von FRANK et al. (1969) beschriebenen, bereits makroskopisch im Euterparenchym sichtbaren zystischen Taschen, die bis zu 2,5 cm Durchmesser aufwiesen, traten bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Tieren nicht auf. Das von FRANK et al. (1969) experimentell infizierte Tier, welches im Anschluss die eben beschriebenen Zysten im Euterparenchym aufwies, war jedoch zu Versuchszwecken zeitweise mit verschiedenen Antimykotika und Antibiotika behandelt worden, so dass die bei der histologischen Untersuchung gewonnenen Befunde wahrscheinlich nicht ausschließlich Resultate einer Protothekeninfektion des Euters waren.

Bisher in der Literatur beschriebene histologische Auswertungen von Protothekenmastitiden zeigten stets eine pyogranulomatöse Form der Mastitis. Bei der histologischen Untersuchung der Gewebeschnitte des Euters der sieben Versuchstiere der vorliegenden Arbeit zeigten sich im Vergleich der mit unterschiedlichen Erregern infizierten Vierteln untereinander ein überraschendes Bild: Die Ausprägung pyogranulomatöser Veränderungen wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 als auch bei den mit *P. blaschkeae* infizierten Eutervierteln vorgefunden, bei den mit *P. zopfii* Genotyp 1 hingegen nicht. Histologisch führten demnach beide Erreger zu vergleichbaren Befunden, das klinische Bild unterschied sich jedoch erheblich. Bei allen fünf mit

*P. zoppii* Genotyp 2 infizierten Viertel und bei drei der fünf mit *P. blaschkeae* infizierten Viertel ging die pyogranulomatöse Mastitis mit den auch bisher in der Literatur beschriebenen Befunden einher: Interstitielle Lymphozytenansammlungen, typisch geschichtete Granulome, dilatierte Alveolen, deren Wandauskleidung oftmals der Atrophie unterliegt und deren Lumen mit verschiedenen Zellpopulationen und Prototheken angefüllt sind (JENSEN et al. 1998; CORBELLINI et al. 2001a; CORBELLINI et al. 2001b). Auch das oft diskutierte und angezweifelte Phänomen der Phagozytose der Grünalgen durch Makrophagen konnte in der vorliegenden Arbeit vielfach beobachtet werden. Bei der spezifischen Darstellung von Prototheken durch immunhistochemische Nachweisverfahren färbten sich oftmals auch Makrophagen an. Dies spricht dafür, dass intakte Prototheken oder aber zumindest strukturelle Anteile der Prototheken durch diese Zellpopulation inkorporiert wurden. Allerdings konnte eine Phagozytose durch Makrophagen nur in den Eutervierteln, die mit *P. zoppii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae* infiziert worden waren, verzeichnet werden, bei *P. zoppii* Genotyp 1 hingegen nicht. Phagozytose von Prototheken durch neutrophile Granulozyten wurde im Widerspruch zu einigen in der Literatur beschriebenen Fällen jedoch nicht beobachtet (JENSEN et al. 1998). Vergleicht man ganz allgemein die mikroskopischen Befunde im Euterparenchym bei bakteriell bedingten Mastitiden mit denen der Protothekenmastitis, so offenbart sich schnell ein offensichtlicher Unterschied: Während sich zum Beispiel Streptokokken, Staphylokokken und coliforme Bakterien vorwiegend im milchführenden System des Euters vermehren und ihre Virulenz unter anderem durch Säureproduktion, Endotoxine und andere toxische Substanzen ausgemacht wird, so zeigt sich *P. zoppii* Genotyp 2 als invasiv. Der Großteil der Erreger befand sich zwar durchaus in den Alveolarlumina, allerdings schienen sie nach Zerstörung des ansonsten eng miteinander verbundenen Kollektivs der Alveolarepithelzellen und nach Zerstörung der Basallamina als intakte und wahrscheinlich noch vermehrungsfähige Organismen im Interstitium weiteren Gewebeschaden hervorzurufen. Das Ausbilden von Granulomen deutet stark darauf hin, dass der Wirtsorganismus den Erregern durch Phagozytose oder Ausschüttung toxischer Substanzen wenig entgegenzusetzen hat und einzig durch Demarkierung diese wirkungsvoll einzuschränken versucht.

Vergleichend dazu wurden die Infektionserreger bei den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln stets nur in den Alveolarlumina angefounden. Bei den mit *P. zoppii* Genotyp 1 infizierten Eutervierteln wurden diese neben der Lokalisation in den Alveolarlumina in einigen wenigen Fällen auch zwischen den die Alveolen auskleidenden Alveolarepithelzellen angetroffen.

Der Rückgang der Milchleistung wird bei bakteriellen Mastitiden darauf zurückgeführt, dass die Synthese des Milchsekrets nicht mehr ordnungsgemäß stattfinden kann, wenn die synthetisierenden Alveolarepithelzellen geschädigt oder zerstört sind. Diese Hypothese könnte für die Protothekenmastitis auch zutreffen, denn der Rückgang der Milchleistung des mit *P. zoppii* Genotyp 2 infizierten Rindes und der mischinfizierten Tiere war deutlich ausgeprägt. Allerdings könnte diese Tatsache auch an einer nicht ordnungsgemäß funktionierenden Milchejektion liegen. Eine wichtige Funktion beim Ablauf der Milchejektion nehmen die Myoepithelzellen

ein. Hinsichtlich der Invasivität von *P. zopfii* Genotyp 2 und um die Mechanismen, die zu einem derart starken Milchrückgang bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Eutervierteln führen, weiter zu eruieren, wäre es deshalb ratsam, die Gewebeschnitte der einzelnen Viertel immunhistochemisch auf Calponin als Marker für glatte Muskulatur und Laminin zur Darstellung der Basalmembran zu untersuchen. Die Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit und des Chloridgehalts in der Milch sind sichere Anzeichen für eine Schädigung der Blut-Milch-Schranke und somit kann davon ausgegangen werden, dass zumindest bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Eutervierteln die Wandauskleidung der Alveolen und das diese umgebende Bindegewebe in starkem Maße zerstört wurden. Ein Calponin- und Lamininnachweis mittels Immunhistochemie würde allerdings aussagekräftigere Hinweise liefern können.

Ein weiteres auffälliges Merkmal, welches besonders stark ausgeprägt bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Eutervierteln beobachtet werden konnte, war eine starke Beteiligung eosinophiler Granulozyten. Diese Erscheinung wurde in diesem Ausmaß in der bisher veröffentlichten Literatur noch nicht beschrieben. Dies führte dazu, dass die in dieser Arbeit angefertigten Gewebeschnitte noch einer Spezialfärbung unterzogen wurden um zu verifizieren, dass es sich bei diesen Zellen sicher um eosinophile Granulozyten handelte (Ergebnisse nicht dargestellt). Die durch diese Spezialfärbung eindeutig diagnostizierte Infiltration mit eosinophilen Granulozyten wurde in besonderem Maße durch *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae* hervorgerufen, konnte aber auch in schwächerer Ausprägung bei zwei der fünf mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Viertel festgestellt werden.

### 5.7 ELISA

Der auf Ganzzell-Antigen basierende indirekte ELISA, welcher in dieser Studie durchgeführt wurde, berücksichtigte lediglich die Immunglobulinklasse A und die Subklasse G1. Obwohl es im Laufe einer Laktation zu Änderungen der relativen Anteile der einzelnen Immunglobulin(sub-)klassen am Gesamtimmunglobulingehalt des Milchsekrets kommt, nehmen der Immunglobulin G1-Gehalt mit 0,58 mg/ml Milch und der IgA-Gehalt mit 0,1 mg/ml Milch (FARRELL et al. 2004) stets den Hauptanteil der Immunglobuline in boviner Milch ein und sind somit am besten zur Detektion spezifisch ausgebildeter Antikörper geeignet. Der Vollständigkeit halber hätten noch die IgG2-, IgG3- und IgM-Antikörperspiegel erhoben werden können, wobei bereits von anderen Autoren gezeigt wurde, dass diese Immunglobulin(sub-)klassen gegenüber gesunder Euterviertel bei einem Mastitisgeschehen im Rindereuter in der Milch insgesamt kaum erhöht sind (HIDIROGLOU et al. 1992).

Um die immunologische Situation im Euter zu Versuchsbeginn so homogen wie möglich zu gestalten ist es von Vorteil, Versuchstiere im gleichen Laktationsstadium zu wählen. Im vorliegenden Fall schwankte die Anzahl der Laktationstage bei den einzelnen Tieren zwischen 368 und 649 Tagen. Aufgrund der begrenzten Auswahl an Versuchstieren konnte diesem Auswahlkriterium nicht mehr Beachtung

geschenkt werden, obwohl es zur Optimierung der Ergebnisse von Vorteil gewesen wäre.

Betrachtet man die OD%-Werte der Milchsera zum Tag 0, also vor Infektion der Tiere, so fällt auf, dass die Antikörperaktivitäten oftmals nicht bei 0 OD% lagen, sondern vielmehr bis zu 8 OD% betragen. Dies könnte das Resultat einer durchlaufenen Infektion mit Prototheken sein. Allerdings wurde bei der Auswahl der Herkunftsbetriebe streng darauf geachtet, dass dort noch nie Fälle von Prototheken-Mastitiden aufgetreten waren. Da auch die Versuchstiere mikrobiell auf das Vorhandensein von Prototheken im Milchserum hin kontrolliert wurden und stets negativ befundet wurden, kann eine Besiedlung des Euters ebenfalls ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein von Antikörpern gegen Prototheken vor Infektion der Versuchstiere wäre eine vorangegangene Auseinandersetzung entweder mit Prototheken selbst, zum Beispiel passagär über das Futter, oder aber mit Erregern, die eine Kreuzantigenität bewirkten. Diese Aussage ist jedoch rein spekulativ, wobei eine nachträgliche Beprobung der ursprünglichen Umgebung der Versuchstiere im Herkunftsbetrieb weitere Anhaltspunkte liefern könnte. Der hier entwickelte ELISA wurde jedoch nicht validiert beziehungsweise wurden keine Cutoff-Werte bezüglich einer positiven oder negativen Diagnose errechnet, anders als beim mit *P. zopfii* Genotyp 2 beschichteten und gut etablierten ELISA von ROESLER et al. (2001).

Vergleicht man zunächst den Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten im Milchserum der infizierten Viertel mit den IgG1-Antikörperaktivitäten der selben Viertel, so fällt auf, dass der Genotyp 2 von *P. zopfii* stets den höchsten Anstieg an spezifischen Antikörpern bewirkte. Dies könnte einerseits dadurch bedingt worden sein, dass dieser als Erreger einen besonders immunogenen Charakter aufweist, andererseits könnte die Menge des vorhandenen Antigens einen quantitativen Einfluss genommen haben. So ist es durchaus denkbar, dass die hohe Menge der vorhandenen Prototheken in der Milch und auch die histologisch festgestellte dichte Besiedlung des Eutergewebes in den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln zu einer stärkeren und länger andauernden humoralen Immunantwort geführt haben könnte.

