

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Ziel der Untersuchungen**

Ziel der Untersuchungen war es, neben der Ermittlung der klinischen und bakteriologischen Wirksamkeit von Oxacillin in der Behandlung von Mastitiden eine Erklärung für das Auftreten bakteriologisch negativer Milchproben bei Tieren mit Mastitiden zu finden.

Die Hypothese hierfür war, dass die Tiere oder Euterviertel, aus deren Milchproben erkrankter Viertel keine Erreger isoliert werden konnten, höhere Konzentrationen der humoralen Abwehrfaktoren Laktoferrin und Lysozym sowie höhere Aktivitäten des Laktoperoxidase–Thiozyanat–Wasserstoffperoxid Systems haben.

Die Auswertung der erhobenen Befunde wurden schwerpunktmäßig dahingehend betrachtet, ob aus den Milchproben der erkrankten Viertel Erreger isoliert werden konnten oder nicht.

#### **3.2 Versuchsabschnitt 1**

##### **3.2.1 Versuchsbetrieb**

Die Untersuchungen wurden auf einem Milcherzeugerbetrieb im Norden des Landes Brandenburg durchgeführt. Es handelte sich um eine Anlage mit etwa 800 melkenden Kühen der Rassen Deutsche Schwarzbunte und Holstein Frisian. Es bestand ganzjährige Stallhaltung unter Aufteilung in Gruppen in Liegeboxenlaufställen. Im Abkalbestall und auf der Krankenreihe befanden sich die Tiere in Anbindehaltung (Kurzstand, Grabner-Kette, Gummimatten, Gitterroste).

Die Fütterung bestand aus einer Mischration (Maissilage, Lieschkolbensilage, Anwelksilage, Soja, Rapsschrot, Weizen, Mineralstoffmischung). Die Kraftfutterzuteilung erfolgte als Topdressing leistungsorientiert über Transponderabruf.

Die Milchleistung des Betriebes lag bei 8000 kg pro Kuh und Jahr gleitendem Herdendurchschnitt bei 4,3 % Fett und 3,4 % Eiweiß. Gemolken wurde zweimal täglich in einem 2 x 20 Side by Side Melkstand (Melktechnik von Alfa-Laval). Eine Zitzensprühdesinfektion erfolgte nach dem Melkvorgang mit Delco D 1200 (Calgonit/ Laperte). Die Kühe wurden unter antibiotischem Schutz mit Benestermycin<sup>®</sup> (Framycetin und Penicillin, Boehringer Ingelheim) trockengestellt.

Das Fruchtbarkeitsmanagement erfolgte mit einem strategischen PGF<sub>2α</sub>-Programm.

### **3.2.2 Versuchstiere**

Für die Untersuchungen kamen alle laktierenden Kühe in Betracht, die im Rahmen der zweimal täglich beim Melkvorgang im Melkstand des Betriebes durchgeführten Kontrollen aufgrund klinischer Mastitisercheinungen auffielen.

Die Untersuchungseinheit war definiert als Behandlungseinheit und war damit das individuelle Euterviertel des in die Untersuchung aufgenommenen Tieres.

Aufgenommen wurden Tiere aus allen Laktationsstadien. Die Milchleistung der Versuchstiere sollte zehn Liter pro Tag vor Auftreten der Mastitis nicht unterschreiten basierend auf Daten des letzten sieben-Tage-Durchschnitts.

### **3.2.3 Einschlusskriterien für die Auswahl zur Behandlung**

Alle Milchkühe mit einer klinisch manifesten Mastitis, die durch oxacillinempfindliche Erreger hervorgerufen oder deren bakteriologische Untersuchung negativ war, wurden in die Untersuchung aufgenommen. Als Grundlage zur Definition „klinische Mastitis“ diente die Definition der International Dairy Federation (IDF) (1999), aus welcher sich die folgenden Einschlusskriterien ergaben:

- mindestens 500 000 Zellen pro ml Milch (CMT mindestens schwach positiv),
- Symptome einer klinischen Mastitis: Palpationsbefund 1-6, Sekretbefund 1-6 (siehe Befundschlüssel Tabelle 8 und 9).
- Einschlusskriterien und Studiendurchführung in Einklang mit den EU-Richtlinien „Guidelines for the testing of medicinal products“, „Veterinary Medicinal Products administered via the teat duct to lactating cows for the treatment of clinical mastitis“ Vol. VII, Sept. 1994, EU-Commission (1994a,b) und die GCVP Guidance FEDESA (1993)

Tabelle 8: Befundschlüssel zur klinischen Untersuchung des Euters und des Allgemeinzustandes (modifiziert nach Stöber und Grunert, 1990)

---

Parameter	Einstufung
Allgemeinbefund	0 = o.b.B. 1 = geringgradig gestört 2 = mittelgradig gestört 3 = hochgradig gestört
Körpertemperatur	in Grad C° (Messwert)
Zitzen-/Euterabnormalitäten	0 = o.b.B., Freitext
Euterhaut	0 = o.b.B. 1 = nicht abziehbar 2 = kalt 3 = verdickt
Zitzenzisterne/ Zitzenwand/Strichkanal	0 = o.b.B. 1 = geschwollen, schmerzhaft 2 = akute Verletzung 3 = Narbe 4 = Stenose
Euterdrüsengewebe	0 = o.b.B. = insgesamt feinkörnig weich 1 = insgesamt grobkörnig aber weich 2 = allgemein grobkörnig, derb mit einzelnen Knoten 3 = allgemein grobknotig 4 = grobknotig mit einzelnen diffusen Verhärtungen 5 = insgesamt diffus verhärtet 6 = akut geschwollen, vermehrt warm, schmerzhaft 7 = abkalbbedingtes Euterödem
Euterdrüsenzisterne	0 = o.b.B. 1 = geschwollen

---

Tabelle 9: Befundschlüssel zur Sekretuntersuchung (Stöber und Grunert, 1990)

Parameter	Einstufung
grosbsinnliche Beurteilung des Milchsekretes	0 = o.b.B., sinnfällig unverändert 1 = Milchcharakter erhalten, wässrig 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 aufgehoben
Beimengungen	0 = keine 1 = Eiter (E) 2 = Blut (B) 3 = Fibrinflocken (F) 4 = Schleim (S)
California-Mastitis-Test (CMT) Entfärbung	- = nein + = ja
CMT Einstufung	0 = -, o.b.B. 1 = (+), leichte Schlierenbildung 2 = +, verstärkte Schlierenbildung 3 = ++, leichte Gelbildung 4 = +++, starke Gelbildung

### 3.2.4 Allgemeine Untersuchungen

Bei einem für die Untersuchung in Frage kommenden Tier wurden zunächst die Einschlusskriterien soweit möglich sorgfältig überprüft. Einige Kriterien ließen sich erst im Nachhinein prüfen (BU-Befund, Hemmstoffe, Oxacillinresistenz) und führten zum nachträglichen Ausschluss der Tiere. Erfüllte ein Tier alle Kriterien zur Aufnahme in die Studie, wurden die Stammdaten dieses Tieres auf einem entsprechenden Befundbogen (siehe Anlage 1) erfasst. Jeder Proband wurde dann vor der ersten Behandlung (Tag 0) und an den beiden folgenden Behandlungstagen (Tag 1 und 2) klinisch untersucht. Tiere, die in der abendlichen Melkzeit mit einer Mastitis erkrankt wurden, behandelte das Melkpersonal nach erfolgter Milchprobennahme durch intrazisternale Eingabe eines Euterinjektors mit 1000 mg Oxacillin. Das Melkpersonal war von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bestandsbetreuung und Qualitätsmanagement entsprechend geschult worden. Dem Untersucher wurden diese Tiere am nächsten Morgen vorgestellt.

Am Tag 7, 14 und 21 nach Behandlungsbeginn erfolgten drei weitere klinische Untersuchungen. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung wurden in entsprechenden Befundbögen (Anlage 1) protokolliert.

