

ETABLIERUNG EINER GEWEBEENTNAHMETECHNIK AM BOVINEN EUTER

SIMON BECK



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

Etablierung einer Gewebeentnahmetechnik am bovinen Euter

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Simon Beck
Tierarzt aus Würzburg (Bayern)

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend

PD Dr. A. Schönfelder

Tag der Disputation: 04. März 2011

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Simon Beck

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Das bovine Euter	2
2.1.1	Anatomie des bovinen Euters	2
2.1.2	Histologie des bovinen Euters	5
2.2	Sonomorphologie des Euters beim Rind.....	6
2.2.1	Gesundes Euter	7
2.2.2	Erkranktes Euter	8
2.3	Endoskopie am bovinen Euter	9
2.4	Biopsie am bovinen Euter	10
3	Material und Methoden	13
3.1	Material	13
3.1.1	Lebende Tiere und Schlachthoforgane	13
3.1.2	Sonographie	13
3.1.3	Milchproben	15
3.1.4	Biopate.....	15
3.1.5	Gewebeproben	16
3.1.6	Histologie	16
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Euteruntersuchung.....	17
3.2.2	Sonographie	17
3.2.3	Milchprobenentnahme	18
3.2.4	Biopatientnahme.....	19
3.2.5	Gewebeprobengewinnung	21
3.2.6	Histologie	21
3.2.6.1	Untersuchungsmaterial	21
3.2.6.2	Histologische Untersuchung	21
3.2.6.2.1	Fixierung des Probenmaterials	21
3.2.6.2.2	Einbettung des Probenmaterials.....	22
3.2.6.2.3	Herstellung der Gewebeschnitte	23
3.2.6.2.4	Färbung der Gewebeschnitte.....	24
3.2.6.3	Lichtmikroskopische Auswertung.....	25
3.3	Untersuchungsziele	25

3.4	Statistische Methoden.....	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Sonographische Euteruntersuchung an lebenden Tieren	27
4.2	Biopotentnahme an Organen.....	32
4.3	Biopotentnahme an lebenden Tieren	34
4.3.1	Milchbefunde vor und nach der Biopotentnahme.....	38
4.3.2	Mikrobiologische Befunde	40
4.3.2.1	Milch	40
4.3.2.2	Gewebe	42
4.4	Histologische Befunde	44
4.5	Korrelation der mikrobiologischen und histologischen Befunde.....	50
5	Diskussion	56
5.1	Diskussion der Fragestellung.....	56
5.2	Diskussion der Methode	57
5.3	Diskussion der Ergebnisse	60
5.3.1	Ultrasonographische Ergebnisse	60
5.3.2	Histologische Ergebnisse.....	60
5.3.3	Mikrobiologische Ergebnisse	61
5.3.4	Korrelation der histologischen mit den mikrobiologischen Ergebnissen..	64
5.4	Praktische Hinweise für die Biopotentnahme am bovinen Euter.....	66
6	Zusammenfassung.....	67
7	Summary	70
8	Literaturverzeichnis	73

1 Einleitung

Eine der Hauptnutzungsrichtungen in der Rinderwirtschaft ist die Milchkuhhaltung. Mit der Konsummilchproduktion nimmt sie, neben der Einkommensgrundlage für die Milcherzeuger, eine bedeutende Stellung in der Grundnahrungsmittelproduktion ein und ist die Basis für viele weitere Wirtschaftszweige. Die Eutergesundheit, vor allem in Hinblick auf bakterielle Entzündungen, ist somit von großer ökonomischer Bedeutung (DOBBINS, 1977; BLOSSER, 1979; KOSSAIBATI und ESSLEMONT, 1997) und spielt eine wichtige Rolle, um das Produkt Milch einwandfrei und in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen.

Die herkömmliche Diagnostik in Form von Milchprobenuntersuchungen stößt zum Teil an ihre Grenzen, wenn es sich um intermittierende Erregerausschüttung handelt oder wenn diese in tieferen Schichten sind. Dann wäre ein weiterführendes Verfahren wie zum Beispiel eine Biopsientnahme geeignet, um an diesem Punkt weiterzukommen. Zudem könnte durch die Gewebeentnahme in vivo das Verhalten der Erreger in der Milchdrüse besser untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher ein schonendes Verfahren am laktierenden Rindereuter zur Biopsientnahme zu entwickeln. Der Schwerpunkt lag zu Beginn in der sonographischen Exploration der bovinen Milchdrüse, um geeignete Stellen zu finden und wandelte sich später zur praktischen Durchführung von Biopsientnahmen, welche dann noch auf ihre Verwertbarkeit untersucht wurden.

2 Literaturübersicht

2.1 Das bovine Euter

2.1.1 Anatomie des bovinen Euters

Die Milchdrüse (Mamma) ist eine Besonderheit der Säugetiere (Mammalia). Sie gehört als modifizierte exokrine Schweißdrüse vom tubuloalveolären und zusammengesetzten Typ zu den Hautanhangsorganen (KOCH, 1956). Beim Rind wird sie als Euter (Über, griech. Mastos) bezeichnet. Sie befindet sich in der *Regio inguinalis* zwischen und vor den Hintergliedmaßen an der ventralen Bauchwand, ist bilateral symmetrisch und besteht aus zwei Mammarkomplexen pro Körperhälfte mit dem *Sulcus intermammarius* als Mittellinie zwischen den beiden Seiten (BRAGULLA und KÖNIG, 1999; GEYER, 2005). Diese vier Mammarkomplexe beziehungsweise Viertel bilden zusammen die Form einer Halbkugel (HABERMEHL, 1996). Jeder dieser vier Mammarkomplexe besitzt eine Zitze (*Papilla mammae*) von 6 bis 8 cm Länge und zylindrischer Form mit abgerundetem Ende. Auf Grund ihrer Lage werden die beiden kranialen Zitzen als Bauchzitzen und die beiden kaudalen Zitzen als Schenkelzitzen bezeichnet. Analog dazu ist die Aufteilung der Viertel in Bauchviertel und Schenkelviertel (KOCH und BERG, 1993).

Die Haut über dem Euter lässt sich im Gegensatz zur Haut der Zitzen, die einen bedeutenden Anteil derer Wandung ausmacht, leicht von der Unterlage abheben und ist weniger dick. So zeichnen sich unter ihr die oberflächlichen Eutervernen relativ gut ab. Die Behaarung ist wenig ausgeprägt und die einzelnen Haare sind von dünner Beschaffenheit. An der kaudalen Seite bilden sie zwei Haarwirbel, welche auch als Milchspiegel bezeichnet werden, jedoch keinerlei Aussage über die Milchleistung des selbigen Tieres zulassen (HABERMEHL, 1996).

Bei der nächsten Schicht unter der Haut handelt es sich um den Aufhängeapparat (*Apparatus suspensorius mammarius*) der Milchdrüse. Er befestigt das Euter an der Bauchdecke durch Abspaltungen des oberflächlichen und des tiefen Blattes der äußeren Rumpffaszie (*Fascia trunci externa*). An den Seiten sind es die Außenblätter (*Laminae laterales*) und in der Medianen ist es ein doppelschichtiges Innenblatt, mit je einem elastischen Innenblatt (*Laminae mediales*) pro Euterhälfte, die vom tiefen Blatt ausgehen. Von diesen Blättern spalten sich wiederum feine Anteile (*Lamellae suspensoriae*) ab (BRAGULLA und KÖNIG, 1999). Sie strahlen als interstitielles Bindegewebe in den Drüsenkörper aus und unterteilen ihn in Lappen und Läppchen

(MICHEL, 1979b). Einzelnen betrachtet bilden die beiden Außenblätter die Euterkapsel (*Capsula uberis*). Der vom oberflächlichen Blatt ausgehende Anteil ist dünn und überzieht die Milchdrüse lediglich (KOCH und BERG, 1993).

An der Zitzenkuppe mündet der Strichkanal als Milchausführungsgang in der Strichkanalöffnung (*Ostium papillare*) (KOCH, 1956). Nach dorsal folgt ein Hohlraum (*Sinus lactifer*), welcher im Bereich der Zitze als *Pars papillaris sinus lactiferi* und im darauffolgenden bis ins Drüsengewebe vordringenden Bereich als *Pars glandularis sinus lactiferi* bezeichnet wird (HABERMEHL, 1996). Hier münden die Milchgänge (*Ductus lactiferi*) als Sammelrohre der sezernierenden Milchdrüsenröhrchen, welche die Drüsenläppchen des Parenchyms bilden (ZIETSCHMANN, 1985).