Im Milchserum der infizierten Euterviertel fand ein Anstieg der spezifisch gegen die einzelnen Erreger gerichteten Antikörper der Immunglobulinklassen G1 und A regelmäßig ab dem 6., respektive 7. Tag *p.i.* statt. Im Hinblick darauf, dass es schon lange als gesichert gilt, dass in der Milch vorhandene Immunglobuline der Klassen A und M lokal im Euter gebildet werden während die Vertreter der Immunglobulinklasse G vorwiegend durch passive Diffusion und/oder aktiven Transport aus dem Blut in die Milch gelangen (OESTENSSON und LUN 2008), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die lokale humorale Immunantwort bei der Protothekenmastitis des Rindes nicht schneller zu erfolgen scheint als die systemische. Mit dem Wissen um die unterschiedlichen Bildungsstätten der Immunglobulinklassen muss die Tatsache, dass der gegen *P. zopfii* Genotyp 2 gerichtete Antikörperspiegel der Immunglobulinsubklasse G1 in der Milch höher ist als der gegen die zwei anderen Erreger gerichtete IgG1-Spiegel insofern kritisch hinterfragt werden, als dass dies nicht unbedingt eine tatsächlich vorhandene

Erhöhung widerspiegeln muss. Die histologisch abstufbaren Schäden im Gewebe der unterschiedlich infizierten Euterviertel waren in den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln besonders stark ausgeprägt, so dass durchaus auch davon ausgegangen werden kann, dass die Translokation der IgG1-Antikörper vom Blut in die Milch leichter vonstatten gehen konnte und daraus die höhere Antikörperaktivität resultierte. Um bei dieser Fragestellung einen Wissensgewinn zu erlangen, könnte man den antigenspezifischen IgG1-Spiegel im gewonnenen Blutserum in Relation zum im Milchserum vorhandenen antigenspezifischen IgG1-Spiegel setzen, um so eine Aussage darüber zu erhalten wie sich der Milchserumspiegel in Relation zum Blutserumspiegel verhält. Es gibt bei der durchgeführten Studie jedoch auch Anhaltspunkte, die gegen die Theorie sprechen, dass durch die hochgradige Gewebeschädigung in den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Eutervierteln die Antikörper der Immunglobulinklasse G1 leichter vom Blut in die Milch gelangen können: Die OD%-Werte der spezifisch gegen die drei Erreger gerichteten IgG1-Antikörperaktivitäten lagen in den Kontrollvierteln in sehr ähnlichen Bereichen wie in den infizierten Vierteln. Würde die Gewebeschädigung in den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln einen einfacheren Übertritt der Antikörper vom Blut in die Milch erlauben, so müssten nach eben aufgestellter Hypothese die OD%-Werte im Milchserum der Kontrollviertel niedriger sein.

Die spezifischen IgG1-Antikörperaktivitäten im Milchserum der Kontrollviertel lagen stets höher als die entsprechenden IgA-Antikörperaktivitäten. Diese Tatsache ist wohl dem Umstand geschuldet, dass in den Kontrollvierteln der Antigenstimulus zur lokalen Synthese von IgA fehlte. Dennoch konnten, wenn auch in sehr geringem Umfang, spezifische Antikörper der Immunglobulinklasse A im Milchsekret der Kontrollviertel nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass differenzierte Plasmazellen zwischen den Eutervierteln migrierten und somit schon vor Besiedlung eines noch nicht an Mastitis erkrankten Viertels eine spezifische Abwehrfunktion erfüllen könnten.

Ordnet man die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse hinsichtlich des immunologischen Geschehens auf humoraler Ebene in das bisherige Schrifttum ein, so muss festgestellt werden, dass bisher nur ausgesprochen wenig Untersuchungen über den Nachweis von Antikörpern gegen *Prototheca spp.* bei Rindern durchgeführt wurden. Die umfangreichste und vielseitigste Untersuchung dahingehend wurde von ROESLER et al. (2001) unternommen und führte zu einem in der Diagnostik einsetzbaren ELISA, der mit einer hohen Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von spezifischem Anti-*Prototheca zopfii*-IgG1 und -IgA in Milchserum einsetzbar ist. In Anbetracht der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Antikörperkinetik bei der Protothekenmastitis des Rindes untersucht worden ist, und ein Anstieg der IgA- und IgG1-Spiegel im Milchserum bereits nach dem 6., respektive 7. Tag *p.i.* zu verzeichnen war, sollte der zur Herdendiagnostik einsetzbare, von ROESLER et al. entwickelte ELISA auf seine Einsetzbarkeit auch in der frühen Phase einer Infektion getestet werden.

Um ergänzende Informationen bezüglich des Pathomechanismus bei der Protothekenmastitis des Rindes zu erlangen wäre es, besonders in Hinblick auf die Verbreitung von Prototheken über das Lymphsystem, weiterhin von

wissenschaftlichem Interesse, die zellulären und humoralen Vorgänge in der afferenten und efferenten Lymphe im Euterbereich zu untersuchen. Die chirurgische Vorgehensweise könnte analog zu OBEL et al. (1989) erfolgen. Diese zusätzlichen Untersuchungen konnten in dem hier durchgeführten Infektionsversuch nicht parallel erfolgen, da bei der Lymphgewinnung chirurgische Traumen gesetzt worden wären, die den Verlauf der Protothekenmastitis und insbesondere die Gewebereaktion des Euterparenchyms verfälscht hätten.

### 5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Beobachtungen nach den experimentellen Infektionen zeigten, dass die Reaktionen der sieben Versuchsrinder erregerspezifisch waren. Legt man der Einteilung von Mastitiden, die von der DVG definierten Kriterien zugrunde, so zeigten die mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Euterviertel stets eine mittel- bis hochgradige klinische Mastitis (DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT 2002). Nach eben genannter Einteilung besteht eine mittel- bis hochgradige klinische Mastitis „bei offensichtlichen Entzündungssymptomen des Euters wie erhöhte Temperatur, Schmerzen und Schwellung [...]“. Schon mehrfach wurde beschrieben, dass die Anzeichen der klinischen Protothekenmastitis eine Sonderstellung bei den Mastitiden einnimmt, denn von den fünf typischen Kennzeichen einer Entzündung sind lediglich zwei, nämlich Schwellung (lat. *tumor*) und die durch den Abfall der Milchleistung ausgezeichnete eingeschränkte Funktion (lat. *functio laesa*) regelmäßig ausgeprägt. Nichtsdestotrotz und besonders im Hinblick auf die histologischen Befunde und die hochgradigen makroskopischen Veränderungen in der Milch der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel kann man zu Recht von einer mittel- bis hochgradigen Mastitis der betroffenen Euterviertel sprechen.

Stellt man die in dieser Studie durchgeführten Versuche und erhobenen Ergebnisse in den Kontext der Henle-Koch'schen-Postulate, so wird offensichtlich, dass somit *P. zopfii* Genotyp 2 als der Erreger der klinischen Protothekenmastitis des Rindes identifiziert worden ist. Obwohl man den Dreisatz von „Isolieren-Kultivieren-Verimpfen“ zur ätiologischen Beweisführung in der heutigen Zeit bei weitem nicht mehr auf alle Krankheiten anwenden kann (als Beispiel sei hier nur der Krankheitskomplex der in der Veterinärmedizin bedeutsamen Bovinen Virusdiarrhoe/Mucosal Disease genannt), so liefert die Erfüllung der Postulate doch die Basis einer logischen ätiologischen Argumentation. In der wichtigsten Passage seines Aufsatzes „Die Ätiologie der Tuberkulose“ von 1882 konstatierte KOCH, dass zur vollständigen Beweisführung, dass ein „Parasit“ die eigentliche Ursache einer Krankheit sei, dieser „Parasit“ von einem erkrankten Organismus abgetrennt und von allen Produkten der Krankheit befreit werden müsse und durch die Einführung der isolierten „Parasiten“ in den gesunden Organismus die Krankheit mit allen ihren eigentümlichen Eigenschaften von neuem hervorgerufen werden müsse. Der in dieser Arbeit eingesetzte Stamm von *P. zopfii* Genotyp 2 stammte aus der Milch eines an einer akuten Protothekenmastitis erkrankten Rindes und führte bei völlig

gesunden, nicht immunsupprimierten Kühen zur Erkrankung infizierter Euterviertel und zur Ausbildung typischer klinischer Anzeichen. Die eben genannte Tatsache, dass dieser Erreger bei gesunden Tieren eine klinische Protothekenmastitis hervorrief, ist auch in der Hinsicht bedeutsam, als dass damit gezeigt werden konnte, dass es sich bei dem Erreger der klinischen Protothekenmastitis des Rindes offensichtlich um einen obligat pathogenen Erreger handelt. Unabhängig von der Abwehrlage des befallenen Individuums ruft dieser eine Infektion hervor und gehört gleichzeitig nicht zur physiologischen Kolonisationsflora.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es bei einer Infektion des Euters mit Prototheken zur systemischen Ausbreitung der Erreger kommen kann. Bei zwei der drei Tiere, die mit allen drei Erregern gleichzeitig infiziert worden waren, wurden beim immunhistochemischen Nachweis intakt aussehende Prototheken in der Milz gefunden. Bisher wurde nur von zwei Fällen berichtet, in denen Prototheken außerhalb des Euters und der Euterlymphknoten nachgewiesen worden sind. GEDEK und WEBER fanden 1978 in der Niere einer an Protothekenmastitis erkrankten Kuh *Prototheca spp.* vor und TANIYAMA et al. (1994) konnten die Erreger sogar in disseminierter Form unter anderem in der Lunge, den Nieren und im Herzmuskel nachweisen. Dieser disseminierten Form der Protothekose war jedoch eine erfolglose antibiotische Behandlung einer Mastitis und eine einwöchige systemische Behandlung mit Dexamethason vorausgegangen. Neben einer disseminierten Protothekose wies diese Kuh auch eine Aspergillose und Kokzidienbefall des Magen-Darmtraktes auf. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen hinsichtlich der Ausbreitung der Erreger bei einer Protothekenmastitis und die Fallbeschreibungen in der Literatur müssen auch als Verweis darauf gewertet werden, dass das Henle-Koch'sche Modell auf einer klaren Trennung von Wirt und Erreger beruht (GRADMANN 2008). Es lässt zu wenig Raum für Wechselwirkungen von Wirt und Erreger und begreift ihr Zusammentreffen zu wenig als entwicklungs-offenes individuelles Ereignis. So muss darauf hingewiesen werden, dass im Rahmen des in dieser Arbeit etablierten Infektionsmodells streng darauf geachtet wurde, dass die Versuchstiere in ihren ausgeprägten Merkmalen (beispielsweise das Alter und die Rasse) so homogen wie möglich waren. Dies erlaubt zwar einerseits die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten, andererseits schränkt dies die Allgemeingültigkeit der gewonnenen Erkenntnisse gleichermaßen ein. So weiß man trotz des Infektionsversuchs nicht sicher ob diese Aussage zum Beispiel auch für Rinder der Rasse Braunvieh gilt und für Rinder, die durch ihr hohes Alter eine andere Immunlage haben, sprich welchen Einfluss der Wirt auf den Ausgang einer Infektion hat. So könnte man an dieser Stelle nun versucht sein, den Kausalzusammenhang zwischen der Infektion eines Rindereuters mit *P. zoppii* Genotyp 2 und der Entstehung einer klinischen Protothekenmastitis in Frage zu stellen. Allerdings sollte bei einer wissenschaftlichen Kausalitätsfrage immer zwischen „kausaler Notwendigkeit“ und „kausaler Hinlänglichkeit“ unterschieden werden. Nimmt man zur Definition dieser zwei Termini diejenigen von CARTER (1985), so ist ein Phänomen C hinlänglich für ein Phänomen E, wenn das Auftreten von C, das Auftreten von E garantiert (es besteht also eine kausale Hinlänglichkeit). Ein Phänomen C ist notwendig für ein

Phänomen E, wenn das Nicht-Auftreten von C das Nicht-Auftreten von E garantiert (es besteht also eine kausale Notwendigkeit). Im vorliegenden Fall kann eine kausale Hinlänglichkeit nicht uneingeschränkt ausgesprochen werden. Durch die erfolgten Infektionsversuche kann also nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass es immer wenn *P. zopfii* Genotyp 2 in ein Rindereuter eindringt zu einer klinischen Protothekenmastitis kommt. Es konnte jedoch eindeutig festgestellt werden, dass bei Infektion mit *P. zopfii* Genotyp 1 und mit *P. blaschkeae* keine Ausbildung einer klinische Protothekenmastitis auftrat, bei Infektion mit dem Genotyp 2 von *P. zopfii* jedoch immer, so dass zwischen *P. zopfii* Genotyp 2 und dem Auftreten einer klinischen Protothekenmastitis eine kausale Notwendigkeit besteht.