Im Rahmen des Versuches wurden am Tag 0 die folgenden Stammdaten erhoben und protokolliert:

- Fallnummer,
- Ohrmarkennummer bzw. Halsbandnummer zur eindeutigen Identifikation,
- Alter in Monaten,
- geschätzte Körpergewicht (kg) und Body condition score (BCS),
- aktuelle Milchleistung (l),
- Anzahl der Laktationen,
- Datum der letzten Abkalbung und
- Laktationsmonat.

Des Weiteren wurde dokumentiert, ob in der letzten oder in der aktuellen Laktation zuvor schon eine klinische Mastitis diagnostiziert und behandelt worden war (soweit bekannt).

Die allgemeinen klinischen Untersuchungsparameter und die das entzündete Euterviertel betreffenden Parameter sowie deren Bewertungsschemata sind Tabelle 8 und 9 zu entnehmen.

### **3.2.5 Weitergehende Untersuchungen**

Neben der klinischen Untersuchung des Tieres und des Euters wurden je Tier vier Anfangsviertelgemelksproben an den Tagen 0, 14 und 21 zur mikrobiologischen Untersuchung entnommen.

Zusätzlich wurde vor der ersten Behandlung ein Einzelkuhgemelk genommen, das auf das Vorhandensein von Rückständen (Hemmstoffen) mittels Rückstandstest nach KUNDRAT untersucht wurde. Die Untersuchung wurde vom Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen, Berlin, vorgenommen.

Die Anfangsviertelgemelksproben wurden grobsinnlich beurteilt und zytologisch in einer California–Mastitis–Test–Schale mit vier Vertiefungen untersucht. Die Befunde wurden auf den Protokollbögen notiert. Das Beurteilungsschema ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Mikrobiologische Untersuchungen der an den Tagen 0, 14 und 21 entnommenen Anfangsviertelgemelksproben wurden vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin, durchgeführt.

Nach sorgfältiger Durchmischung der Proben wurde jeweils ein Inokulum von 0,01 ml auf einer Blutagarplatte mit 5 % Schafblutzusatz, einer Gassner-Platte und einer Agarplatte mit Schafblut und Äsculin ausgestrichen und 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet.

Die Identifizierung der Erreger erfolgte anhand des Wachstumsverhaltens, der Koloniemorphologie, Farbpigmentierung, Äsculinspaltung und Hämolysebildung, Gramfärbung und des Phänomens nach Christie, Atkin und Munch-Petersen (CAMP-Test).

Die Bestimmung der Empfindlichkeit der isolierten Staphylokokken und Streptokokken gegenüber Oxacillin erfolgte mittels Agardiffusionstest gemäß den Anforderungen der DIN/ISO 58940 (Resistenztest).

### **3.2.6 Probennahme**

Die Anfangsviertelgemelksproben wurden grobsinnlich beurteilt und zytologisch in einer California-Mastitis-Test-Schale mit vier Vertiefungen untersucht. Die Befunde wurden auf den Protokollbögen notiert. Das Beurteilungsschema ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Anschließend wurden Zitzenkuppe und -öffnung gründlich mit einem separaten alkoholgetränkten (70 %-iger Ethylalkohol) Zellstofftupfer für etwa 15 Sekunden pro Zitze gereinigt und desinfiziert, wobei die Zitzen der vom Probennehmer abgewandten Euterseite zuerst gereinigt und desinfiziert, jedoch zuletzt geprobt wurden. Die Probennahme erfolgte mit möglichst geringem Druck und vorzugsweise durch ein einziges Entleeren der Zitze in sterile Glasröhrchen, wobei das Zitzenende den Rand des Probengefäßes nicht berührte.

### **3.2.7 Beurteilung der Behandlung**

#### **3.2.7.1 Erfolg**

Der Erfolg der durchgeführten Therapie wurde jeweils an den Tagen 7, 14 und 21 beurteilt. Der klinische Verlauf wurde anhand der klinischen Einstufungen (*clinical scores*) des Palpationsbefundes, der grobsinnlichen Sekretbeschaffenheit und des Allgemeinbefindens überwacht.