Die arterielle Hauptversorgung des bovinen Euters erfolgt über die *Arteria pudenda externa* (LE ROUX und WILKENS, 1959). Nach Durchtritt durch den Leistenspalt teilt sich diese in einen kranialen (*Arteria mammaria cranialis*) und in einen kaudalen Ast (*Arteria mammaria caudalis*). Zusätzlich tritt der ebenfalls als *Arteria mammaria caudalis* bezeichnete Ast der *Arteria thoracica interna* von kranial an die Milchdrüse heran, um mit der *Arteria mammaria cranialis* der *Arteria pudenda externa* zu anastomosieren. Das gleiche findet mit dem *Ramus labialis dorsalis et mammarius* der *Arteria pudenda interna* statt, der mit dem kaudalen Ast der *Arteria pudenda externa* (*Arteria mammaria caudalis*) anastomosiert (EL HAGRI, 1945; ZIETSCHMANN, 1985; HABERMEHL, 1996; GEYER, 2005). Der Abfluss des Blutes geschieht über die gleichbenannten Venen. Auch hier stellt wieder die *Vena pudenda externa* den Hauptabfluss dar, welcher über die *Vena mammaria cranialis* und die *Vena mammaria caudalis* gespeist wird. Über die *Vena mammaria cranialis*, die sich nach kranial, subkutan verlaufend, in der *Vena epigastrica cranialis superficialis* (Milchader) fortsetzt und zwischen 8. Rippenknorpel und Schaufelknorpel ihren Durchtritt durch die Bauchdecke hat (Milchnäpfchen), existiert ein zweiter Abfluss. Ein möglicher dritter Abfluss ist durch den *Ramus labialis dorsalis et mammarius*, welcher von der *Vena mammaria caudalis* ausgeht, in die *Vena pudenda interna* gegeben. Eine Besonderheit beim Rindereuter stellt der an der Zitzenbasis befindliche FÜRSTENBERGSCHER Venenring dar. Er hat die Aufgabe diese Stelle vor einer zu starken Ausweitung zu bewahren. Die vielen Anastomosen stellen sicher, dass die Milchdrüse selbst bei Kompression eines Gefäßes, wie es durch Niederlegen der Fall sein kann, noch ausreichend mit Blut versorgt wird und es zu keiner Abflussstörung kommt. (GEYER, 2005; GLÄTTLI, 1924; HABERMEHL, 1996; ZIETSCHMANN, 1985).

Die Lymphdrainage des bovinen Euters erfolgt über ein Netz von Lymphkapillaren und Lymphgefäßen. Letztere können einen Durchmesser von bis zu 7 mm aufweisen und sich untereinander verbinden. Sie besitzen alle im Abstand von 0,6 bis 1,8 cm Klappen. Die Lymphgefäße der Zitze, der Euterhaut, des subkutanen Fettgewebes und die oberflächlichen Parenchymlymphgefäße je einer Euterhälfte ziehen subkutan auf der lateralen Euterseite in Richtung Euterbasis und münden in den *Lymphonodus inguinalis superficialis proprius*, welcher zum *Lymphocentrum inguinale superficiale* gehört. Er befindet sich dorsal zwischen Milchdrüse und medialer Schenkelfläche. Seine räumliche Ausdehnung beträgt in der Länge und Höhe etwa 6 cm und ist 2 cm dick. Die tiefen Parenchymlymphgefäße verlaufen direkt zum *Lymphonodus inguinalis profundus* des *Lymphocentrum inguinale profundum*. Hier treffen auch Gefäße vom oberflächlichen Euterlymphknoten und den Fettmassen der Euterbasis ein. Seine Position ist noch weiter dorsokranial vom Oberflächlichen und er hat die Form einer Zigarre mit kraniokaudaler Längsachse. Der weitere Abfluss von hier aus erfolgt entlang der *Arteria iliaca externa* und über die seitliche Bauchwand in Lymphknoten des *Lymphocentrum iliosacrale* (KOCH und BERG, 1993; ZWART, 1911).

Für die sensible Innervation der bovinen Milchdrüse sind vier Spinalnerven verantwortlich. Die *Ramie cutanei ventrales* des *Nervus iliohypogastricus* und des *Nervus ilioinguinalis* versorgen die Haut der Bauchviertel und des kranialen Bereichs der Milchdrüsenbasis. Die restliche Haut, außer die Kaudalfläche des Euters, für die der *Ramus mammarius* des *Nervus pudendus* zuständig ist, das Drüsenparenchym und die Zitzen werden vom *Nervus genitofemoralis* innerviert. Die sympathischen Fasern des *Ganglion mesentericum caudale*, welche mit dem *Nervus genitofemoralis* durch den Leistenspalt bis ins Euterparenchym ziehen, stellen die vegetative Innervation dar (HABERMEHL, 1996; ZWART, 1911).

Neben dem beschriebenen Erscheinungsbild des bovinen Euters erwähnen BRAGULLA und KÖNIG (1999) noch Sonderformen, wie Hyperthelie, bei welcher überzählige Zitzen vorkommen, und Hypermastie, bei welcher den überzähligen Zitzen Drüsenkörper zugeordnet sind.

2.1.2 Histologie des bovinen Euters

Der Drüsenkörper der Milchdrüse besteht aus Drüsenalveolen, Milchgängen und der Milchzisterne. Mehrere Alveolen und kleine Milchgänge bilden ein Milchdrüsenläppchen (*Lobulus glandulae mammae*), welches von lockerem Bindegewebe (*Septa interlobularia*) umgeben ist. Die Milchdrüsenlappen (*Lobi glandulae mammae*) setzen sich aus vielen solchen Läppchen, die alle in einen Milchgang münden, zusammen und sind in grobe Bindegewebszüge (*Septa interlobaria*) gehüllt. Die Milchgänge vereinigen sich in Sammelgängen, um endgültig in die Zisterne (*Sinus lactiferus*) zu gelangen (LUDEWIG, 1997).

Die Wand der Drüsenalveolen (*Alveoli glandulae*) besteht aus einer Basallamina (*Membrana propria*), welche die Verbindung zum intraalveolären Bindegewebe darstellt, einer kontraktilen Zellschicht aus Myoepithelzellen beziehungsweise Korbzellen (*Myoepitheliocyti stellati*) mit Beteiligung an der Milchejektion und einem einschichtigen Drüsenepithel (BOMMELI, 1972). Das Erscheinungsbild der Epithelzellen hängt stark vom Sekretionszyklus ab und bewegt sich zwischen niedrig- bis hochprismatisch (SMOLLICH, 1992). Zusammen mit dem Endothel der perialveolären Kapillaren stellen diese Schichten die Blut-Milch-Schranke dar (LUDEWIG, 1996).

Die Alveolen sind maschenartig mit Blutgefäßen umgeben. Zwischen ihnen befinden sich Spalten im Gewebe, die als Lymphdrainage aus den Läppchen fungieren. Sie münden in ein Netz aus tiefen interlobulären Lymphgefäßen und stellen so zusammen mit den oberflächlichen Lymphgefäßen der Kapsel das Abflusssystem der Milchdrüse dar. Ein Teil der Nerven versorgt die Blutgefäße, der andere die Drüsen-schläuche. Letztere durchbrechen die Basalmembran und enden an den Drüsenzellen (ELLENBERGER und GÜNTHER, 1908).

Die Alveolen sitzen nacheinander mit den *Ductus alveolares* als Verbindungsstück an den kleinen intralobulären Milchgängen (*Ductus alveolares lactiferi*) (LUDEWIG, 1997). Sie sind mit einem einschichtigen kubischen Epithel ausgestattet und besitzen keine sekretorischen Eigenschaften mehr. Über diese gelangt die Milch in die größeren, in den interlobulären Bindegewebssepten verlaufenden, interlobulären Milchgänge (*Ductus lactiferi*). Sie besitzen ein zweischichtig abgeflachtes kubisches Epithel (CALHOUN und STINSON, 1976). Je weiter distal man sich in den Sammelgängen (*Ductus lactiferi colligentes*) in Richtung Milchzisterne (*Sinus lactifer*) befindet, desto mehr wandelt sich das Epithel von einem iso- zu einem hochprismatischen.

Das Epithel der Zisterne ist ebenfalls zweischichtig iso- bis hochprismatisch (LIEBICH et al., 2003). Die Milchgänge und der Milchsammelraum sind ebenfalls von einer Schicht aus glatter Muskulatur umgeben, welche nach distal immer prominenter wird und ebenfalls an der Milchejektion beteiligt ist (CALHOUN und STINSON, 1976). MICHEL (1979a) erwähnt ein Aufeinanderfolgen von weit- und englumigen Abschnitten, was einen kontinuierlichen Sekretablauf verhindert (SMOLLICH, 1992). Dies wiederholt sich auch in der Zisterne, welche durch eine Ringfalte in die Pars glandularis und Pars papillaris geteilt wird.

Zum Strichkanal (*Ductus papillaris*) geht das Epithel schlagartig in ein mehrschichtiges Plattenepithel über, das sich nach außen in der Hautdecke fortsetzt. Diese ist beim Rind haarlos und mit vielen Talgdrüsen versehen (KOCH, 1956; KRÖLLING, 1960). Zwischen äußerer Haut und Zitzenzisternenschleimhaut befindet sich die Muskelbindegewebsschicht aus kollagenen-elastischem Bindegewebe und glatten Muskelfasern, in welcher die Blutgefäße und Lymphgänge verlaufen. In der Strichkanalgegend sind die Muskelfasern besonders stark ausgeprägt und bilden damit den Schließmuskel (*Musculus sphincter papillae*) (HOSPES und SEEH, 1999).