Zeitgleich mit der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Infektionsversuche wurde erstmals *P. blaschkeae* im Milchsekret von Rindern nachgewiesen (MARQUES et al. 2008; ROESLER 2008). Genauere Angaben über das klinische Bild und die Konstitution der Tiere bei denen *P. blaschkeae* gefunden wurde und über epidemiologisch bedeutsame Faktoren (beispielsweise ob die vier von MARQUES gefundenen Isolate von *P. blaschkeae* in einem Betrieb oder in verschiedenen Betrieben gefunden wurden) fehlen derzeit noch gänzlich. Oftmals wurden Prototheken bisher auch bei Rindern isoliert, die klinisch kaum bis keine Auffälligkeiten aufwiesen. Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Parameter, die in diesem Infektionsversuch aufgezeichnet wurden und vergleicht die Reaktionen auf die drei Erreger untereinander, so scheint *P. zopfii* Genotyp 1 am niedrigsten pathogen zu sein und *P. zopfii* Genotyp 2 mit Abstand am höchsten pathogen. *P. blaschkeae* nimmt diesbezüglich eine Mittelstellung ein, die insbesondere beim Betrachten der histologischen Ergebnisse, welche den Befunden bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln teilweise ähnelten, zahlreiche Fragen aufwirft. Ist *P. blaschkeae* beispielsweise in der Lage eine subklinische Mastitis auszulösen? Geschieht dies eventuell nur bei immunsupprimierten Individuen, sodass man von einem opportunistischen Erreger sprechen kann? Keiner der drei Erreger wurde bei allen Versuchstieren vollständig eliminiert und bei einem Versuchstier zeigte das mit *P. blaschkeae* infizierte Viertel bis zum Versuchsende die nach DVG festgelegten Kriterien einer subklinischen Mastitis: Erhöhte Zellzahl der Milch, unregelmäßiger Erregernachweis in der Milch und Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Milch bei äußerlich unverändertem Euterviertel. Um auf dem Gebiet der Epidemiologie der Protothekenmastitis des Rindes notwendige Wissenszuwächse zu erlangen wäre es dringend erforderlich, die mit den weltweit gewonnenen Protothekenisolaten korrespondierenden klinischen Daten genauestens zu erfassen. So könnte beispielsweise geklärt werden welche Faktoren zu einer Euterinfektion mit *P. blaschkeae* führen und das klinische Bild bei einer solchen Infektion präziser beschrieben werden.

Auch bei der Ätiopathogenese der klinischen Protothekenmastitis sind noch zahlreiche Fragen unbeantwortet. So bedarf es sowohl der genaueren Charakterisierung des Erregers als auch der Immunantwort des Wirts. Bestimmte morphologische Strukturen wie beispielsweise die Zellwand und Plastide von *Prototheca* Spezies wurden bisher von verschiedenen Autoren genauer untersucht

(TURNER und LLOYD 1966; PUEL und GIRAUD 1990), auch auf genetischer Ebene wurde bereits einiges erforscht (WOLFF et al. 1994). Ein bisher völlig unerforschtes Gebiet stellen jedoch Virulenzfaktoren von *Prototheca spp.* dar. Besonders auf dem Gebiet der Proteomik wurden in den letzten Jahren in rasantem Tempo neue Methoden entwickelt, die zur Analyse der Virulenzfaktoren erfolgsversprechend scheinen und in diesem Falle zur Anwendung kommen könnten.

Wie in Kapitel 4.1 bereits beschrieben trat bei Infektion mit *P. zopfii* Genotyp 2 bei allen Tieren teils leichtes, teils mittelgradiges Fieber auf. Aufgrund der Untersuchungen von BEDICK et al. (2001), die bei der von ihnen untersuchten Protothekenspezies *P. wickerhamii* eine lipopolysaccharidähnliche Struktur auf der Oberfläche der Grünalgen nachweisen konnten, wäre es denkbar, dass eine derartige Struktur auch bei *P. zopfii* Genotyp 2 vorhanden sein und als exogenes Pyrogen wirken könnte. Es wäre daher zum Beispiel von großem Interesse *P. zopfii* Genotyp 1, *P. zopfii* Genotyp 2 und *P. blaschkeae* mittels der von BEDICK et al. (2000) beschriebenen Methode auf das Vorhandensein lipopolysaccharidähnlicher Strukturen vergleichend zu untersuchen.

Neben den weiterführenden Untersuchungen bezüglich der detaillierteren Charakterisierung der vom Erreger ausgehenden Faktoren, wie beispielsweise auch Toxine, die bei der klinischen Protothekenmastitis eine Rolle spielen könnten, besteht noch großer Bedarf an weiterer Forschung hinsichtlich der Faktoren, die bei dieser Krankheit vom Wirt ausgehen. Bedauerlicherweise sind hinsichtlich der Abwehrreaktionen im Euter bei Mastitiden bis dato wenig Informationen bekannt. Allerdings wären weiterführende Untersuchungen mit verhältnismäßig geringem Aufwand zu bewerkstelligen, da erforderliche Milchproben leicht zu gewinnen sind und *in vitro* mit Epithelzellen der Mamma relativ unkompliziert gearbeitet werden kann.

Welche Rolle der angeborenen und welche der erworbenen Immunantwort bei der klinischen Protothekenmastitis des Rindes zukommt ist bis zum heutigen Tage noch nicht geklärt. Hinsichtlich der angeborenen Immunantwort wäre es einerseits wichtig zu ergründen welche löslichen Faktoren seitens des Wirtes eine besondere Rolle spielen. Interessant wäre es, den Spiegel verschiedener Akute Phase Proteine wie beispielsweise lösliches CD14 oder Serum Amyloid A im Milchsekret erkrankter Tiere zu erheben. Auch das Ausmaß der Beteiligung proinflammatorisch wirkender Zytokine wie beispielsweise des Interleukins 1 und des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  bei der klinischen Protothekenmastitis des Rindes sind bisher noch nicht bekannt. Von RAINARD et al. (1984) wurde bei bakteriell bedingten Mastitiden bereits eine Erhöhung des Komplementfaktors C3 in der Milch verzeichnet. Ob dieser Anstieg auch in der Milch von an Protothekenmastitis erkrankten Rindern erfolgt und inwiefern sich daraus eine Beteiligung des Komplementsystems an der Bekämpfung der Erreger ableiten lässt ist ebenfalls noch nicht geklärt.

Die Wirkung einzelner löslicher Faktoren des angeborenen Immunsystems auf unterschiedliche Protothekenspezies sind bisher ebenfalls weitestgehend ungeklärt. Von LEE et al. (2004) wurde bereits die Wirkung von bovinem Lactoferrin auf Prototheken untersucht. Berücksichtigt man die Tatsache, dass die

Protothekenmastitis noch immer als therapieresistent angesehen werden muss, wäre es von Interesse auch die Wirkung anderer in boviner Milch vorkommender Enzyme auf *Prototheca spp.* zu untersuchen. Nachdem Infektionsversuche mit *Staphylococcus aureus* zeigten, dass Milchlysozym einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* ausübt (ERHARDT et al. 1981), könnte geprüft werden, ob dies für *Prototheca spp.* ebenfalls zutrifft.

Bezüglich der Reaktionen des adaptiven Immunsystems bei der bovinen Protothekenmastitis ist lediglich bekannt, dass die spezifischen Immunglobuline der Klasse G im Blutserum erkrankter Kühe und die spezifischen IgA-Antikörper im Milchserum gegen antigene Strukturen mit einem Molekulargewicht von 30 und 32 kDa gerichtet sind (ROESLER et al. 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführten indirekten ELISA zeigten zusätzlich, dass sowohl eine Infektion mit *P. zopfii* Genotyp 2 als auch *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae* die Bildung von spezifischen Antikörpern nach sich zieht, allerdings scheint der Genotyp 2 von *P. zopfii* besonders immunogen zu sein. Nach wie vor ist jedoch völlig unklar, welche Bedeutung der humoralen und welche der zellulären erworbenen Immunantwort bei der Bekämpfung des Erregers zukommt. Bisher erhobene Daten zeigen jedoch, dass Vertreter dieser Grünalgenart kaum phagozytiert werden und besonders *P. zopfii* Genotyp 2 selbst bei Einverleibung durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten noch immer nicht inaktiviert wird. Aufgrund der durchgeführten histologischen Untersuchungen und des Schrifttums ist offensichtlich, dass die Zellpopulation der neutrophilen Granulozyten am Entzündungsgeschehen im Euterparenchym stark beteiligt ist. Inwiefern diese Zellen an der Elimination des Erregers beteiligt sind oder ob sie wie bei der durch *Escherichia coli* ausgelösten Mastitis einen für das Wirtstier negativen Effekt auf die Ausprägung der Mastitis haben gilt es ebenfalls noch zu erforschen. Welche Rolle die ansonsten bei bakteriell bedingten Mastitiden zur Identifikation von sogenannten PAMPs (engl. *pathogen-associated molecular patterns*) also konservierten bakteriellen Strukturen notwendigen TLRs (engl. *toll like receptors*) bei der Erkennung der Vertreter der Gattung *Prototheca* spielen, muss ebenfalls noch eruiert werden. Hinsichtlich weiterer Forschung bezüglich der Ätiopathogenese der Protothekenmastitis des Rindes kann abschließend gesagt werden, dass es nutzbringend wäre, die Vorgänge in experimentell infizierten Eutervierteln innerhalb der ersten 48 Stunden *post infectionem* intensiver zu betrachten. Die Ansiedlung und initiales Wachstum von Erregern bei bakteriellen Mastitiden findet nachweislich innerhalb der ersten 24 Stunden *post infectionem* statt.