Die Behandlung wurde als klinischer Heilungserfolg eingestuft, wenn der Allgemeinzustand des Tieres ohne besonderen Befund und die Körperinnentemperatur  $\leq 39,0^{\circ}\text{C}$  war. Das erkrankte Euterviertel musste frei von akuten entzündlichen Veränderungen, wie vermehrte Wärme, Schmerzhaftigkeit und/ oder Schwellung sein. Die entnommene Milchprobe musste in der

grobsinnlichen Beurteilung einen Normalbefund aufweisen. Bei der zytologischen Beurteilung mittels CMT wurde auch eine noch stark positive Reaktion (CMT +++) zugelassen.

Die nach Erregerart zu differenzierende bakteriologische Heilung des Euterviertels lag vor, wenn die in der Milchprobe am Tag 0 diagnostizierte Bakterienspezies aus den auf die Behandlung folgenden Milchproben (Tag 14, 21) nicht mehr isoliert werden konnte. Es wurden nur Tiere einbezogen, die auch klinisch geheilt worden waren, da bei den klinisch nicht geheilten Tieren ein Therapiewechsel vorgenommen werden musste. Aufgrund der erneuten Behandlung war die bakteriologische Wirksamkeit bezogen auf das eigentliche Medikament nicht mehr aussagefähig.

### **3.2.7.2 Misserfolg und Therapiewechsel**

Bei ausbleibender und auch weiterhin nicht zu erwartender Besserung oder Verschlechterung der Mastitis während oder nach der Behandlung wurde eine unterstützende oder erneute Behandlung eingeleitet und diese dokumentiert.

Der Befund am Tag 7 (fünf Tage nach dreimaliger Behandlung) wurde aus Gründen der Praktikabilität und Compliance des Betriebes als Indikator für einen Therapiewechsel eingestuft. Wenn die unter 3.2.7.1 genannten Kriterien bis zu diesem Zeitpunkt nicht erfüllt waren, wurde eine erneute Therapie eingeleitet.

### **3.3 Versuchsabschnitt 2**

#### **3.3.1 Versuchsbetrieb**

Die Untersuchungen wurden in einem Milchviehbetrieb in Brandenburg mit ca. 2.900 Kühen der Rasse Deutsche Schwarzbunte durchgeführt. Die durchschnittliche Milchleistung der Herde betrug während des Untersuchungszeitraumes ca. 7.100 kg pro Kuh und Jahr bei 4,1 % Fett und 3,4 % Eiweiß.

Ihr Futter erhielten die Tiere als Grundfuttermischung mit leistungsbezogener transpondergestützter Kraftfutterzulage. Die Remontierungsrate des Betriebes (Anzahl selektierter Tiere \* 100 / Anzahl Abkalbungen) lag im Untersuchungszeitraum bei ca. 30 Prozent.

Die Kühe wurden unter antibiotischem Schutz mit Benestermycin<sup>®</sup> (Framycetin und Penicillin, Boehringer Ingelheim) trocken gestellt.

Die Kühe wurden zweimal täglich in einem 60er Melkkarussell (Fa. Impulsa, Elsterwerda) mit einer Kapazität von etwa 450 Tieren pro Stunde gemolken. Die Melkarbeit wurde in zwei Schichten geleistet, in denen jeweils fünf Melker tätig waren. Zur Melkhygiene gehörte das trockene Reinigen der Zitzen mit Euterlappen, die nach jeder Kuh gewechselt wurden, die visuelle Vorgemelksprüfung und das Zitzendippen nach dem Melken mit einem jodhaltigen Dippmittel. Frischabgekalbte und kranke Tiere wurden im Abkalbe- bzw. im Krankenabteil mit einer Rohrmelkanlage (Fa. Impulsa) gemolken. Routinemäßige Kontrollen der Melkanlage wurden regelmäßig durchgeführt. Für die Milchkontrolle war der Landeskontrollverband Brandenburg (Waldsiefersdorf) zuständig.