Nach proximal folgt dann die Hautdecke des Euters mit wenigen Haaren, der sich in der Tiefe die bindegewebigelastische Euterkapsel anschließt (ELLENBERGER und GÜNTHER, 1908). Dieses Bindegewebe zieht zwischen die Lappen und Läppchen und ist somit der Versorgungsweg über den die Blutgefäße, Lymphgänge und Nervenfasern verlaufen (MICHEL, 1979b).

2.2 Sonomorphologie des Euters beim Rind

Die in der Literatur beschriebenen Informationen zu Ultraschalluntersuchungen am Rindereuter beginnen in den 80iger Jahren dieses Jahrhunderts (JENNINGER, 1989). Im Gegensatz zur Ultraschalluntersuchung an der Rinderzitze zur Abklärung von gedeckten Zitzenverletzungen wurde bisher über die Ultraschalldiagnostik am bovinen Euterparenchym nur wenig gearbeitet und in der Praxis ist dieses Verfahren nicht verbreitet (STOCKER und RÜSCH, 1997). In der Veterinärmedizin wird routinemäßig der Brightnes Mode (B-mode) oder two-dimensional (2-D) Ultraschall verwendet. Es gibt aber auch Angaben zum three-dimensional (3-D) Verfahren (FRANZ et al., 2004). In der Regel werden Schallfrequenzen zwischen 2 und 10 MHz eingesetzt (FLÜCKIGER, 1997). FLÖCK und WINTER (2006) setzen sogar Frequenzen bis

13 MHz ein. Als Schallköpfe kommen sowohl Linear- als auch Convexsonden zum Einsatz.

Die von der Sonde erzeugten hochfrequenten Schallwellen werden vom Gewebe durch verschiedene akustische Dichten (Impedanz) unterschiedlich reflektiert. Dabei wird die Stärke des rücklaufenden Echos mit den Begriffen stark echogen, schwach echogen und anechogen bezeichnet. Flüssigkeiten wie Milch zeichnen sich anecho-gen ab (CARTEE et al., 1986). Das Eutergewebe besteht aus Bindegewebe und Drüsenparenchym. Ersteres stellt sich stärker und zweiteres schwächer echogen dar (STOCKER und RÜSCH, 1997).

JENNINGER (1989) erarbeitete ein standardisiertes Vorgehen zum Ultraschalluntersuchungsgang am bovinen Euter. Sie untersuchte jedes Viertel separat und beginnt immer proximal mit vertikaler Schallkopfausrichtung. Zuerst verschafft sie sich einen Überblick und geht später genauer auf Auffälligkeiten ein. Hierzu kommen dann auch andere Sondenausrichtungen zum Einsatz.

Zu Beginn ihrer Arbeit stand die *invitro* Untersuchung von 20 Eutern wirtschaftlich verwerteter Rinder, um einen Überblick über die anatomischen Strukturen zu erhalten und um die Tauglichkeit der Ultraschallgeräte zu prüfen. Der nächste Schritt war die *in vivo* Untersuchung. Hier teilte sie die Tiere in zwei Gruppen ein. Zum einen waren es 84 weibliche Rinder mit bekannter Anamnese aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München, zum anderen waren es 100 Färsen und Kühe mit unbekannter Anamnese, welche auf dem Schlacht- und Viehhof München lebend vermarktet wurden, deren Euter ultrasonographisch untersucht wurden. Bei der zweiten Gruppe ging dem Ultraschall eine klassische klinische Diagnosestellung voraus und zum Teil folgte auch eine *postmortem* Untersuchung.

2.2.1 Gesundes Euter

Die Euterhaut stellt sich ultrasonographisch zweischichtig dar. Dabei ist die *Cutis* stärker und die *Subcutis* schwächer echogen. Blutgefäße die in der *Subcutis* häufig vorkommen stellen sich als anechogene Hohlräume dar. Durch die Mischung aus starken und schwachen echogenen Strukturen erscheint das Euterparenchym eines gesunden, laktierenden Rindes unstrukturiert mit feinen, diffus verteilten Echopunkten (JENNINGER, 1989). Nach TAKEDA (1989) und TROSTLE und O'BRIEN (1998) steht der anechogene Milchsammelraum nach proximal mit den ebenfalls anechogenen Milchgängen, die sich als röhrenförmige Gebilde abzeichnen, in Ver-

bindung. Die Bildmuster variieren jedoch zwischen einzelnen Individuen. Die Wandung des Milchsammelraumes zeigt sich als Mischung aus stärker und schwächer echogenen Falten. Die im schwach echogenen Drüsenparenchym gelegenen anechogenen Hohlräume können nur dann eindeutig in Milchgänge und Blutgefäße unterschieden werden, wenn eine direkte Verbindung der Milchgänge in den Milchsammelraum gegeben ist (CARTEE et al., 1986; FLÖCK und WINTER, 2006). Im Bereich des *Sulcus intermammarius* wird der Aufhängeapparat in Form von parallel angeordneten stärker echogenen Schichten, die in die Tiefe ziehen, sichtbar (JENNINGER, 1989).

2.2.2 Erkranktes Euter

Überzählige Zitzen

Mit Hilfe von Ultraschall kann man beim Vorliegen von *Hyperthelie* die Nebenzitzen identifizieren und es kann festgestellt werden, ob gemeinsames Drüsengewebe von beiden existiert (TROSTLE und O'BRIEN, 1989).

Euterödem

Die bei einem Euterödem in die Unterhaut eingelagerte Gewebeflüssigkeit zeigt sich ultrasonographisch in Form von wechselnden stärker echogenen und anechogenen Schichten. Ein länger bestehendes chronisches Ödem ändert sich vom flüssigkeitsgefüllten zum bindegewebigen Zustand und stellt sich so als homogene Verbreiterung der *Subcutis* dar (JENNINGER, 1989).

Euterhämatom

Zu Beginn ist der blutgefüllte anechogene Hohlraum sichtbar. Im Zuge der Koagulation erzeugt das Hämatom erst ein unregelmäßiges Echo, welches sich darauf in ein netzartiges Bild mit anechogenen Hohlräumen wandelt. Die Hülle besteht aus einer anechogenen inneren und einer stärker echogenen dünnen äußeren Schicht (JENNINGER, 1989).

Mastitiden

Bei Vorliegen einer *Mastitis catarrhalis* ist der stärker echogene Bildanteil vermehrt. Knotige Drüsengewebsveränderungen stellen sich echogener als die Umgebung dar und besitzen einen ungleichmäßigen anechogenen Rand. In den Milchräumen sind echogene Schwebeteilchen zu erkennen, welche sich in schweren Fällen so stark

vermehrten können, dass eine Unterscheidung des Gangsystems vom Drüsenparenchym unmöglich ist (JENNINGER, 1989).

Die für eine *Mastitis apostematosa* charakteristischen Abszesse erscheinen mit stärker echogener Abszesskapsel und schwächer echogenem gleichmäßigen Abszessinhalte. Mit zunehmendem Alter nimmt die Breite der Kapsel ab und das Echo verstärkt sich (STOCKER und RÜSCH, 1997; TROSTLE und O'BRIEN, 1998). In allen Altersstadien liegt der Abszesskapsel innen und außen ein dünner anechogener Bereich an (JENNINGER, 1989).

JENNINGER (1989) untersuchte jeweils eine Kuh mit gangraeneszierender Mastitis, einer Pilzmastitis und einer Nokardienmastitis. Bei der gangraenösen Form ist die Echogenität im Vergleich zu den gesunden Vierteln sichtbar erhöht und das Bild wirkt unscharf. Die Pilzmastitis zeigt sich ultrasonographisch unauffällig, wohingegen bei der Nokardienmastitis deutliche Veränderungen zu erkennen sind. Die Knoten im Drüsengewebe zeigen im Zentrum normale Echogenität und einen feinen fast anechogenen Randbereich. Gelegentlich ziehen von diesem aus anechogene Linien radiär in Richtung Mittelpunkt, wodurch ein kleeblattartiges Gebilde entsteht.

2.3 Endoskopie am bovinen Euter

Am Rindereuter wird die Endoskopie routinemäßig nur zur Detektion und operativen Behandlung von gedeckten Zitzenverletzungen oder Zitzenobstruktionen angewandt, welche in der Regel durch Milchabflussstörungen auffällig werden. Der Zugang erfolgt entweder via Strichkanal oder von lateral durch die Zitzenwand (HOSPES und SEEH, 1999).

VANGROENWEGHE et al. (2006) nutzen die Endoskopie bei acht Kühen zur Untersuchung der Drüsenzisterne und der großen Milchgänge. Dort konnten sie die Einmündungen der kleineren Milchgänge visualisieren. Die Sicht erhielten sie indem nach dem Melken und vollständigen Ablassen des Residualgemelkes ein Gemisch aus 20 ml Procain und 20ml steriler pyrogenfreier Kochsalzlösung durch den Strichkanal in die Zitzen- und Euterzisterne infundiert wurde. Mit Hilfe einer Biopsiezange entnahmen sie unter Sichtkontrolle Gewebe im Bereich des Milchsammelraumes. Dies gelang ohne dabei Blutungen zu verursachen.