Die in Kapitel 4.4.1 dargestellten Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Milchproben deuten zudem darauf hin, dass die derzeit durch die DVG formulierte Vorgehensweise bei der Diagnostik der Protothekenmastitis des Rindes überdacht werden sollte. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass neben dem durch die DVG genannten direkten Ausstrich der Milch auf Sabouraud-Agar ein Teil des Milchsekrets in Sabouraud 2%-Glucose-Bouillon angereichert und anschließend auf dem für Prototheken selektiven PIM-Agar ausgestrichen und inkubiert werden sollte. Ob diese Methode tatsächlich sensitiver

bei der Identifikation von an Protothekenmastitis erkrankten Kühe ist, sollte durch weiterführende Tests statistisch abgesichert werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass es mittels des in der vorliegenden Arbeit etablierten Infektionsmodells für die Protothekenmastitis des Rindes gelang, die ätiologische Rolle von *P. zopfii* Genotyp 2 bei dieser wirtschaftlich bedeutsamen Mastitisform aufzuzeigen. Unabhängig vom Immunstatus der Tiere und anderen prädisponierenden Faktoren zeigte sich *P. zopfii* Genotyp 2 als Erreger, der über eine beträchtliche Pathogenität verfügt. Demgegenüber scheint *P. zopfii* Genotyp 1 ein ubiquitärer apathogener Umweltkeim zu sein, während *P. blaschkeae* das Potenzial offenbarte subklinische Mastitiden auszulösen.

## 6 Zusammenfassung

### Ätiologische Bedeutung von *Prototheca zopfii* Genotyp 2 bei der Protothekenmastitis des Rindes

Bei der Protothekenmastitis des Rindes handelt es sich um eine Euterinfektion mit chlorophylllosen Grünalgen, die weltweit auftritt und bisher therapieresistent ist. Bis dato wird im Schrifttum als Erreger dieser Infektionskrankheit die Spezies *Prototheca (P.) zopfii* angeführt. Die taxonomische Einordnung der Spezies *P. zopfii* war in den letzten Jahren jedoch großen Veränderungen unterworfen: Aus den im Jahre 1985 benannten drei „Varianten“ von *P. zopfii* gingen im Jahre 2006 bei der genetischen Differenzierung die beiden Genotypen *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. zopfii* Genotyp 2 sowie die neue Spezies *P. blaschkeae* hervor.

Ziel dieser Arbeit war es, das eigentliche ätiologische Agens der Protothekenmastitis des Rindes zu identifizieren und Wissenszuwächse hinsichtlich der Ätiopathogenese dieser Krankheit zu erlangen. Hierfür wurde ein *in vivo* Mastitis-Infektionsmodell entwickelt und an sieben Rindern wurden die Erreger-Wirt-Interaktionen über einen Zeitraum von drei Wochen nach experimenteller Infektion beobachtet. Die durchgeführten Untersuchungen umfassten die klinische Beobachtung der Tiere, die qualitative und quantitative Erregerausscheidung über die Milch und Fäzes, die Beobachtung der Veränderungen zahlreicher Parameter des Milchsekrets und des Blutes und eine umfassende mikrobiologische und pathohistologische Untersuchung der bei der Sektion der Versuchstiere gewonnenen Proben.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass lediglich die Infektion der Euterviertel mit *P. zopfii* Genotyp 2 zur Ausbildung einer klinischen Mastitis führte. Hierbei waren die mit diesem Erreger infizierten Euterviertel in allen Fällen diffus verhärtet, stark vergrößert und die Tagesmilchleistung sank auf weniger als die Hälfte ab. Auch die Ausscheidung der Erreger über die Milch war bei den mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Vierteln sehr viel stärker als bei den mit *P. zopfii* Genotyp 1 und *P. blaschkeae* infizierten Vierteln. Über die Fäzes hingegen wurden zu keinem Zeitpunkt Prototheken ausgeschieden und die Veränderungen des Blutbildes waren bei allen Versuchstieren nur minimal. Mittels indirektem ELISA konnte im Milchserum der infizierten Tiere gezeigt werden, dass gegen *P. zopfii* Genotyp 2 gerichtete Antikörper in sehr viel höherem Maße gebildet wurden, als gegen die zwei anderen Erreger. Auch bei den *post mortem* entnommenen Gewebeproben setzten sich die Ergebnisse der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Viertel deutlich gegenüber der zwei anderen Erreger ab: Nur der Genotyp 2 von *P. zopfii* konnte außerhalb des Euters nachgewiesen werden. Pathohistologisch wiesen die Gewebeschnitte der mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Euterviertel stets pyogranulomatöse entzündliche Veränderungen auf, während bei den mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Vierteln keinerlei Anzeichen einer Mastitis gefunden wurden.

Die experimentelle Infektion mit *P. blaschkeae* jedoch induzierte bei den Versuchstieren sehr unterschiedliche Arten und Ausprägungen von Entzündungszeichen.

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass *P. zopfii* Genotyp 2 als der Erreger der klinischen Protothekenmastitis des Rindes anzusehen ist. Der Genotyp 1 von *P. zopfii* hingegen scheint ubiquitär und apathogen zu sein, während *P. blaschkeae* eine Rolle als Auslöser subklinischer Mastitiden zuzukommen scheint.

## 7 Summary

### **Aetiological role of *Prototheca zopfii* genotype 2 in bovine *Prototheca* mastitis**

Bovine *Prototheca* mastitis is an infection of the udder caused by a type of green alga that lacks chlorophyll. The disease occurs worldwide and cannot be cured. Up to this time the species *Prototheca (P.) zopfii* was said to be the causative agent of this infectious disease. However, the classification of the genus *Prototheca* has undergone considerable changes in the last couple of years. In 1985 *P. zopfii* was subclassified into three so called variants. By the use of genetic differentiation these variants were reclassified as *P. zopfii* genotype 1, *P. zopfii* genotype 2 and a new species *P. blaschkeae*.

The aim of this study was the identification of the actual etiological agent of *Prototheca* mastitis and to increase the level of knowledge concerning the ethiopathogenesis of this disease. Thus a mastitis infection model in cattle was developed with the aim of monitoring the host-pathogen interaction during a period of three weeks after experimental infection. The tests and assays which were performed daily included physical examination of the seven test animals, determination of shedding of the agent in milk and faeces and several milk parameters were investigated as well. In addition blood samples were taken regularly for analysis. At the end of the experimental period the animals were dissected and the collected tissue samples analyzed microbiologically and histopathologically.

The results obtained in this study showed that only those quarters of an udder which were infected with *P. zopfii* genotype 2 developed signs of clinical mastitis. Affected quarters were hard, presented diffused swelling and the quarter milk yield was reduced by more than half. Shedding of the agent in milk was also strikingly higher in quarters infected with *P. zopfii* genotype 2 compared to those infected with *P. zopfii* genotype 1 and *P. blaschkeae*. At no time had there been any shedding of *Prototheca spp.* in faeces and changes in blood count were marginal in all cows. By using an indirect ELISA on whey it was demonstrated that antibodies against *P. zopfii* genotype 2 were produced at a much higher number than antibodies against *P. zopfii* genotype 1 and *P. blaschkeae*. The results of the examination of the tissue samples also revealed a major difference between the three infectious agents investigated in this study: Only *P. zopfii* genotype 2 could be found outside the udder. Histopathological findings in tissue sections obtained from quarters that had been infected with *P. zopfii* genotype 2 always included inflammatory changes with a pyogranulomatous character, whereas inoculation with *P. zopfii* genotype 1 did not cause any signs of inflammation. Experimental infection with *P. blaschkeae* lead not only to different types but also to varying intensities of inflammation.

The results of the present study prove *P. zopfii* genotype 2 to be the causative agent of clinical *Prototheca* mastitis in cattle. *P. zopfii* genotype 1 seems to be an ubiquitous and non-pathogenic agent, whereas *P. blaschkeae* seems to have the ability to cause subclinical mastitis.

## 8 Literaturverzeichnis

**Aalbaek B, Jensen HE, Huda A.** Identification of *Prototheca* from bovine mastitis in Denmark. *APMIS*. 1998;106(4):483-8.

**Anderson EH.** Studies on the metabolism of the colorless alga *Prototheca zopfii*. *J gen Physiol*. 1944;28(4):297-327.

**Anderson EH.** Nature of the growth factor for the colorless alga *Prototheca zopfii*. *J gen Physiol*. 1945;28(4):287-96.

**Anderson KL, Walker RL.** Sources of *Prototheca spp* in a dairy-herd environment. *J Am Vet Med Assoc*. 1988;193(5):553-9.

**Arnold P, Ahearn DG.** The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamenta*. *Mycologia*. 1972;64:265-75.

**Barker HA.** The metabolism of the colorless alga, *Prototheca zopfii* Krüger. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1935a;7(1):73-93.

**Barker HA.** The oxidative metabolism of the colorless alga, *Prototheca zopfii*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1935b;8(2):231-50.

**Baumgärtner B.** Vorkommen und Bekämpfung der Protothekenmastitis des Rindes im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Potsdam. *Prakt Tierarzt*. 1997;78(5):406-14.

**Bedick JC, Pardy RL, Howard RW, Stanley DW.** Insect cellular reactions to the lipopolysaccharide component of the bacterium *Serratia marcescens* are mediated by eicosanoids. *Journal of Insect Physiology*. 2000;46(11):1481-7.

**Bedick JC, Shnyra A, Stanley DW, Pardy RL.** Innate immune reactions stimulated by a lipopolysaccharide-like component of the alga *Prototheca* (strain 289). *Naturwissenschaften*. 2001;88(11):482-5.

**Bergmann A.** Euterverträglichkeit von Tetramisol- und Levamisolhydrochlorid und Rezepturvorschlag zum intramammären Einsatz beim Rind gegen *Prototheca zopfii*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1993a;106(8):253-6.

**Bergmann A.** Experimentelle Prototheken-Mastitis beim Rind und Therapie mit Tetramisolhydrochlorid. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1993b;106(8):257-60.

**Berkhoff HA, Connelly MR, Lockett LJ.** Differential microbiological diagnosis of protothecosis from non-human sources. *Am J Med Technol*. 1982;48(7):609-12.

**Blaschke-Hellmessen R, Schuster H, Bergmann V.** Differenzierung von Varianten bei *Prototheca zopfii* Krüger 1894. *Arch Exp Veterinarmed*. 1985a;39(3):387-97.

**Blaschke-Hellmessen R, Schuster H, Schuster K.** Chlorophyllose Algen der Gattung *Prototheca* (Krüger) - Saprophyten und Krankheitserreger bei Mensch und Tier. *Z Gesamte Hyg*. 1985b;31(10):561-4.