Die tierärztliche Betreuung wurde von zwei niedergelassenen Tierärzten durchgeführt.

#### **3.3.2 Versuchstiere**

Für die Untersuchungen kamen alle laktierenden Kühe in Betracht, die im Rahmen der zweimal täglich beim Melkvorgang im Melkstand des Betriebes durchgeführten Kontrollen aufgrund klinischer Mastitisercheinungen auffielen. Aufgenommen wurden Tiere aus allen Laktationsstadien post partum (p. p.).

### **3.3.3 Allgemeine Untersuchungen**

Bei einem für die Untersuchung in Frage kommenden Tier wurde zunächst eine grobsinnliche Prüfung des Eutersekrets sowie der California-Mastitis-Test (CMT) durchgeführt. Unmittelbar nach dem Ausmelken erfolgte eine klinische Befunderhebung des Euters und des Allgemeinzustandes. Alle Kühe mit einer klinisch manifesten Mastitis wurden in die Untersuchung aufgenommen. Als Grundlage zur Definition klinische Mastitis diente die Definition der International Dairy Federation (IDF) (1999), aus welcher sich die folgenden Einschlusskriterien ergaben:

- mindestens 500.000 Zellen/ ml Milch (CMT mindestens schwach positiv),
- klinische Symptome einer klinischen Mastitis (Palpationsbefund 1-6, Sekretbefund 1-6; siehe Befundschlüssel Tabelle 8 und 9).

Neben der Fallnummer, der Ohrmarke, dem geschätzten Körpergewicht, dem Body condition score (BCS) und dem betroffenen Euterviertel sowie dem Kontrollviertel wurden sämtliche klinischen Befunde auf dem Untersuchungsbogen (Anlage 2) festgehalten. Als Kontrollviertel diente jeweils das gesunde Viertel der anderen Seite. Verglichen wurde immer Vorderviertel mit Vorderviertel und Hinterviertel mit Hinterviertel.

### **3.3.4 Probennahme**

Die Anfangsviertelgemelksproben wurden grobsinnlich beurteilt und zytologisch in einer California–Mastitis–Test–Schale mit vier Vertiefungen untersucht. Die Befunde wurden auf den Protokollbögen notiert. Das Beurteilungsschema ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Die Probennahme erfolgte wie unter 3.2.6 beschrieben.

### 3.3.5 Weitergehende Untersuchungen

Neben der klinischen Untersuchung des Tieres und des Euters wurden jeweils zwei Probenröhrchen von dem erkrankten sowie vom parallelen Kontrollviertel, die zur bakteriologischen und biochemischen Untersuchung bestimmt waren, befüllt. Die genommenen Proben wurden umgehend gekühlt und zur bakteriologischen Untersuchung an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin transportiert und untersucht.

Die bakteriologische Diagnostik erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben.

Konnte aus einer Milchprobe eines erkrankten Euterviertels kein pathogener Keim isoliert werden, schloss sich infolge dessen eine Untersuchung auf Hemmstoffe an (Delvotest SP, Gist-brocades, Nijmegen, NL).

Die Milchproben zur Bestimmung der Konzentration von Lysozym und Laktoferrin sowie der Aktivität des Laktoperoxidase–Thiozyanat–Wasserstoffperoxid System wurden ihrer weiteren Aufbereitung zugeführt. Diese bestand aus Entfetten durch Zentrifugation bei ca. 12000 x g, dem Portionieren ( 2 x 3ml) sowie dem Einfrieren der Proben bei –25°C.

#### 3.3.5.1 Bestimmung der Lysozymkonzentration

Beim Nachweis der Lysozymkonzentration in der Milch handelte es sich um einen modifizierten Agardiffusionstest nach Goldbach und Herzog (1962) in Anlehnung an Schulze und Müller (1980). Das Prinzip dieser Lysoplate–Technik basiert auf der Lyse der im Agargel suspendierten Bakterien durch die lytische Wirkung des Lysozyms.