Von SHAKESPEARE (1998) existiert ein Fallbericht, in welchem er mittels Endoskopie kleine Plastikstückchen in den Milchsammelgängen auffindet. Der Auslöser für

den Einsatz des Endoskops war ein Gebilde, welches zu Beginn der Untersuchung palpatorisch in der Zitze angesprochen wurde, aber beim weiteren Vorgehen nicht wieder aufzufinden war. Letztendlich stellte sich heraus, dass es sich dabei um Besamungspipettenstückchen handelte, welche den Strichkanal weiten sollten, um den Milchfluss zu erhöhen und dann in die Milchgänge gewandert sind.

Bei einer anderen Kuh bestätigte er endoskopisch das Fehlen der Milchsammelräume auf drei Vierteln, was sich durch geringe Milchleistung aus Selbigen äußerte. SHAKESPEARE (1998) verwendete gefilterte Luft, um das Sichtfeld zu verbessern und die Schärfe zu steigern.

2.4 Biopsie am bovinen Euter

Bisher wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, um Gewebeproben aus dem bovinen Euter zu entnehmen.

HEDSTRÖM (1932) entnahm das Drüsengewebe mit Hilfe eines Trokars, welcher aus einer Metallröhre mit einer gleitenden Klinge bestand. Eine andere Variante der Gewebeentnahme nutzen ANDBERG und KARLSON (1942). Sie gewannen die Probe mit einem scharfen Messingkorkbohrer. Auch die Möglichkeit das Gewebestück mit einer Pinzette zu fassen und dann mittels Skalpell abzutrennen, wurde angewandt (SHVABE et al., 1960). Den Zugang zum Drüsenparenchym verschafften sich alle durch eine Inzision in der Haut, wobei SHVABE et al. (1960) zusätzlich Spreizer einsetzten, um das Eutergewebe freizulegen.

Einen anderen Zugangsweg wählten PLATONOW und BLOBEL (1962), indem sie eine Ösophagialbiopsiezange nach JACKSON durch den Strichkanal einführten, um die Gewebeprobe zu erhalten.

MARX und CARULO (1963) verglichen drei Biopsiemethoden miteinander, wobei ihr Augenmerk auf Reaktionen wie veränderte Milchproduktion, Blut im Gemelk und Entwicklung einer Mastitis lag. Der Einsatz des Korkbohrers erzeugte übermäßige Blutungen und ausgeprägtes Gewebetrauma. Mit der SILVERMAN-BOEKER-Biopsienadel wurden zwei Zugangswege verfolgt. Über den Weg durch den Strichkanal traten extreme Blutungen auf, weil die Blutgefäßdichte im Bereich der Drüsenzisterne sehr hoch ist. Die Gewebeproben für die histologische Untersuchung waren allerdings exzellent. Weniger Gewebeschäden und akzeptable Proben erhielten sie, wenn die Biosienadel durch die Haut des Euters eingebracht wurde. Am geringsten

fielen die Blutungen aus, wenn die Biopsie mittels Skalpell und Arterienklemme als Fassinstrument, entnommen wurde. Die Tiefe, aus welcher sie das Gewebe entnahmen, wurde durch das Vorhandensein von Drüsengewebe bestimmt. Aus größerer Tiefe entnommene Gewebeproben, erzeugten blutigere Milch als solche aus oberflächlichen Schichten.

HIBBITT (1964) entnahm seine Biopsieproben an den Kaudalflächen der Euter von zwölf laktierenden Kühen. Nach Inzision der Haut konnte mit einer 1,8 cm breiten und 12 cm langen und scharfen Kanüle aus Edelstahl oder Messing unter drehenden Bewegungen ein Gewebestück geschnitten werden, welches in der Tiefe mit einer langen gebogenen Schere vom Euter abgetrennt wurde. Die Proben wogen zwischen 5 und 12 g. In den entstandenen Hohlraum wurde ein Gelatineschwamm eingelegt, um die Blutgerinnung zu unterstützen und der Hautverschluss erfolgte mit Einzelheften. Zwei Kühe entwickelten eine Mastitis, die durch eine antibiotische Behandlung erfolgreich therapiert wurde. Nach vier bis sechs Monaten wurden sieben Tiere geschlachtet und deren Euter untersucht. An der Stelle des Eingriffs befand sich ein bindegewebiger Strang im Durchmesser von 0,5 cm, sodass der Verlust des Gewebestücks für die Milchleistung vernachlässigbar war.

KNIGHT et al. (1992) bioptierten 80 Euterviertel. Sie gelangten an das Drüsengewebe, indem sie unter Sedation und Lokalanästhesie mit einer 5 cm langen Inzision einen Zugang durch die Haut herstellten und sich stumpf durch die Euterkapsel präparierten. Das 5 - 10 g schwere Biopat entnahmen sie mit Elektrokauterisation oder Skalpell. Nach Herstellung der Hämostase mittels Arterienklemmen und Naht der Verletzung, wurden das tiefe Gewebe und die Haut verschlossen. Die Kühe erholten sich schnell vollständig und nach 24 Stunden waren keine Koagel oder Blut mehr in der Milch enthalten. Bei einem zweiten Durchgang, mit auf sechs Stunden verkürztem Melkintervall, entzündete sich in einigen Fällen die Wunde und bei vier von 32 Vierteln entstand eine durch *Actinomyces pyogenes* ausgelöste Mastitis.

Die Untersuchungen von FARR et al. (1996) hatten zum Ziel, ohne Allgemeinanästhesie durch eine möglichst kleine Inzision eine aussagekräftige Probe des bovinen Mammarygewebes zu entnehmen. Augenmerk wurde auf eine relativ kurze Zeit bis zur vollständigen Abheilung gelegt. Zum Einsatz kam eine rotierende Biopsienadel mit ausfahrbarer Klinge, mit welcher ein Gewebestück von 4 x 70 mm und 0,75 - 1 g gewonnen wurde. Die Hautwunde wurde mit Klammern nach MICHEL verschlossen und nach sechseinhalb Tagen waren keine Blutrückstände mehr in der Milch vorhan-

den. Der Eingriff wurde an acht Erstlingskühen in der Mitte der Laktationsperiode durchgeführt.

Zur Diagnostik einer von *Prototheca zopfii* ausgelösten Mastitis setzten COSTA et al. (2004) eine Feinnadelbiopsie ein. Sie beprobten 21 Euterviertel mit dem VALERITM Cytoaspirator mit Injektionsnadeln der Größe 30 x 7 mm und stellten fest, dass diese Technik nur geringe Gewebeschäden verursacht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Bei den Untersuchungen handelte es sich um einen genehmigten Tierversuch (Aktenzeichen: V 54 – 19 c 20/15 c GI 18/14 Nr. A 38/2009).

3.1.1 Lebende Tiere und Schlachthoforgane

Im ersten Abschnitt der Versuche wurden die Euter von Milchkühen der Rasse Fleckvieh (n = 15) unterschiedlicher Laktationsstadien klinisch und ultrasonographisch untersucht. Die Tiere stammten aus einem Milchkuhbetrieb in Urphar. Ziel war es, die inneren Strukturen der Milchdrüsen darzustellen, um für die später anstehenden Biopsientnahmen die geeigneten Lokalisationen zu finden.

Die Biopsiemethode wurde zuerst an Eutern (n = 10) von geschlachteten Kühen erprobt. Die isolierten Organe stammten aus dem Schlachthof Gießen GmbH in Gießen. Der zweite Teil der Untersuchungen zur Biopsientnahme fand an laktierenden Kühen (n = 16) sowohl mit gesunden als auch erkrankten Milchdrüsen statt. Die Tiere stammten aus dem Patientengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus Liebig Universität Gießen.

3.1.2 Sonographie

Die Untersuchungen wurden mit dem sonographischen Gerät VET 180 PLUS (SonoSite Incorporated, Bothell, WA, USA) durchgeführt (Abbildung 1). Als Schallkopf kam eine 5 MHz Rektalsonde (L52/10 - 5 MHz Transducer) zum Einsatz. Dieses Gerät ist als tragbare Version mit Akku oder als Standgerät auf einem Terminal mit LCD – Monitor und externer Stromversorgung einsetzbar. Als Geräteeinstellung wurde der B-Mode gewählt. Als Eindringtiefe wurden 5,7 cm gewählt, was in etwa der Eindringtiefe der später eingesetzten Biopsienadeln entsprach. Die Bildschärfe wurde auf die jeweils zu erfassenden Strukturen angepasst, um aussagekräftige Bilder zu erhalten. Die Zusatzfunktion des Dopplers ermöglichte es, Blutgefäße von Milchgängen zu unterscheiden. Mit Hilfe der Taste "Freeze" konnte das Echtzeit-Bild auf dem Monitor fixiert werden, um anschließend Vermessungen vorzunehmen und es zu speichern. Die auf dem Gerätespeicher gesicherten Bilder wurden mittels einem Videokabel und dem DAZZLE® Video Creator Platinum (Pinnacle Systems Incorporated, Mountain View, California, USA) auf den Laptop als Videosequenz übertragen,

wo sie mit der Software AM Capture[®] (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) im AVI – Format (Audio Video Interleave) gespeichert werden konnten. Die einzelnen Bilder wurden mittels Windows Movie Maker[®] (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) aus dem Kurzfilm mit der Programmfunktion “Einzelbild erzeugen“ geschnitten und konnten so als Bilddatei im JPEG – Format (Joint Photographic Experts Group) gesichert werden.