- Blaschke-Hellmessen R, Wilhelm A, Teichmann G, Schuster H, Boeltzig K.** Orientierende Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Prototheca zopfii* bei Rindern. Mh Vet Med. 1987;42:48-50.
- Butler EE.** Radiation-Induced chlorophyll-less mutants of *Chlorella*. Science. 1954;120:274-5.
- Carter KC.** Koch Postulates in Relation to the Work of Henle, Jacob and Klebs, Edwin. Medical History. 1985;29(4):353-74.
- Casal M, Solis F.** 1st isolation of *Prototheca* species in Spain. Mycopathologia. 1981;74(1):55-6.
- Casselton PJ, Stacey JL.** Observations on the nitrogen metabolism of *Prototheca* Krüger. New Phytol. 1968;68:731-49.
- Cheville NF, McDonald J, Richard J.** Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. Veterinary Pathology. 1984;21(3):341-8.
- Christ W.** Über das Reaktionsvermögen von Proteinen mit synthetischen Netzmitteln als Grundlage zum Verständnis des California Mastitis Tests. Deutsche Tierärztl Wochenschrift. 1961;4:108-10.
- Ciferri O.** Thiamine-deficiency of *Prototheca*, a yeast-like achloric alga. Nature. 1956;178:1475-6.
- Clark CS, Linnemann CC, Gartside PS, Phair JP, Blacklow N, Zeiss CR.** Serologic survey of Rotavirus, Norwalk Agent and *Prototheca wickerhamii* in wastewater workers. American Journal of Public Health. 1985;75(1):83-5.
- Conte MV, Pore RS.** Taxonomic implications of *Prototheca* and *Chlorella* cell wall polysaccharide characterization. Arch Mikrobiol. 1973;92(3):227-33.
- Cooke WB.** Studies in the genus *Prototheca*. J of the Mitchell Society. 1968a;84:213-20.
- Cooke WB.** Some fungi of Cache la Poudre River Colorado. Mycopathologia et Mycologia Applicata. 1968b;35(3-4):361-72.
- Corbellini LG, Driemeier D, Cruz C, Dias MM, Ferreira L.** Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. Tropical Animal Health and Production. 2001a;33(6):463-70.
- Corbellini LG, Driemeier D, Cruz CE.** Immunohistochemistry combined with periodic acid-Schiff for bovine mammary gland with protothecal mastitis. Biotech Histochem. 2001b;76(2):85-8.
- Costa EO, Carciofi AC, Melville PA, Prada MS, Schalch U.** *Prototheca* sp. outbreak of bovine mastitis. Zentralbl Veterinarmed [B]. 1996;43(6):321-4.
- Dahme E, Weiss E.** Geschlechtsorgane. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1999: 313-317.

- Davies RR, Spencer H, Wakelin PO.** A case of human protothecosis. Transactions of the royal Society of tropical Medicine and Hygiene. 1964;58(5):448-51.
- de Camargo ZP, Fischman O.** Use of morpho-physiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1979;17(3):275-8.
- de Camargo ZP, Fischman O, Regis Silva MR.** Experimental protothecosis in laboratory animals. Sabouraudia. 1980;18(3):237-40.
- de Vargas AC, Lazzari A, Santurio JM, Alves SH, Ferreira G, Kreutz LC.** Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. Mycopathologia. 1998;142(3):135-7.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft.** Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Gießen: DVG; 2002.
- Deutz A, Kuttin ES.** Über eine sichere und einfache mikroskopische Nachweismethode von Pilzen und Algen in Milchproben. Wien Tierärztl Mschr. 1990;77:213-5.
- Dillberger JE, Homer B, Daubert D, Altman NH.** Protothecosis in 2 cats. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1988;192(11):1557-9.
- Dion WM.** Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii* II. Can vet J. 1982;23:272-5.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG.** Das Euter der Widerkäufer. In: Budras K-D, Goller H, Hofmann RR, Hummel G, Weyrauch KD, (Hrsg.). Anatomie der Haustiere. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1991: 747-756.
- Eidner A, Straubinger RK, Rösler U.** Phagocytosis and serum resistance of pathogenic algae of the genus *Prototheca*. Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der DVG . 2008.
- Enders F, Weber A.** Untersuchungen zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Rindern. Berl Munch Tierärztl Wochenschr. 1993a;106(5):165-9.
- Enders F, Weber A.** Pilotstudie zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Pferden. Berl Munch Tierärztl Wochenschr. 1993b;106(8):264-5.
- Epel B, Krauss RW.** The inhibitory effect of light on growth of *Prototheca zopfii* Kruger. Biochim Biophys Acta. 1966;120(1):73-83.
- Erhardt G, Meyer F, Senft B.** Growth-inhibition of *Staphylococcus aureus* after experimental-infection of the udder by high and low concentration of lactoferrin and lysozyme in milk. Acta Microbiologica Polonica. 1981;30(3):239-46.
- Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J.** Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. J Clin Microbiol. 1998;36(4):883-6.

- Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK et al.** Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 2004;87(6):1641-74.
- Frank N, Ferguson LC, Cross RF, Redman DR.** *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. *Am J Vet Res*. 1969;30(10):1785-94.
- Frese K, Gedek B.** Ein Fall von Protothecosis beim Reh. *Tierärztl Wochenschr*. 1968;9:174-8.
- Furuoka H, Anri A, Arita Y, Tuzuki N, Satoh H, Itakura C.** Protothecal mastitis in a cow. *Nippon Juigaku Zasshi*. 1989;51(1):197-9.
- Gedek B, Weber A.** *Prototheca*-Mastitiden beim Rind als Bestandsproblem. *Tierärztl Prax*. 1978;6:441-450.
- Gentles JC, Bond PM.** Protothecosis of Atlantic Salmon. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1977;15:133-9.
- Gradmann C.** Alles eine Frage der Methode: Zur Historizität der Kochschen Postulate 1840-2000. *Medizinhistorisches Journal*. 2008;43(2):121-48.
- Granick S.** Protoporphyrin 9 as a precursor of chlorophyll. *Journal of Biological Chemistry*. 1948;172(2):717-27.
- Greene CE, Rakich PM, Latimer KS.** Protothecosis. In: Greene CE, (Hrsg.). *Infectious diseases of the dog and cat*. Saunders Elsevier; 2006: 659-665.
- Grunert E, Hoedemarker M, Weigt U.** Algenmastitis. *Buiatrik*, Band 1. Hannover: Verlag M.&H. Schaper; 1996: 60.
- Heyer J.** Assimilation von Erdölprodukten durch Hefen. *Internat. Symp. "Erdölmikrobiologie"*, 153-162. 1966. Akad. Verlag Berlin.
- Hidiroglou M, Batra TR, Nielsen KH.** Effect of Vitamin-E supplementation and of health-status of mammary-gland on immunoglobulin concentration in milk of dairy-cows. *Annales de Recherches Veterinaires*. 1992;23(2):139-44.
- Hodges RT, Holland JTS, Neilson FJA, Wallace NM.** *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cows. *N Z vet J*. 1985;33:108-11.
- Hollingsworth SR.** Canine protothecosis. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*. 2000;30(5):1091-101.
- Horiuchi Y, Tomizawa N, Higuchi I, Nagasaka K.** Experimental cutaneous protothecosis in mice: epithelioid cell granuloma formation. *J Dermatol*. 1991;18(2):74-8.
- Hospes R, Seeh C.** Sonographie und Endoskopie an der Zitze des Rindes. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2009: 12.

**Huerre M, Ravisse P, Solomon H, Ave P, Briquelet N, Maurin S et al.** Human protothecosis and environment. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 1993;86:484-8.

**Huss VAR, Sogin ML.** Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the *Chlorococcales* based upon complete small-subunit ribosomal-RNA sequences. Journal of Molecular Evolution. 1990;31(5):432-42.

**Iacoviello VR, Degirolami PC, Lucarini J, Sutker K, Williams ME, Wanke CA.** Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation - case-report and literature-review. Clinical Infectious Diseases. 1992;15(6):959-67.

**International Dairy Federation (IDF).** Annual bulletin, part 1. A monograph on bovine mastitis. Bruxelles: 1971.

**Janosi S, Ratz F, Szigeti G, Kulcsar M, Kerenyi J, Lauko T et al.** Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. Veterinary Quarterly. 2001;23(2):58-61.

**Jensen HE, Aalbaek B.** Pathogenicity of yeasts and algae isolated from bovine mastitis secretions in a murine model. Mycoses. 1994;37(3-4):101-7.

**Jensen HE, Aalbaek B, Bloch B, Huda A.** Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. Med Mycol. 1998;36(2):89-95.

**Joshi KR, Gavin JB, Wheeler EE.** The ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. Mycopathologia. 1975;56(1):9-13.

**Kantrow SM, Boyd AS.** Protothecosis. Dermatologic Clinics. 2003;21(2):249-55.

**Kaplan W.** Protothecosis and infections caused by morphologically similar green algae. Biological and Immunological Properties of Yeast. Proceedings of the Fourth International Conference on Mycoses, June 1977. Scientific Publication No. 356. Pan American Health Organization, Washington, DC. 1977: 218-232.

**Kaplan W, Chandler FW, Holzinger EA, Plue RE, Dickinson RO.** Protothecosis in a cat - 1st recorded case. Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1976;14:281-6.

**Kessler E.** Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Prototheca* III. Utilization of organic carbon and nitrogen compounds. Arch Mikrobiol. 1982;132:103-6.

**Kirk JH.** Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. Agri-Practice. 1991;12(2):15-20.

**Klintworth GK, Fetter BF, Nielsen HS.** Protothecosis, an algal infection - report of a case in man. Journal of Medical Microbiology. 1968;1(2):211-6.

**Koch R,** Die Aetiologie der Tuberculose. Berliner Klinische Wochenschrift. Organ für praktische Ärzte; 1882; 15: 221-230

- Koch T, Berg R.** Körperdecke. Lehrbuch der Veterinär-Anatomie. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1993: 555-591.
- Kockova-Kratochvilova A, Havelkova M.** *Prototheca hydrocarborea n.sp.*- Lebenszyklus, Metabolismus und Feinstruktur. Z Allg Mikrobiol. 1974;14(2):123-34.
- Kraft W, Dürr U.** Spezielle Untersuchungen beim Wiederkäuer. Labordiagnostik. Stuttgart: Schattauer Verlag; 1999: 284.
- Krcmery V.** Systemic chlorellosis, an emerging infection in humans caused by algae. International Journal of Antimicrobial Agents. 2000;15(3):235-7.
- Krömker V.** Laktationsphysiologie. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Stuttgart: Parey Verlag; 2007: 7.
- Krüger W.** Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Saftflusse der Laubbäume. Hedwigia. 1894;XXXIII:241-64.
- Kuo TT, Hsueh S, Wu JL, Wang AM.** Cutaneous protothecosis - a clinicopathological study. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 1987;111(8):737-40.
- Lampen JO, Arnow P.** Inhibition of algae by Nystatin. J Bacteriol. 1961;82:247-51.
- Lass-Floerl C, Mayr A.** Human protothecosis. Clin Microbiol Rev. 2007;20:230-42.
- Lee J-A.** Protothecosis. Aust Vet Practit. 1989;19:103.
- Lee NY, Kawai K, Nakamura I, Tanaka T, Kumura H, Shimazaki K.** Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. Journal of Veterinary Medical Science. 2004;66(10):1267-9.
- Leimann BCQ, Monteiro PCF, Lazera M, Candanoza ERU, Wanke B.** Protothecosis. Medical Mycology. 2004;42(2):95-106.
- Lerche M.** Eine durch Algen (*Prototheca*) herforgerufene Mastitis der Kuh. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1952;4:64-9.
- Loupal G, Kuttin ES, Kolbl O.** Schwimmblasenentzündung der Karpfen (*Cyprinus carpio*) - ätiologisches Agens: eine Alge. Tierärztliche Umschau. 1992;47(11):850-4.
- Macartney L, Rycroft AN, Hammil J.** Cutaneous protothecosis in the dog - 1st confirmed case in Britain. Veterinary Record. 1988;123(19):494-6.
- Macedo JTSA, Riet-Correa F, Dantas AFM, Simoes SVD.** Cutaneous and nasal protothecosis in a goat. Veterinary Pathology. 2008;45(3):352-4.
- Marques S, Silva E, Carnevalheira J, Thompson G.** Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. Journal of Dairy Science. 2006;89(11):4202-4.