Zur Herstellung des Agars wurden 330 mg *Micrococcus lysodeicticus* Lyophilisat (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 24 ml 0,5 %-iger Natriumchloridlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde zu 600 ml 1,5 %-igem Agar noble (Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA), gelöst in 0,5 %-iger Natriumchloridlösung (pH = 6,4) und auf 60°C abgekühlt, hinzugefügt. Nach Zugabe von 0,02 % Natriumacid (Merck Eurolab GmbH, Berlin) erfolgte das Gießen von 40 ml Agar in Petrischalen (150 x 25 mm) auf einem Niveliertisch.

Zum Untersuchen der Milchproben wurden nach dem Abkühlen des fertigen Agars je 15 Löcher mit einem Korkbohrer (Ø 8,5 mm) gestanzt und 0,1 ml des Eutersekrets bzw. der Lysozymeichlösungen, in den Konzentrationen 10, 5, 2,5, 0,625 und 0,156 µg/ ml Lysozym in 0,5 %-iger NaCl, eingefüllt. Die Milchproben wurden jeweils im Doppelansatz untersucht. Die Eichreihe wurde auf jeder Platte mitgeführt.

Die Eichlösungen wurden durch Herstellung und anschließender Verdünnung einer Lysozymstandardlösung mit einer Konzentration von 50 µg/ ml durch Auflösen des Lysozyms (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 0,5 %-iger Natriumchloridlösung angefertigt.

Der Lysozymgehalt einer Probe wurde durch Ablesen der Hemmhöfe und Berechnung des Mittelwertes aus den beiden Werten der Doppelbestimmung mit folgender Formel ermittelt:

$$K = \frac{KS_1 + \frac{KS_2 - KS_1}{HS_2 - HS_1} \times (H - HS_1)}{HS_2 - HS_1}$$

K = Konzentration der untersuchten Probe in µg/ ml

KS<sub>1</sub> = Konzentration des nächst kleineren Standards

KS<sub>2</sub> = Konzentration des nächst größeren Standards

HS<sub>1</sub> = Hemmhof des nächst kleineren Standards in mm

HS<sub>2</sub> = Hemmhof des nächst größeren Standards in mm

H = Hemmhof der Milchprobe in mm

### **3.3.5.2 Bestimmung der Aktivität des Laktoperoxidase – Thiozyanat – Wasserstoffperoxid Systems**

Beim Nachweis der Aktivität des Laktoperoxidase–Thiozyanat–Wasserstoffperoxid Systems (LPS) handelte es sich um eine spektrophotometrische Messung nach der Beschreibung von Björck und Mullan (1993) auf Grundlage der Entwicklung von Shindler et al. (1976).

Zur Bestimmung der LPS – Aktivität wurden die Milchproben am Tag der Probennahme untersucht. Gearbeitet wurde bei Raumtemperatur (20 ± 2°C). 30µl der zu untersuchenden Milchprobe wurden zu 6 ml Substratlösung, bestehend aus 1 mM 2,2–acino–bis (3–ethylbenzthiazoline-6–sulfonicacid) (ABTS) (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gelöst in 0,1 M Azetatpuffer (pH 4,4), gegeben und gut vermischt.

Die so angesetzte Probe wurde zu je 2,5 ml auf zwei Einmalküvetten aufgeteilt, welche dann in ein Photometer gegeben wurden. Technisch bedingt mussten die Messungen nacheinander durchgeführt werden. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 413 nm. Vor Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu der zu untersuchenden Probe musste darauf geachtet werden, dass sich ein stabiler Grundwert eingestellt hat. Nach Zugabe des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ermittelte das Photometer viermal im Abstand von jeweils einer Minute die Exstinktionsänderung. Am Ende der Messungen errechnete das Photometer den Mittelwert der erhaltenen Werte und somit die durchschnittliche Exstinktionsänderung pro Minute, welche zur Berechnung der Laktoperoxidaseaktivität notwendig war.