Abbildung 1: Sonographisches Gerät VET 180 PLUS mit 5 MHz Rektalsonde.

3.1.3 Milchproben

Die Viertelgemelksproben zur bakteriologischen Untersuchung durch den Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) in Gießen wurden in 14 ml Laborröhrchen mit Griffstopfen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) abgemolken. Diese enthielten einen Konservierer und waren sterilisiert.

Konservierungsmedium für Milchproben (Rezeptur des LHL für 5 Liter Ansatz)

Borsäure	250 g
Kaliumsorbat	3,75 g
Glycerin	42,5 ml
Methylenblau abwiegen	2,5 ml
Demineralisiertes Wasser	5 l

Ingridienzien dem demineralisiertem Wasser zugeben und mit Hilfe eines Magnetrührers vollständig lösen.

3.1.4 Biopate

Die Gewebeproben wurden mit dem Biopsieinstrument SuperCore™ (Angiotech, Medical Device Technologies, Incorporated, Gainesville, Florida) in der Größe 14 GA x 9 cm und den zugehörigen koaxialen Einführnadeln (Angiotech, Medical Device Technologies, Incorporated, Gainesville, Florida) in der Größe 13 GA x 3,9 cm entnommen (Abbildung 2). Die Kanülen bestanden aus einer Metallhülse und einem an der Spitze scharf angeschliffenem Mandrin. Mit dem an der Hülse befindlichen Metallclip konnte eine Eindringtiefebegrenzung vorgenommen werden. Die Biopsieinstrumente setzten sich ebenfalls aus einer Metallhülse und einem Mandrin zusammen. Jedoch war hier der Mandrin ab dem ersten Zentimeter nach der Spitze für eine Länge von zwei Zentimeter bis auf den halben Durchmesser reduziert. Durch Zurückziehen der Hülse wurde eine Feder gespannt, welche selbige nach Drücken des Auslösers wieder nach vorne schnellen lies und so das in der Vertiefung befindliche

Gewebe isolierte. Mit der Möglichkeit die Hülse einen oder zwei Zentimeter zurück-zuziehen konnten unterschiedlich große Gewebestücke gewonnen werden.

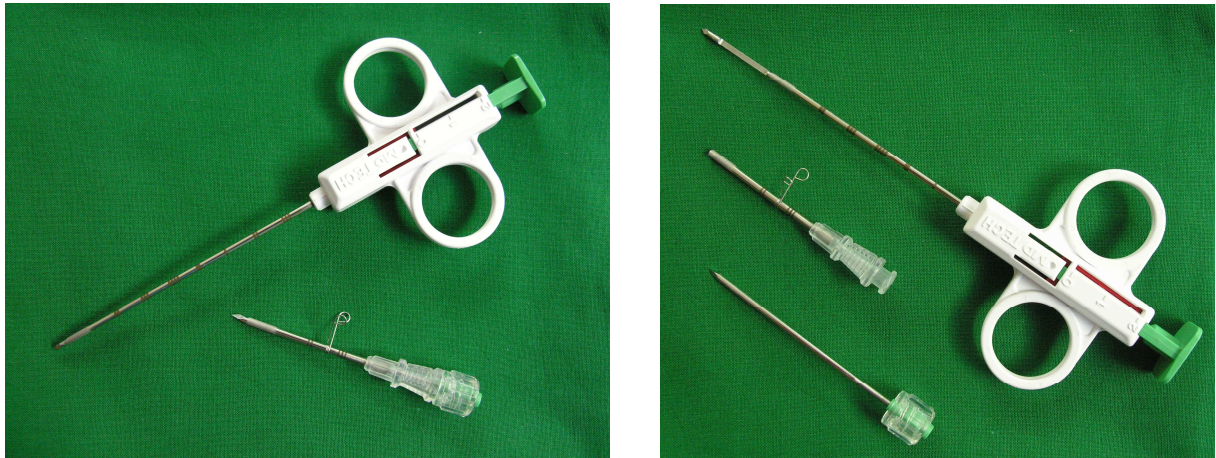


Abbildung 2: Biopsieinstrument SuperCore™ mit Koaxialer Einführnadel in verschiedenen Stellungen. Links: Biopsieinstrument entspannt, Kammer geschlossen; Mandrin in Einführnadel geschraubt. Rechts: Biopsieinstrument gespannt, Kammer geöffnet; Mandrin aus Einführnadel entnommen.

3.1.5 Gewebeproben

Ein Teil des Biopats wurde zur bakteriologischen Untersuchung, welche durch den LHL in Gießen durchgeführt wurde, in 13 ml Laborröhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Diese enthielten 3 ml 0,9 % sterile NaCl Lösung (Braun, Tuttlingen) und waren sterilisiert.

3.1.6 Histologie

Der andere Teil der frisch gewonnenen Gewebeproben wurde in neutral gepuffertem Formol nach Lilie fixiert. Nach der Einbettung in Paraffin und der Herstellung von Schnitten mit dem Microtom Leica RM 2125 RT (Leica Mikrosysteme Nussloch GmbH, Nussloch) fand eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung für die lichtmikroskopische Auswertung statt (ROMEIS, 1989).

3.2 Methoden

3.2.1 Euteruntersuchung

Bei jedem Tier wurde eine Euteruntersuchung durchgeführt (GRUNERT, 1990). Diese bestand aus der Adspektion und Palpation der Euterviertel sowie der sensorischen Sekretprüfung und dem von SCHALM und NOORLANDER (1957) entwickelten California-Mastitis-Test (CMT) der Viertelgemelksproben.

Bei der Adspektion wurde auf Größe, Sitz und Form des Euters als Ganzes geachtet. Die Euterviertel und die Zitzen wurden vergleichend von schräg vorn, von der Seite und von hinten betrachtet.

Die Palpation gliederte sich in die Untersuchung der Euterhaut, in die des Drüsenkörpers einschließlich der Drüsenzisterne und in die der Zitzen. Zuerst wurden die einzelnen Euterviertel mit beiden Händen oberflächlich, dann tief durchpalpiert. Die Zitzen wurden mit Hilfe des Zitzenrollgriffes untersucht, um Unregelmäßigkeiten in der Wand oder an der Schleimhaut zu entdecken.

Im Rahmen der sensorischen Sekretprüfung lag das Augenmerk auf qualitativen Veränderungen wie Farbe, Geruch, Konsistenz und Beimengungen der Viertelgemelksproben. Zusätzlich wurde noch der CMT durchgeführt, um den somatischen Zellgehalt als Indikator für eine entzündliche Veränderung im Euter zu bestimmen.

3.2.2 Sonographie

Die Milchdrüsen wurden nach der Untersuchungsmethode von JENNINGER (1989) ultrasonographisch untersucht. Dabei wurde jedes Euterviertel in die Seitenfläche und je nachdem, ob es sich um ein Vorder- oder Hinterviertel handelte, in die Vorder- oder die Hinterfläche unterteilt. Jede dieser Flächen setzte sich in Abhängigkeit von der vertikalen Ausdehnung aus bis zu vier Etagen zusammen, welche in ihrer Höhe der Schallkopflänge entsprachen. Die einzelnen Flächen beziehungsweise deren Etagen wurden separat von proximal nach distal mit vertikaler Schallkopfausrichtung auf das Vorhandensein von Blutgefäßen durchmustert (Abbildung 3). Für jede Etage wurde ein charakteristisches Bild gespeichert. Zur besseren Anbindung der Sonde wurde das Euter mit dem Panasonic - Profihaarschneider ER 149A (Panasonic Corporation, Osaka, Japan) rasiert und die Euterhaut nach dem Benetzen mit Wasser mit Ultraschallgel (Selectavet – Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling) eingeschmiert. Im Fokus der Untersuchung lag das Vorhandensein von Blutgefäßen, welche mittels Dopplerfunktion von den Milchgängen unterschieden wurden.

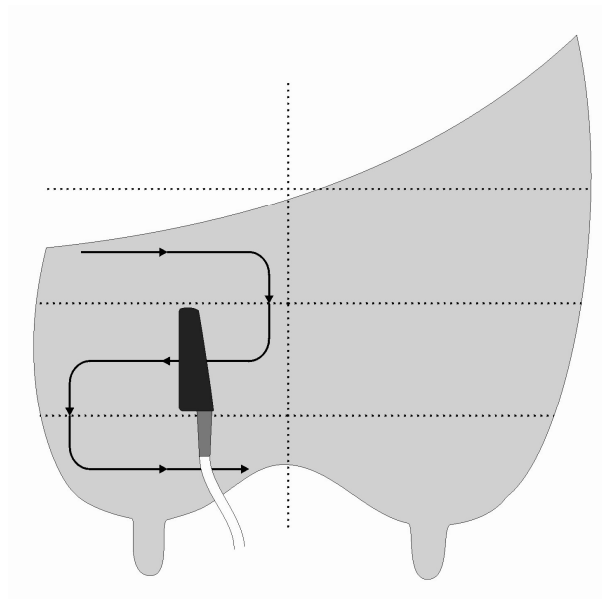


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise bei der ultrasonographischen Euteruntersuchung beim Rind am Beispiel der Seitenfläche des linken Vorder- und Hinterviertels, der Abstand der gestrichelten Linien beträgt ca. 10 cm.