- Marques S, Silva E, Kraft C, Carvalheira J, Videira A, Huss VA et al.** Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. J Clin Microbiol. 2008;46:1941-5.
- McDonald JS, Richard JL, Anderson AJ.** Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. Am J Vet Res. 1984a;45(6):1079-80.
- McDonald JS, Richard JL, Cheville NF.** Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca zopfii*. Am J Vet Res. 1984b;45(3):592-5.
- Menke W, Fricke B.** Einige Beobachtungen an *Prototheca ciferrii*. Portug acta Biol. 1962;6 A:243-51.
- Mettler F.** Generalized protothecosis in a fruit bat (*Pteropus lylei*). Vet Pathol. 1975;12(2):118-24.
- Mettler F.** Algeninfektionen bei Mensch und Tier. Schweiz Arch Tierheilk. 1983;125(7):433-42.
- Möller A, Truyen U, Rösler U.** *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? Vet Microbiol. 2007;120:370-4.
- Nadakavukaren MJ, Mccracken DA.** *Prototheca* - alga or a fungus. Journal of Phycology. 1973;9(1):113-6.
- Negróni P, Blaisten R.** Estudio morfológico y fisiológico de una nueva especie de *Prototheca*: *Prototheca Ciferrii* n.sp., aislada de epidermis de papa. Mycopathologia. 1941;3:94-104.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E.** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. 3. Auflage. Berlin: Parey Buchverlag; 1996: 524.
- Obel N, Ostensson K, Astrom G.** Sampling of lymph from lymph vessels afferent to the supramammary lymph gland in the cow. Journal of Veterinary Medicine Series A-Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A-Physiology Pathology Clinical Medicine. 1989;36(7):490-3.
- Oestensson K, Lun SC.** Transfer of immunoglobulins through the mammary endothelium and epithelium and in the local lymph node of cows during the initial response after intramammary challenge with E-coli endotoxin. Acta Veterinaria Scandinavica. 2008;50: 26.
- Osumi T, Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K et al.** *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. Vet Microbiol. 2008;131: 419-23.
- Padhye AA, Baker JG, D'Amato RF.** Rapid identification of *Prototheca* species by the API 20C system. J Clin Microbiol. 1979;10(4):579-82.
- Pal M, Hasegawa A, Ono K, Lee CW.** A new staining solution for the morphological studies of fungi and *Prototheca*. Nippon Juigaku Zasshi. 1990;52(3):527-31.

- Patni NJ, Aaronson S.** Nutrition, resistance to antibiotics and ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. Journal of General Microbiology. 1974;83:179-82.
- Pegram PS, Kerns FT, Wasilauskas BL, Hampton KD, Scharyj M, Burke JG.** Successful ketoconazole treatment of protothecosis with ketoconazole-associated hepatotoxicity. Archives of Internal Medicine. 1983;143(9):1802-5.
- Phaff HJ, Yoneyama M, DoCarmo-Sousa L.** A one year quantitative study of the yeast in a single slime flux of *Ulmus carpinifolia*. Gled Riv Patol Veg Ser III 4. 1964;485-97.
- Pore RS.** *Prototheca* taxonomy. Mycopathologia. 1985;90:129-39.
- Pore RS.** Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*. Can J Microbiol. 1972;18(7):1175-7.
- Pore RS.** Selective medium for isolation of *Prototheca*. Applied Microbiology. 1973;26(4):648-9.
- Pore RS, Barnett EA, Barnes WC, Jr., Walker JD.** *Prototheca* ecology. Mycopathologia. 1983;81(1):49-62.
- Pore RS, Boehm DF, Barnett EA.** *Prototheca* (achloric alga) in waste-water. Water, Air and Soil Pollution. 1986;27(3-4):355-62.
- Pressler BM, Gookin JL, Sykes JE, Wolf AM, Vaden SL.** Urinary tract manifestations of protothecosis in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2005;19(1):115-9.
- Pringsheim EG.** Farblose Algen. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1963.
- Printz A.** *Chlorophyceae*. In: Engler A, Prantl K, (Hrsg.). Die natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig: Engelmann Verlag; 1927: 131-132.
- Prinz M.** Untersuchungen zum Vorkommen chlorophyllloser Algen der Gattung *Prototheca* im Abwassersystem von Milchviehanlagen im Raume Dresden und Beiträge zu ihrem Resistenzverhalten gegenüber ausgewählten Umweltfaktoren und antimikrobiellen Hemmstoffen [Dissertation med. vet.] Technische Universität Dresden; 1988.
- Puel F, Giraud G.** Variations of the ultrastructure of *Prototheca wickerhamii* (*Chlorococcales*, *Chlorophyceae*) plastid according to the carbon nutrition. Cryptogamie Algologie. 1990;11(4):241-8.
- Rainard P, Poutrel B, Caffin JP.** Assessment of hemolytic and bactericidal complement activities in normal and mastitic bovine-milk. Journal of Dairy Science. 1984;67(3):614-9.
- Ribeiro MG, Rodrigues de Farias M, Roesler U, Roth K, Rodigheri SM, Ostrowsky MA, et al.** Phenotypic and genotypic characterization of *Prototheca zopfii* in a dog with enteric signs. Res Vet Sci. 2009 (elektronisch veröffentlicht vor dem Druck)

**Roesler U.** Persönliche Mitteilung. 2008.

**Roesler U, Moller A, Hensel A, Baumann D, Truyen U.** Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56(6):1419-25.

**Roesler U, Scholz H, Hensel A.** Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. J Clin Microbiol. 2001;39(2):539-43.

**Roesler U, Scholz H, Hensel A.** Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53(4):1195-9.

**Romeis B, Böck P.** Mikroskopische Technik. 17. Auflage. München: Urban und Schwarzenberg; 1989.

**Rosenberger G.** Die klinische Untersuchung des Rindes. 3. Auflage. Verlag Paul Parey; 1990.

**Rösler U, Hensel A.** Sanierung eines *Prototheca zopfii*-infizierten Milchviehbestandes. Dtsch tierärztl Wschr. 2003;110:374-7.

**Salerno T, Ribeiro MG, Langoni H, Siqueira AK, Costa EO, Melville PA et al.** In vitro algacid effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. Res Vet Sci. 2009 (elektronisch veröffentlicht vor dem Druck)

**Satoh K, Ooe K, Nagayama H, Makimura K.** *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 (elektronisch veröffentlicht vor dem Druck)

**Schick W, Kutzer H.** Zum Auftreten, zur Diagnostik und zur Bekämpfung der durch *Prototheca trispora* bedingten Mastitis des Rindes. Mh Vet Med. 1982;37:295-8.

**Schiefer B, Gedek B.** Zum Verhalten von *Prototheca* Spezies im Gewebe von Säugetieren. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1968;81(24):485-90.

**Schlenstedt R, Zschock M, Kloppert B, Wolter W.** Vorkommen von Protothekenmastitiden in hessischen Milcherzeugerbetrieben. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 1997;25(5):407-12.

**Schmalreck AF, Trankle P, Vanca E, Blaschke-Hellmessen R.** Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (*Candida albicans*, *Exophiala dermatidis*) und tierpathogenen Algen (*Prototheca spp.*) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden. Mycoses. 1998;41 Suppl 1:71-7.

**Schönborn C, Seffner W.** Zur Pathologie und Mikrobiologie einer durch *Prototheca trispora* ausgelösten Mastitis des Rindes. Mh Vet Med. 1977;32:685-93.

- Schuster H, Blaschke-Hellmessen R.** Zur Epizootiologie der Protothekenmastitis des Rindes - Anzüchtung von Algen der Gattung *Prototheca* aus der Umgebung landwirtschaftlicher Nutztiere. Mh Vet Med. 1983;38:24-9.
- Schuster H, Schuster K.** Zur Bekämpfung der Prototheken-Mastitis des Rindes [Dissertation med. vet.] Humboldt - Universität zu Berlin; 1982.
- Seffner W.** Prototheken-Infektionen. In: Beer J, (Hrsg.). Infektionskrankheiten der Haustiere. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1987: 859-861.
- Seffner W.** Prototheken - Mastitis. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, (Hrsg.). Euter- und Gesäugekrankheiten. Jena: Gustav-Fischer Verlag; 1994: 431-434.
- Segal E, Padhye AA, Ajello L.** Susceptibility of *Prototheca* species to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1976;10(1):75-9.
- Shahan TA, Pore RS.** In vitro susceptibility of *Prototheca* spp. to gentamicin. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(11):2434-5.
- Sirikulchayanonta V, Visuthikosol V, Tanphaichitra D, Prajaktham R.** Protothecosis following hand injury - a case-report. Journal of Hand Surgery-British and European Volume. 1989;14B(1):88-90.
- Sonck CE, Koch Y.** Vertreter der Gattung *Prototheca* als Schmarotzer auf der Haut. Mykosen. 1971;14:475-82.
- Spalton DE.** Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: a case study. Vet Rec. 1985;116(13):347-9.
- Stenner VJ, Mackay B, King T, Barrs VRD, Irwin P, Abraham L et al.** Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. Medical Mycology. 2007;45(3):249-66.
- Sudman MS, Kaplan W.** Identification of the *Prototheca* species by immunofluorescence. Appl Microbiol. 1973;25(6):981-90.
- Sudman MS, Kaplan W.** Antigenic relationships between *Chlorella* and *Prototheca* spp. Sabouraudia. 1974;12:364-70.
- Taniyama H, Okamoto F, Kurosawa T, Furuoka H, Kaji Y, Okada H et al.** Disseminated protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in a cow. Veterinary Pathology. 1994;31(1):123-5.
- Tartar A, Boucias DG.** The non-photosynthetic, pathogenic green alga *Helicosporidium* sp has retained a modified, functional plastid genome. Fems Microbiology Letters. 2004;233(1):153-7.
- Tartar A, Boucias DG, Adams BJ, Becnel JJ.** Phylogenetic analysis identifies the invertebrate pathogen *Helicosporidium* sp as a green alga (*Chlorophyta*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002;52:273-9.