1 Unit (U) der Laktoperoxidaseaktivität ist definiert als die Enzymmenge, die die Oxidation von einem Mikromol Substrat pro Minute katalysiert. Errechnet wurde die Aktivität nach folgender Formel:

$$\frac{\Delta A_{413}/\text{min} \times \text{Gesamtvolumen (ml)}}{32,4 \times \text{Probenvolumen}}$$

### 3.3.5.3 Bestimmung der Laktoferrinkonzentration

Beim Nachweis des Laktoferrins handelte es sich um einen Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) nach Meisel (1990).

Das Entfetten der Milchproben geschah durch Zentrifugation mit 12.000 x g für 10 Minuten. Danach wurden die Proben 1:400 in phosphate buffered saline with tween (PBST) (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) (pH 7,2) verdünnt.

Jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurde mit 100 ng Laktoferrin (aus Kuhmilch, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), gelöst in 100 µl Beschichtungspuffer, beschichtet und über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Der Beschichtungspuffer setzte sich zusammen aus 9 ml 0,2 mol/l NaCO<sub>3</sub> (Merck Eurolab GmbH, Berlin), 16 ml 0,2 mol/l NaHCO<sub>3</sub> (Merck Eurolab GmbH, Berlin) und 75 ml Aquabidest.

200 µl der verdünnten Probe und 200 µl IgY-Antikörperverdünnung (1:1000 in PBST) (Meisel, Institut für Chemie und Physik, Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel) wurden in Polypropylenröhrchen gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die mit Laktoferrin beschichteten Platten wurden nach der Inkubation zweimal mit PBST gewaschen.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Platten mit 200 µl 0,5 % Gelatine (Merck Eurolab GmbH, Berlin) pro Vertiefung eine Stunde inkubiert und danach zweimal mit PBST gewaschen.

100 µl der Proben–IgY-Mischung wurden in jede Vertiefung gegeben und die Platten bei 37°C für zwei Stunden in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Untersuchungen wurden als Doppelprobe durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Platten fünfmal mit PBST gewaschen.

100 µl des Enzymkonjugats (rabbit anti-chicken-IgY-peroxidase, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande), 1:10.000 verdünnt in PBST 0,5 % Caseinpepton (Merck Eurolab GmbH, Berlin) enthaltend, wurden in jede Vertiefung gegeben und die Platten bei 37°C für zwei Stunden in einer Feuchtkammer inkubiert. Es folgte fünffaches Waschen der Platten mit

PBST. Anschließend wurden 100 µl der Enzymsubstratlösung in jede Vertiefung gegeben. Die Enzymsubstratlösung war wie folgt zusammengesetzt: 0,04 % ABTS und 0,006 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck Eurolab GmbH, Berlin) in Phosphat–Citrat-Puffer (pH 4) bestehend aus 19,3 ml 0,2 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck Eurolab GmbH, Berlin), 30,7 ml 0,1 mol/l citricacid (Merck Eurolab GmbH, Berlin) und 50 ml Aquabidest.

Die Platten wurden bei Raumtemperatur zehn Minuten lichtgeschützt auf einem *orbital plate shaker* inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, erfolgte die Zugabe von 50 µl 1,5 %-igem Natriumfluorid (Merck Eurolab GmbH, Berlin) in derselben Reihenfolge, wie auch das Enzymsubstrat zugegeben wurde. Zuletzt wurde die Exstinktion bei 410 nm gegen die reine Enzymsubstratlösung mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes (Bio Tek Instruments, Vermont, USA) direkt durch den Plattenboden gemessen.

### 3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS<sup>®</sup> für Windows (SPSS Inc. München, Version 10.0).

Heilungsraten und ordinale Daten wurden mit dem Chi–Quadrat Test verglichen. Da bei Enzymaktivitäten und Konzentrationen nicht von symmetrischen Verteilungen ausgegangen werden kann, wurden nichtparametrische Verfahren verwendet.

Für den Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollviertel wurden der Wilcoxon-signed rank Test verwendet. Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurden mit dem Mann–Whitney–U–Test durchgeführt, Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen als Kruskal–Wallis–Test. Korrelationen wurden als Rangkorrelation nach Spearman analysiert. Für alle Vergleiche wurde  $\alpha = 0,05$  gesetzt.