3.2.3 Milchprobenentnahme

Bei jeder zu biotrierenden Kuh wurde unmittelbar vor der Gewebeprobenentnahme aus jedem Euterviertel eine Milchprobe abgemolken. Vor der Entnahme der Milchproben wurden die ersten Strahlen des Gemelks verworfen und jede Zitze wurde gründlich mit 70% Alkohol gereinigt. Zur Gewinnung der Proben wurden die geöffneten Laborröhrchen waagerecht neben das Euter der Kuh gehalten und die Milch in horizontalem Strahl eingemolken. Somit konnte eine Kontamination der Proben durch von der Euterhaut stammende Schmutzpartikel vermieden werden. Nachdem die Röhrchen zur Hälfte gefüllt waren, wurden sie sofort verschlossen und zur bakteriologischen Untersuchung an das LHL übersandt. Diese Untersuchung erfolgte nach Leitlinie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG, 2009).

3.2.4 Biopotentnahme

Der erste Versuch der Biopotentnahme fand an isolierten Eutern von frisch geschlachteten Kühen statt. Die Milchdrüsen wurden in Aufhängegestellen positioniert, um die physiologischen Verhältnisse zu simulieren (Abbildung 5). Biopotent wurden die beiden Vorderviertel auf zwei Ebenen im Bereich des Milchsammelraumes über Zugänge von der Lateralfäche des Euters und die beiden Hinterviertel auf drei Ebenen im Bereich des Milchsammelraumes über Zugänge von der Kaudalfäche des Euters (Abbildung 4). Der erste Zugang befand sich immer zwei Zentimeter proximal der Zitzenbasis und die weiteren jeweils zwei Zentimeter über den vorausgehenden Zugängen. Hierzu wurden die Euter an den betreffenden Stellen rasiert, gesäubert und desinfiziert. Als nächstes folgte die Platzierung der coaxialen Einführnadel unter Umgehung der oberflächlich sichtbaren Eutergefäße. Nach Entfernung des Mandrins wurde das zuvor gespannte Biopsieinstrument eingeführt und dessen Mandrin zwei Zentimeter vorgeschoben (Abbildung 5). Nach Betätigung des Auslösemechanismus wurde das in der Auskerbung des Mandrins befindliche Gewebe durch Vorschneppen der Kanüle isoliert und die Probe konnte entnommen werden.

Die Vorgehensweise wiederholte sich mit einigen Abweichungen im zweiten Schritt an den Eutern lebender Kühe. Hier wurden die im Behandlungsstand fixierten Kühe vor dem Eingriff am Euter einer Sedation mit 2 ml Xylazinhydrochlorid (Proxylaz, Vexy-Pharma GmbH, Schwarzenborn) unterzogen, welche intramuskulär in die Ankonäenmuskulatur appliziert wurde. Die Euter wurden an den Einstichstellen mit Einmalrasierern und Seifenwasser rasiert, sodass die Haut mit 70% Alkohol gereinigt und mit Skinsept[®] G – Lösung (Ecolab, Düsseldorf) desinfiziert werden konnte. Bei den lebenden Kühen wurde aus jedem Euterviertel in den oben aufgeführten Bereichen unter Umgehung der oberflächlich sichtbaren Gefäße jeweils eine Biopsieprobe entnommen. Nach dem Eingriff wurde die Einstichstelle mit Aluspray (Selectavet – Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling) besprüht. An den darauf folgenden Tagen wurden die Euter täglich klinisch untersucht, um die Auswirkungen der Probenentnahme zu erfassen.

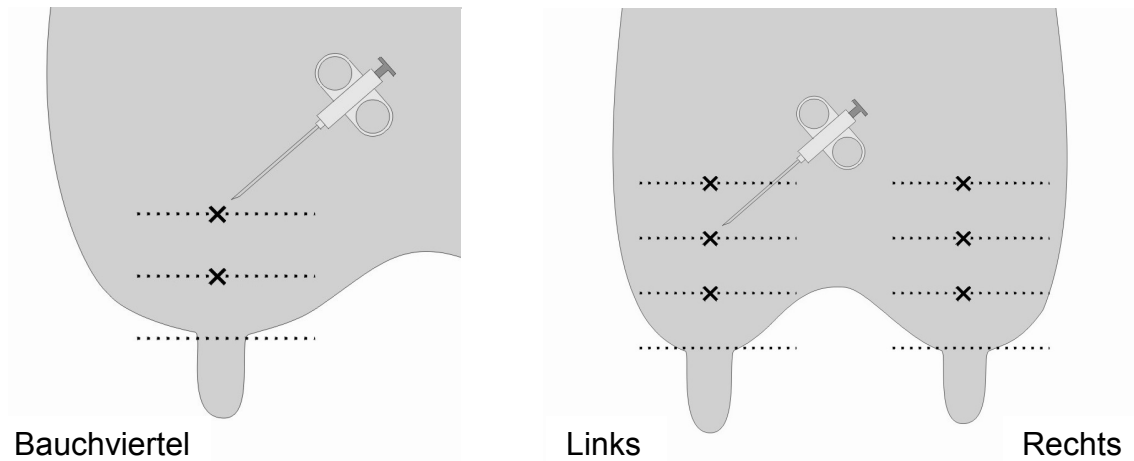


Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Vorgehensweise bei der Biopsieprobenentnahme am Beispiel der Seitenfläche des linken Vorderviertels und der Hinterfläche des Euters, der Abstand der gestrichelten Linien beträgt 2 cm.



Abbildung 5: Den physiologischen Verhältnissen entsprechend aufgehängtes Euter und Einführung des Biopsieinstruments durch die koaxiale Einführnadel.

3.2.5 Gewebeprobengewinnung

Gewebeproben für die bakteriologische Untersuchung am LHL wurden ausschließlich von lebenden Tieren gewonnen. Hierzu wurde nach dem Öffnen der mit frisch gewonnenem Gewebe gefüllten Biopsienadel ein Teil des Biopates in Röhrchen mit steriler 0,9 % NaCl Lösung überführt. Als Hilfsmittel dienten eine in 70 % Alkohol gelagerte sterile Pinzette und Schere. Die bakteriologische Untersuchung der Gewebeproben erfolgte modifiziert nach BISPING und AMTSBERG (1988).

3.2.6 Histologie

3.2.6.1 Untersuchungsmaterial

Zur histologischen Untersuchung dienten die anderen Teile der mittels Biopsie entnommenen Milchdrüsengewebeproben. Sie hatten eine Länge von bis zu zwei Zentimeter und einen Durchmesser von zwei Millimeter.

3.2.6.2 Histologische Untersuchung

3.2.6.2.1 Fixierung des Probenmaterials

Das Milchdrüsengewebe für die histologische Untersuchung wurde in Käfige (Tissue-Tek® III Biopsieeinbettkassette, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) verbracht und bis zur weiteren Bearbeitung in neutral gepuffertem Formol nach Lilie eingelegt.

Formol nach Lilie (neutral gepuffert, für 1l Lösung)

Formaldehydlösung (~37%) (Merck, Darmstadt)	100 ml
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck)	4 g
Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck)	6,5 g
<i>Aqua destillata</i>	900 ml

3.2.6.2.2 Einbettung des Probenmaterials

Die Entwässerung und Einbettung der Gewebeproben in Paraffin fand beim Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig Universität Gießen mit dem Einbettautomaten Leica TP 1050 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) statt.

Einbettung

Aufsteigende Alkoholreihe (Carl Roth, Karlsruhe)	Isopropanol 70 %, Isopropanol 80 %, Isopropanol 96 %, Isopropanol 100 %, Isopropanol 100 % für je 15 Minuten bei Zimmertemperatur
Xylol (Merck, Darmstadt)	2 x 15 Minuten bei Zimmertemperatur
Paraffin (Merck)	3 x 15 Minuten bei 60 ° Celsius

3.2.6.2.3 Herstellung der Gewebeschnitte

Nach 24 stündiger Kühlung der Paraffinblöcke zum Erlangen einer besseren Schneidbarkeit wurden in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig Universität Gießen mit dem Mikrotom und den Einmalklingen Leica DB 80 L (Leica Mikrosysteme Nussloch GmbH, Nussloch) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden zum Ebneten in ein 35° – 38 ° Celsius warmes Wasserbad (G FL 1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) mit *Aqua destillata* verbracht. Die geglätteten Schnitte wurden daraufhin auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtete Objektträger (IDL, Nidderau) aufgezogen.