- Tartar A, Boucias DG, Becnel JJ, Adams BJ.** Comparison of plastid 16S rRNA (rrn 16) genes from *Helicosporidium spp.*: evidence supporting the reclassification of Helicosporidia as green algae (*Chlorophyta*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003;53:1719-23.
- Tenhagen BA, Kalbe P, Klunder G, Heuwieser W, Baumgartner B.** Tierindividuelle Risikofaktoren für die Protothekenmastitis des Rindes. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1999;106(9):376-80.
- Thiele D.** Protothekosen bei Mensch und Tier sowie In-vitro-Untersuchungen zur Wirksamkeit und lokalen Euterverträglichkeit von Polyvinylpyrrolidon-Iodlösung und Lugolscher Lösung [Dissertation med. vet.] Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig; 1997.
- Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Piccinini R, Dapra V, Viviani MA.** In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61(6):1312-4.
- Turner G, Lloyd D.** Chemical composition and structure of cell wall of *Prototheca zopfii*. *Biochemical Journal*. 1966;99(3):55-6.
- Tuzuki N.** A case of *Prototheca zopfii*-mastopathy in a cow: Patho-morphological observations. *Jpn J Vet Res*. 1987;35:154.
- Ueno R, Urano N, Suzuki M.** Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (*Trebouxiophyceae, Chlorophyta*) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. *Fems Microbiology Letters*. 2003;223(2):275-80.
- Ueno R, Urano N, Wada S, Kimura S.** Optimization of heterotrophic culture conditions for n-alkane utilization and phylogenetic position based on the 18S rDNA sequence of a thermotolerant *Prototheca zopfii* strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002;94(2):160-5.
- Ueno R, Wada S, Urano N.** Repeated batch cultivation of the hydrocarbon-degrading, micro-algal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam. *Canadian Journal of Microbiology*. 2008;54(1):66-70.
- Van Kruiningen HJ, Garner FM, Schiefer B.** Protothecosis in a dog. *Pathologia Veterinaria*. 1969;6(4):348-54.
- Walker JD, Colwell RR, Petrakis L.** Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Applied Microbiology*. 1975a;30(1):79-81.
- Walker JD, Colwell RR, Vaituzis Z, Meyer SA.** Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototheca zopfii*. *Nature*. 1975b;254(5499):423-4.
- Walker JD, Pore RS.** Growth of *Prototheca* isolates on normal-hexadecane and mixed-hydrocarbon substrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978;35(4):694-7.

**Weber A, Enders F.** Untersuchungen zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Haus- und Wildschweinen. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1993;106:261-3.

**Webster DA, Hackett DP, Park RB.** The respiratory chain of colorless algae. J Ultrastructure Research. 1968;21:514-23.

**Wendt K, Bostedt H, Mielke H.** Prototheken-Mastitis. Euter- und Gesäugekrankheiten. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1994: 431-434.

**Wilhelm A, Blaschke-Hellmessen R, Zieris H.** Zur Protothekenmastitis des Rindes. Der praktische Tierarzt. 1992;6:556-60.

**Wirth FA, Passalacqua JA, Kao G.** Disseminated cutaneous protothecosis in an immunocompromised host: A case report and literature review. Cutis. 1999;63(3):185-8.

**Wolff G, Kuck U.** The structural-analysis of the mitochondrial SSUrna implies a close phylogenetic relationship between mitochondria from plants and from the heterotrophic alga *Prototheca wickerhamii*. Current Genetics. 1990;17(4):347-51.

**Wolff G, Plante I, Lang BF, Kuck U, Burger G.** Complete sequence of the mitochondrial-DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii* - gene content and genome organization. Journal of Molecular Biology. 1994;237(1):75-86.

## 9 Anhang

### 9.1 Chemikalien und Reagenzien

#### PIM-Agar (*Prototheca isolation medium*):

Kaliumhydrogenphthalat	10,0 g
Natriumhydroxid	0,9 g
Magnesiumsulfat	0,1 g
Kaliumhydrogenphosphat	0,2 g
Ammoniumchlorid	0,3 g
Glukose	10,0 g
Thiaminhydrochlorid	0,001 g
Flucytosin	0,25 g
Agar	20,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

Das Fluorocytosin wird erst nachdem die autoklavierte Lösung auf unter 50 °C abgekühlt ist zugegeben. Der pH-Wert soll zwischen 5,0 und 5,2 liegen.

#### ELISA-Gebrauchslösungen:

#### Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

##### (10xPBS):

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,2 g
<u>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></u>	<u>2,7 g</u>

ad 1000 ml A. dest., pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen.

Die Stammlösung muss 1:10 mit A. dest. verdünnt werden um die Gebrauchslösung zu erhalten. Diese ist vor ihrem Einsatz zu autoklavieren.

#### PBS-0,05%Tween® 20:

Tween® 20 (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)	500 µl
PBS	ad 1000 ml

#### Beschichtungspuffer (Na-Carbonat-Puffer):

NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
A. bidest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert sollte mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 9,6 eingestellt werden.

**Blockierungspuffer:**

Gelatine (Fa. Merck, Darmstadt)	5,0 g
PBS	ad 1000 ml

**Zitrat-Phosphat-Puffer für die Substratlösung:**

Zitronensäure-Monohydrat	21,01 g
A. bidest.	ad 1000 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35,8 g
A. bidest.	ad 1000ml

Die Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung wird nun mit der 0,1M Zitratlösung auf pH 4,25 eingestellt.

**Substratlösung für den ELISA:**

Pro ml Zitrat-Phosphat-Puffer werden 0,8 mg ABTS zugegeben. Diese Lösung kann bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen werden noch 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 10 ml Substratlösung zugefügt.

## 9.2 Rohdaten und Ergebnisse der Kontrollviertel

**Tabelle 17: Signifikanzen der Unterschiede der elektrischen Leitfähigkeit der Milch zwischen den unterschiedlich infizierten Vierteln errechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test. *p.i.* = *post infectionem*; GT 1 = *P. zopfii* Genotyp 1; GT 2 = *P. zopfii* Genotyp 2; *P. bl.* = *P. blaschkeae*.**

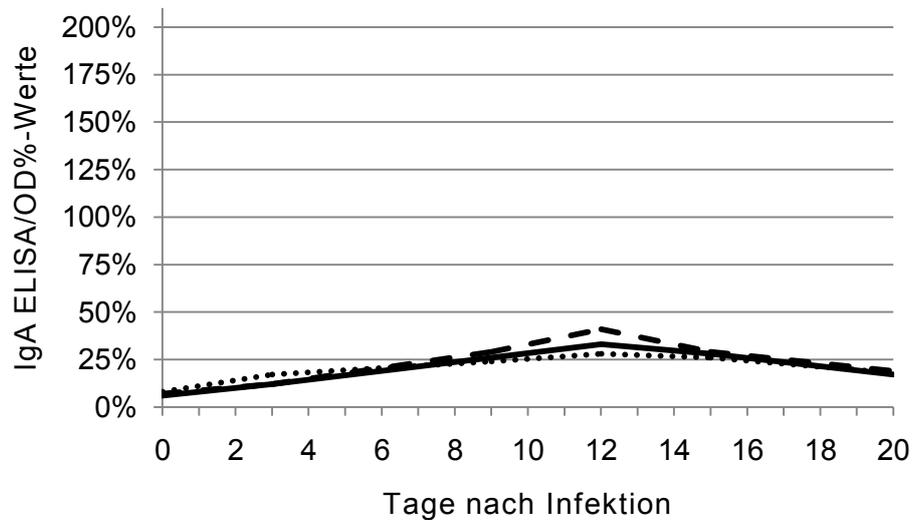
Signifikanz			
Tage <i>p.i.</i>	GT 1 ↔ GT 2	GT 1 ↔ <i>P. bl.</i>	GT 2 ↔ <i>P. bl.</i>
0	0,286	0,175	0,032
1	1,000	0,952	0,968
2	0,516	0,810	0,802
3	0,794	0,802	0,635
4	0,952	0,937	0,937
5	0,048	0,762	0,063
6	0,008	0,460	0,008
7	0,016	0,571	0,016
8	0,008	0,524	0,008
9	0,008	0,833	0,008
10	0,008	0,587	0,008
11	0,008	0,690	0,008
12	0,008	0,357	0,008
13	0,008	0,516	0,008
14	0,008	0,897	0,008
15	0,008	0,952	0,032
16	0,008	0,952	0,008
17	0,008	0,365	0,008
18	0,008	0,706	0,032
19	0,008	1,000	0,008
20	0,056	0,532	0,206

## Anhang

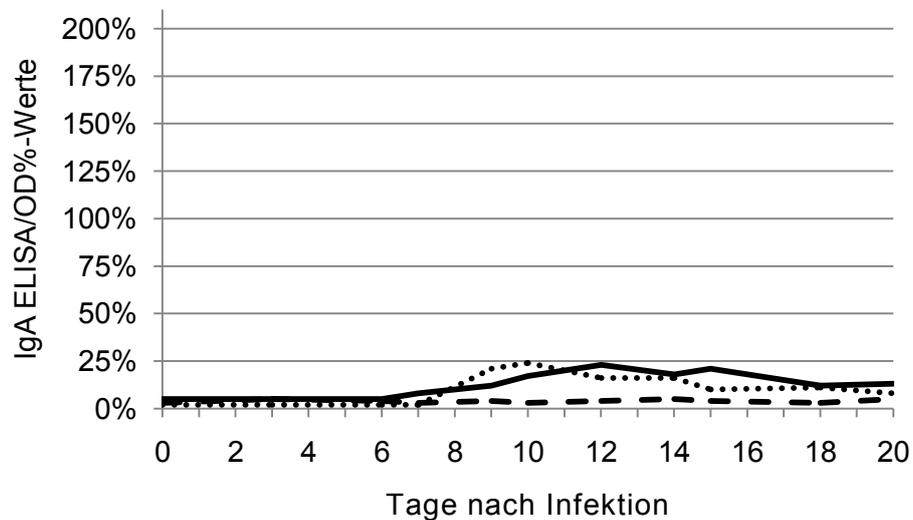
---

**Tabelle 18: Signifikanzen der Unterschiede der quantitativen Erregerausscheidung mit der Milch zwischen den unterschiedlich infizierten Vierteln errechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test. *p.i.* = *post infectionem*; GT 1 = *P. zopfii* Genotyp 1; GT 2 = *P. zopfii* Genotyp 2; *P. bl.* = *P. blaschkeae*.**

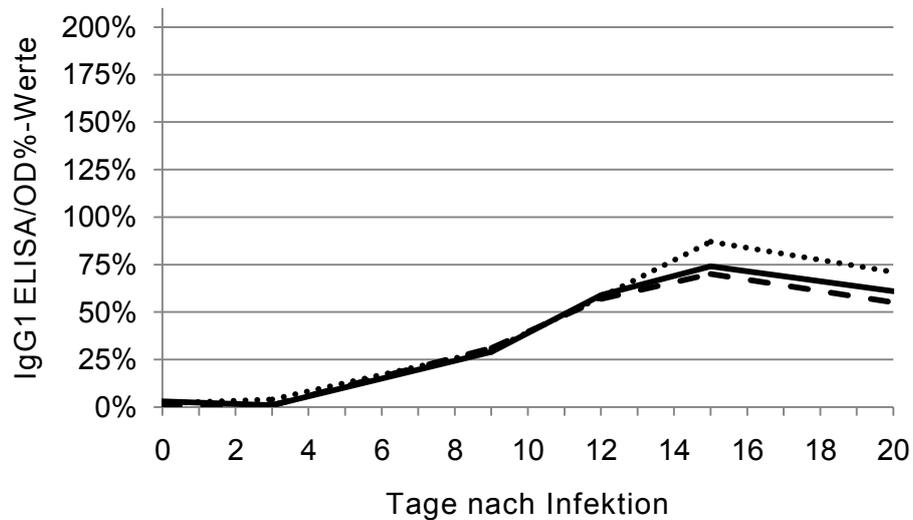
<b>Signifikanz</b>			
<b>Tage <i>p.i.</i></b>	<b>GT 1 ↔ GT 2</b>	<b>GT 1 ↔ <i>P. bl.</i></b>	<b>GT 2 ↔ <i>P. bl.</i></b>
<b>1</b>	1,000	0,175	0,056
<b>2</b>	0,206	0,056	0,056
<b>3</b>	0,238	0,310	0,032
<b>4</b>	0,008	0,794	0,008
<b>5</b>	0,008	0,151	0,008
<b>6</b>	0,008	0,389	0,008
<b>7</b>	0,008	0,841	0,008
<b>8</b>	0,008	0,690	0,008
<b>9</b>	0,008	0,841	0,008
<b>10</b>	0,056	0,841	0,032
<b>11</b>	0,032	0,897	0,008
<b>12</b>	0,032	1,000	0,008
<b>13</b>	0,087	0,952	0,056
<b>14</b>	0,032	1,000	0,032
<b>15</b>	0,032	0,690	0,032
<b>16</b>	0,087	0,540	0,222
<b>17</b>	0,095	0,968	0,151
<b>18</b>	0,310	1,000	0,246
<b>19</b>	0,460	0,841	0,690
<b>20</b>	0,262	0,833	0,595



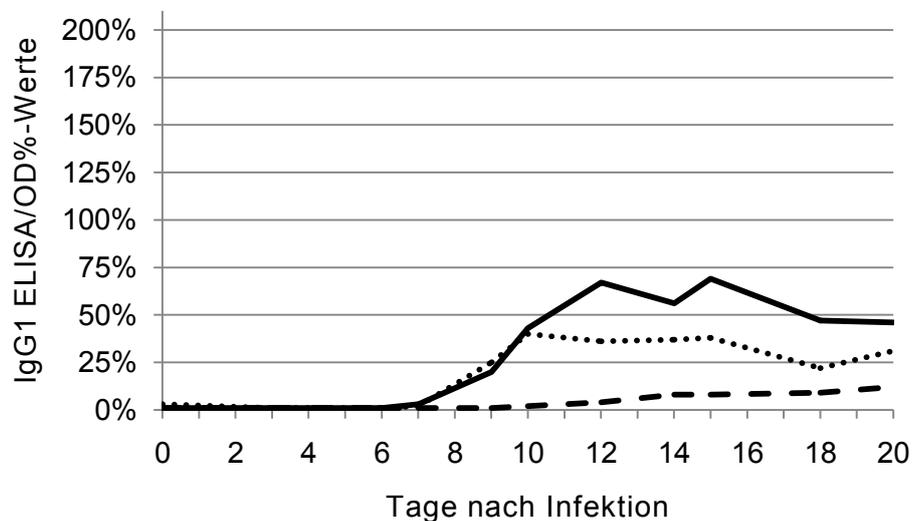
**Abbildung 21: Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit den drei Erregern infizierten Versuchstiere.** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der drei OD%-Werte der Milchseren dar, bei denen als Coating-Antigen *P. zopfii* Genotyp 1 verwendet wurde, die fortlaufende Linie stellt die OD%-Werte der Milchseren dar, bei denen im ELISA *P. zopfii* Genotyp 2 als Coating-Antigen verwendet wurde und die gepunktete Linie stellt die OD%-Werte der Milchseren dar bei denen *P. blaschkeae* als Coating-Antigen verwendet wurde.



**Abbildung 22: Verlauf der IgA-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere (Coating-Antigen = Infektionserreger).** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der zwei OD%-Werte der Milchseren, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Tier 6 gewonnen wurden dar, die fortlaufende Linie diejenigen, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Tier 5 ermolken wurden und die gepunktete Linie repräsentiert das arithmetische Mittel der aus den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln gewonnenen Milchserumproben von Tier 7.



**Abbildung 23: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit den drei Erregern infizierten Versuchstiere.** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der drei OD%-Werte der Milchseren dar, bei denen als Coating-Antigen *P. zopfii* Genotyp 1 verwendet wurde, die fortlaufende Linie stellt die OD%-Werte der Milchseren dar, bei denen im ELISA *P. zopfii* Genotyp 2 als Coating-Antigen verwendet wurde und die gepunktete Linie stellt die OD%-Werte der Milchseren dar bei denen *P. blaschkeae* als Coating-Antigen verwendet wurde.



**Abbildung 24: Verlauf der IgG1-Antikörperaktivitäten gemessen in OD% im Milchserum der Kontrollviertel der mit nur einem Erreger infizierten Versuchstiere (Coating-Antigen = Infektionserreger).** Die gestrichelte Linie stellt das arithmetische Mittel der zwei OD%-Werte der Milchseren, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 1 infizierten Tier 6 gewonnen wurden dar, die fortlaufende Linie diejenigen, die bei dem mit *P. zopfii* Genotyp 2 infizierten Tier 5 ermolken wurden und die gepunktete Linie repräsentiert das arithmetische Mittel der aus den mit *P. blaschkeae* infizierten Vierteln gewonnenen Milchserumproben von Tier 7.

## Anhang

---

**Tabelle 19: Vergleichende Darstellung der Befunde der adspektorischen Milchsekretuntersuchung der Euterviertel, die mit *P. zopfi* Genotyp 2 infiziert worden sind.** VL = vorderes linkes Euterviertel; HR = hinteres rechtes Euterviertel; 0 = Sekret sinnfällig unverändert; 2 = Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken; 3 = Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken; 4 = Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken; 5 = Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken; 6 = Milchcharakter völlig aufgehoben.

<b>Infektionstag</b>	<b>Tier 2</b>	<b>Tier 3</b>	<b>Tier 4</b>	<b>Tier 5 VL</b>	<b>Tier 5 HR</b>
<b>0</b>	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	0	2	0	0
<b>2</b>	0	0	2	2	4
<b>3</b>	0	0	2	3	3
<b>4</b>	3	0	0	3	0
<b>5</b>	4	0	3	3	0
<b>6</b>	4	3	2	2	5
<b>7</b>	4	3	5	5	5
<b>8</b>	3	3	6	4	2
<b>9</b>	2	4	6	5	5
<b>10</b>	2	3	5	5	5
<b>11</b>	3	4	5	0	0
<b>12</b>	2	0	5	2	2
<b>13</b>	5	5	6	5	5
<b>14</b>	2	5	6	2	2
<b>15</b>	5	6	6	2	2
<b>16</b>	2	5	6	2	2
<b>17</b>	2	5	5	2	2
<b>18</b>	3	3	6	5	5
<b>19</b>	0	3	5	2	2
<b>20</b>	0	3	2	2	2

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab publiziert:

1. „*Prototheca zopfii* Genotyp 2 – Kausales Agens der Protothekenmastitis des Rindes!“  
K. Roth, K. Jäger, H.-A. Schoon, A. Eidner, A. Sobiraj, U. Truyen, U. Rösler  
(Vortrag bei der Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 25. – 27. Juni 2008 in Braunschweig)
  
2. „(Immun-)Histologische Charakterisierung einer experimentell induzierten Protothekenmastitis des Rindes – vorläufige Ergebnisse“  
K. Jäger, K. Roth, U. Roesler, A. Sommerfeld, H. Gräfe, H.-A. Schoon  
(Vortrag bei der 51. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 07. – 09. März 2008 in Fulda)
  
3. „Histological and immunohistochemical investigations in experimentally induced bovine mammary protothecosis – preliminary results“  
K. Jäger, K. Roth, U. Roesler, A. Sommerfeld, H. Gräfe, H.-A. Schoon  
(Vortrag bei der 41. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 28. – 29. Februar 2008 in Gießen)

### **Danksagung:**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. U. Rösler für die Möglichkeit über dieses Thema promovieren zu können bedanken. Seine fachliche Unterstützung, sein stets offenes Ohr und das mir entgegengebrachte Vertrauen waren das unerschütterliche Fundament bei der Erstellung dieser Arbeit. Er lotete mich nicht nur durch die mir neuen wissenschaftlichen Fahrwasser sondern war mir auch bei manch „privater Woge“ eine große Hilfe.

Besonderen Dank für die Einarbeitung im Labor und die immer währende Hilfe bei allen kleinen und großen Fragen geht an meine Prototheken-Mitstreiterin Angelika Ihling. Ihre Geduld und ihr fachlicher Weitblick waren unersetzbar.

Mein Dank geht auch in die Labore des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig: Frau Eveline Brumme danke ich für die herzliche Aufnahme in ihr mikrobiologisches Reich und dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch Frau Nadja Leinecker, Dana Rüster, Nadine Roßner und Maria Dreyer sei an dieser Stelle für ihre Hilfestellungen im Labor gedankt.

Frau Kathrin Jäger aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig möchte ich für die unkomplizierte und äußerst fruchtbare interdisziplinäre Zusammenarbeit ebenfalls herzlich danken.

Für die Pflege der Versuchstiere und die Mithilfe bei der Probengewinnung am Versuchsende möchte ich den beteiligten Mitarbeitern der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik und des Zentrums für Veterinary Public Health der Veterinärmedizinischen Fakultät in Leipzig danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Mitdoktoranden und -streiter Juliane Straube, Anna Wardeh-Jossep, Anika Friese, Martin Leffler, Michael Stief und Kerstin Albrecht für ihre zuverlässige Mithilfe, die gegenseitigen Ermunterungen und die schöne Arbeitsatmosphäre im „Altbau“.

Meinen Eltern danke ich für die grenzenlose Unterstützung meiner beruflichen (und privaten) Ideen und ganz besonders meiner Mutter für ihre Anstrengungen im Kampf gegen die (nun doch nicht mehr so neue, mir aber noch immer nicht ganz schlüssige) Rechtschreibung. Meinem Bruder möchte ich für das uhrzeitunabhängige Lösen all meiner Computerprobleme danken und für seine Aufmunterungen in den „zähen“ Phasen der Promotion.

Meinem Freund danke ich dafür, dass er der Fels in der Brandung und zugleich meine Inspiration ist. Ich bin froh einen so außergewöhnlichen Menschen an meiner Seite zu haben.

Zuletzt möchte ich allen, die mich direkt oder indirekt bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten, herzlich danken, auch wenn sie an dieser Stelle nicht namentlich erwähnt wurden.

## Selbständigkeitserklärung

---

### **Selbständigkeitserklärung**

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

Berlin, den 18.12. 2009

Katja Roth