APES-Beschichtung

APES (Merck, Darmstadt)	20 Sekunden in 2 % ige Lösung
Aceton, reinst (Merck)	2 x spülen
<i>Aqua destillata</i>	2 x spülen

Anschließend erfolgte die Trocknung im Wärmeschränk Memmert SL 40 (Memmert, Schwabach) für 24 Stunden bei 38 ° Celsius und die Lagerung in geschlossenen Gefäßen bei Zimmertemperatur bis zur Färbung.

3.2.6.2.4 Färbung der Gewebeschnitte

Für die Färbung der Gewebeschnitte kam die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zum Einsatz. Sie wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
Xylol (Merck, Darmstadt)	20 Minuten
Absteigende Alkoholreihe (Carl Roth, Karlsruhe)	Ethanol absolut, Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Ethanol 60 %, Ethanol 50 % für je 5 Minuten
<i>Aqua destillata</i>	5 Minuten
Hämatoxylin (Merck)	8 Minuten
Leitungswasser	10 Minuten wässern
Eosin 0,1 % (Merk)	6 Minuten
Leitungswasser	spülen
Ethanol 80 % (Carl Roth)	spülen
Ethanol 96 % (Carl Roth)	spülen
Ethanol absolut (Carl Roth)	2 x 2,5 Minuten
Xylol (Merck)	2 x 10 Minuten

Die gefärbten Präparate wurden sofort mit Entellan® (Merck, Darmstadt) und Deckgläsern (IDL, Nidderau) eingedeckelt.

3.2.6.3 Lichtmikroskopische Auswertung

Alle gefärbten Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop Leica DMR (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar) beurteilt. Zuerst wurden alle Präparate bei 2,5 facher Vergrößerung mit Hilfe der an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera Leica DC 300 (Leica Mikrosysteme AG, Heerbrugg, Schweiz) und der dazugehörigen Bildarchivierungssoftware (Leica Mikrosysteme AG, Heerbrugg, Schweiz) auf einem Computer GX 240 Dell gesichert. Später wurden mit dem selbigen Programm die Gesamtfläche und der auswertbare Teil der Schnitte berechnet.

Im nächsten Schritt wurden die Entzündungszellen differenziert und Entzündungsparameter bestimmt. Die Polymorphen Neutrophilen Granulozyten wurden zusätzlich noch mit null bis drei Plus quantifiziert. Bei den übrigen Zellen wie Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen wurde nur das Vorhandensein mit einem Plus gezählt. Die Parameter Bindegewebs- und Gefäßproliferation wurden ebenfalls nur nach ihrem Auftreten mit einem Plus bestimmt.

3.3 Untersuchungsziele

Mit den ultrasonographischen Untersuchungen am bovinen Euter verschaffte man sich einen Überblick über die inneren Strukturen der Milchdrüsen, mit dem Hauptziel geeignete Stellen für die Biopatientnahme aufzufinden. Hier lag das größte Augenmerk auf den Blutgefäßen, um vorweg sagen zu können, welche Stellen gemieden werden sollten und an welchen ein bedenkenloses Biopatientieren ohne das Erzeugen schwerwiegender Blutungen vorgenommen werden konnte.

Die Untersuchungsreihe an den isolierten Schlachthoforganen sollte dann eine genauere Einschätzung über die Qualität der entnommenen Proben liefern, um von den zuvor ausgewählten Einstichstellen die bestmöglichen zu identifizieren.

Mit der Wiederholung der Eingriffe an lebenden Tieren sollte die Verträglichkeit und Praxistauglichkeit der Methode überprüft werden, um endgültige Empfehlungen zur Gewebepatientenentnahme am bovinen Euter aussprechen zu können.

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen. Zur Verwendung kam das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1 (DIXON, 1993). Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm Microsoft® Office Word 2003 erstellt. Zur Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen, Quartilen und Prozentsätzen kam das Programm Microsoft® Office Excel 2003 zum Einsatz.

Metrische Parameter wie Gefäßdurchmesser oder Schnittfläche in cm wurden durch die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung charakterisiert. Die Darstellung der Verteilung dieser Werte erfolgte durch die Angabe der Mediane, der Quartile (Q_1 und Q_3) sowie der kleinsten und größten Beobachtungen im Box and Whisker Plot (LORENZ, 1996).

Qualitative und quantitative Merkmale wurden in zweidimensionalen Häufigkeitstabellen abgebildet. Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP3D unter Angabe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s). Für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale wurden die Häufigkeitstabellen in dem Programm BMDP4F mit dem exakten Test von Fisher auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, sodass Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Sonographische Euteruntersuchung an lebenden Tieren

Die inneren Strukturen der Milchdrüsen ließen sich sonographisch wie folgt darstellen: Die Euterhaut erschien zweischichtig, wobei sich die Haut stärker echogen und die *Subcutis* schwächer echogen darstellte (Abbildung 6).

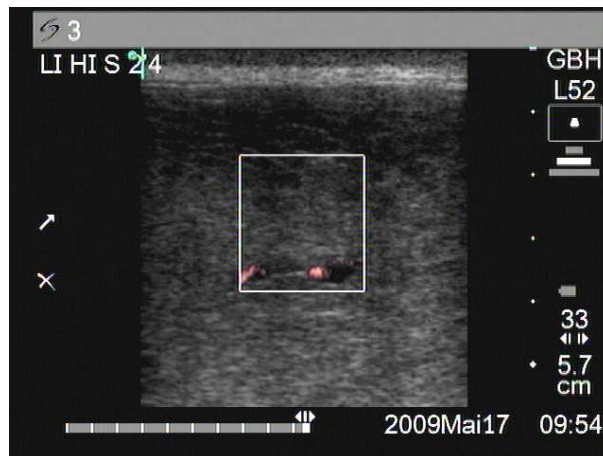


Abbildung 6: Sonographische Darstellung der Zweischichtigkeit der Euterhaut (laterolaterale Untersuchungsrichtung, 5 MHz, Rektalsonde, VET 180 PLUS, SonoSite).

In der *Subcutis* verlaufende Blutgefäße stellten sich in Abhängigkeit vom Anschnitt als anechogene strangartige oder kreisförmige Gebilde dar, was durch die adspektorischen Befunde bestätigt werden konnte (Abbildung 7).

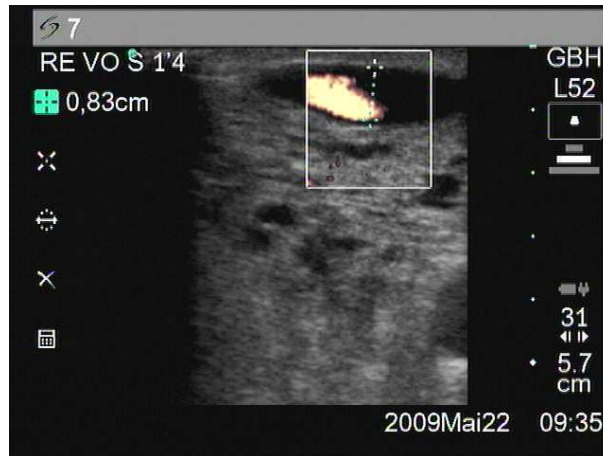


Abbildung 7: Sonographische Darstellung einer oberflächlichen Eutervene (laterolaterale Untersuchungsrichtung, 5 MHz, Rektalsonde, VET 180 PLUS, SonoSite).

Das Euterparenchym erschien als Mischung aus starken echogenen und schwachen echogenen Strukturen in diffuser, unstrukturierter Zusammensetzung. Erstere stellten das Stützskelett in Form von Bindegewebe dar, zweitere das Drüsengewebe. Der Milchsammelraum stellte sich als großer anechogener Hohlraum von unregelmäßiger Form dar (Abbildung 8).

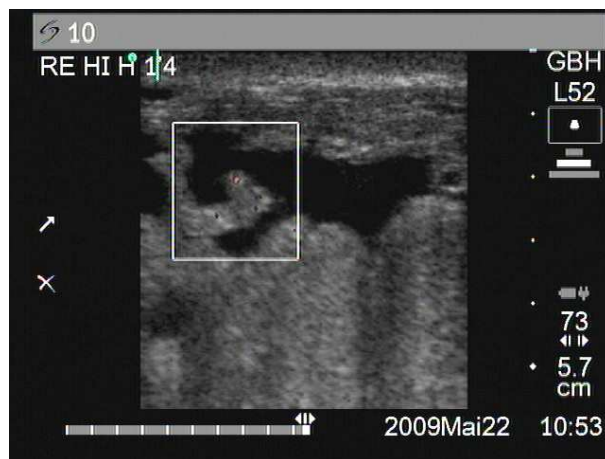


Abbildung 8: Sonographische Darstellung des Drüsenparenchyms und des Milchsammelraumes (kaudokraniale Untersuchungsrichtung, 5 MHz, Rektalsonde, VET 180 PLUS, SonoSite).

Andere anechogene Strukturen konnten mittels Dopplerfunktion in Blutgefäße und Milchgänge unterteilt werden. Zusätzlich konnten die Milchgänge noch als solche identifiziert werden, wenn eine direkte Verbindung mit dem Milchsammelraum dargestellt werden konnte. Eine genaue Benennung der Blutgefäße konnte nicht erfolgen, da das Vorkommen und der Verlauf von Euter zu Euter stark variierten. Eine Ausnahme machte die *Vena mammaria cranialis*, welche bei 83 % der untersuchten Vorderviertel abgebildet werden konnte (Abbildung 9).

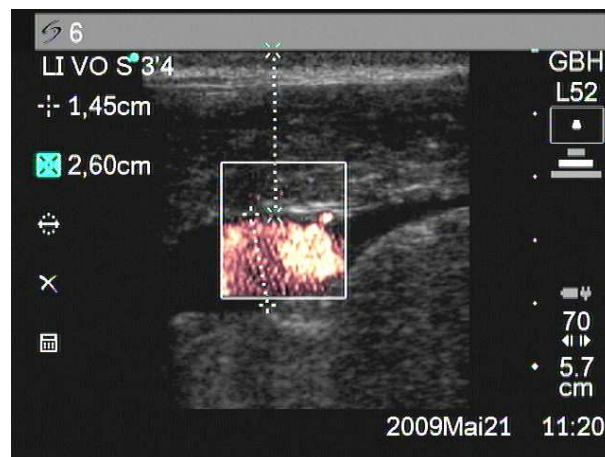


Abbildung 9: Sonographische Darstellung der *Vena mammaria cranialis* (laterolaterale Untersuchungsrichtung, 5 MHz, Rektalsonde, VET 180 PLUS, SonoSite).

Die *Vena mammaria cranialis* verlief im Mittel in einer Tiefe von $2,4 \pm 0,73$ cm unter der Haut und hatte durchschnittlich einen Durchmesser von $1,5 \pm 0,49$ cm (Abbildung 10).

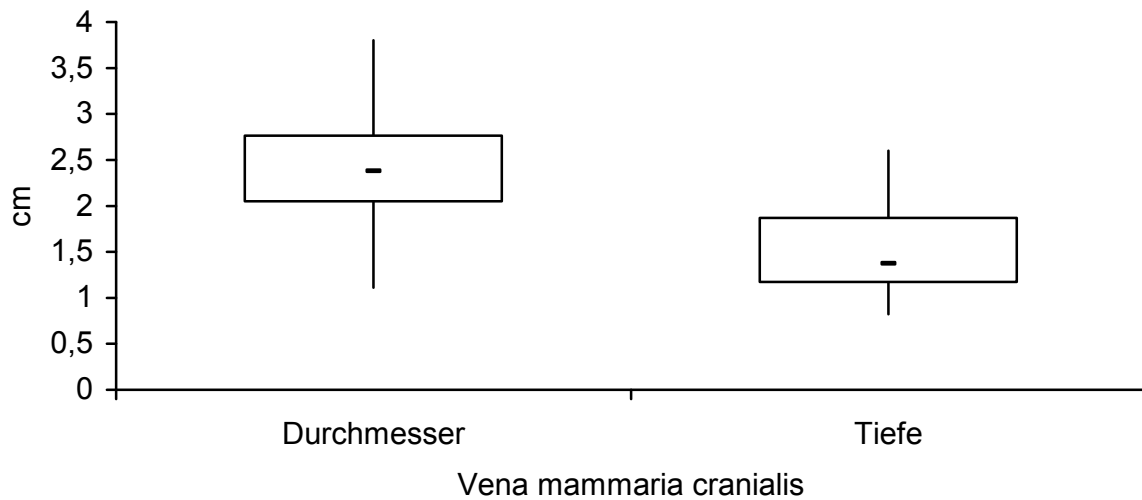


Abbildung 10: Verteilung der Durchmesser und der Lage der *Vena mammaria cranialis* in Vordervierteln ($n = 25$) in cm unter der Haut (Tiefe). Darstellung als Box and Whisker Plot.

4.2 Biopotentnahme an Organen

Bei der Biopotentnahme an 10 Schlachthofeutern konnte aus jeder der 100 Einstichstellen eine Gewebeprobe entnommen werden, die für die histologische Auswertung fixiert wurde (Abbildung 11).

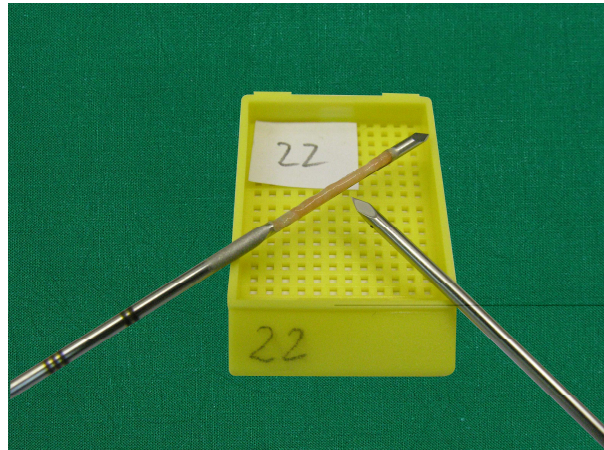


Abbildung 11: Frisch entnommene Gewebeprobe in geöffneter Biopsienadel.

Aus 63 % der Injektionsstellen war Milchfluss durch die Einführnadel zu beobachten, was darauf schließen ließ, dass die korrekte Lage im Milchsammelraum gegeben war. So konnte die Probe aus dem den Milchsammelraum umgebenden Gewebe entnommen werden und zugleich war eine Adspektion des Sekrets möglich. Bei einem der Viertel waren in der Milch Flocken enthalten.

Die Einführnadel durfte nach dem Einstechen in das Euter nicht mehr in ihrer Lage-richtung verändert werden, da dies zu einer Deformation der vorderen Mechanik des Biopsieinstrumentes führen konnte.

In einem Fall wurden das Euter eröffnet, um den Stichkanal und die Entnahmestelle der Gewebeprobe darzustellen (Abbildung 12).



Abbildung 12: Darstellung des Stichkanals nach Biopsieentnahme.

4.3 Biopotentnahme an lebenden Tieren

Bei 16 Kühen konnte aus jedem Viertel eine Gewebeprobe entnommen werden. Der Eingriff wurde ohne Abwehrreaktionen der Kühe toleriert. Die Einführnadel wurde unter Umgehung der oberflächlich sichtbaren Eutergefäße im Bereich des Milchsammelraumes positioniert (Abbildung 13) und der Mandrin entnommen (Abbildung 14).



Abbildung 13: Positionierte Einführnadel im rechten Vorderviertel einer Kuh.



Abbildung 14: Milchfluss durch die Einführnadel nach Entfernen des Mandrins.

Nach Einschieben des Biopsieinstrumentes wurde der Auslösemechanismus betätigt (Abbildung 15).



Abbildung 15: In die Einführnadel eingeschobenes Biopsieinstrument.

Die so gewonnene Gewebeprobe konnte nach Entnahme der Biopsienadel aus der Einführnadel und Öffnen des Verschlusses entnommen werden (Abbildung 16).



Abbildung 16: Geöffnetes Biopsieinstrument mit gewonnener Gewebeprobe.

Ein Teil des Biopstats wurde in die 0,9 % sterile NaCl Lösung überführt und der andere zur Fixation in Biopsiekassetten verbracht. Währenddessen verblieb die Einführnadel im Euter und es konnte in 32 Fällen Hämogalaktie beobachtet werden (Abbildung 17).



Abbildung 17: Hämogalaktie durch die Einführnadel nach Gewebeprobenentnahme.

Danach wurde die Hautwunde durch einminütiges Abdrücken der Haut verschlossen (Abbildung 18).



Abbildung 18: Abdrücken der Haut nach Entfernen der Einführnadel.

Während der Gewebeprobenentnahme wurden zu den Zeitpunkten nach Positionierung der Einführnadel und Entfernen des Mandrins (I.), nach Gewebeprobenentnahme und Entfernung der Biopsienadel (II.) und nach Entfernen der Einführnadel (III.) die Parameter Milchfluss, Blutfluss oder nichts von beidem durch die Einführnadel (Zeitpunkt I. und II.) oder durch die Haut (Zeitpunkt III.) erfasst. Bei Zeitpunkt III. konnte zusätzlich die Entstehung eines subkutanen Hämatoms (Abbildung 19) festgestellt werden (Tabelle 1 und Abbildung 20).



Abbildung 19: Nach Retraktion der Einführnadel entstandenes subkutanes Hämatom.

Tabelle 1: Auftreten lokaler Komplikationen während der Biopsientnahme aus Eutervierteln (n = 64) bei Kühen.

Zeitpunkt	Nach Positionierung der Einführnadel und Entfernen des Mandrins	Nach Gewebeprobenentnahme und Entfernung der Biopsienadel	Nach Entfernen der Einführnadel
Milchfluss	33 (52 %)	11 (17 %)	4 (6 %)
Blutfluss	4 (6 %)	13 (20 %)	13 (20 %)
Milch- und Blutfluss	8 (13 %)	32 (50 %)	0
Hämatom	0	0	4 (6 %)
Nichts	19 (30 %)	8 (13 %)	47 (73 %)

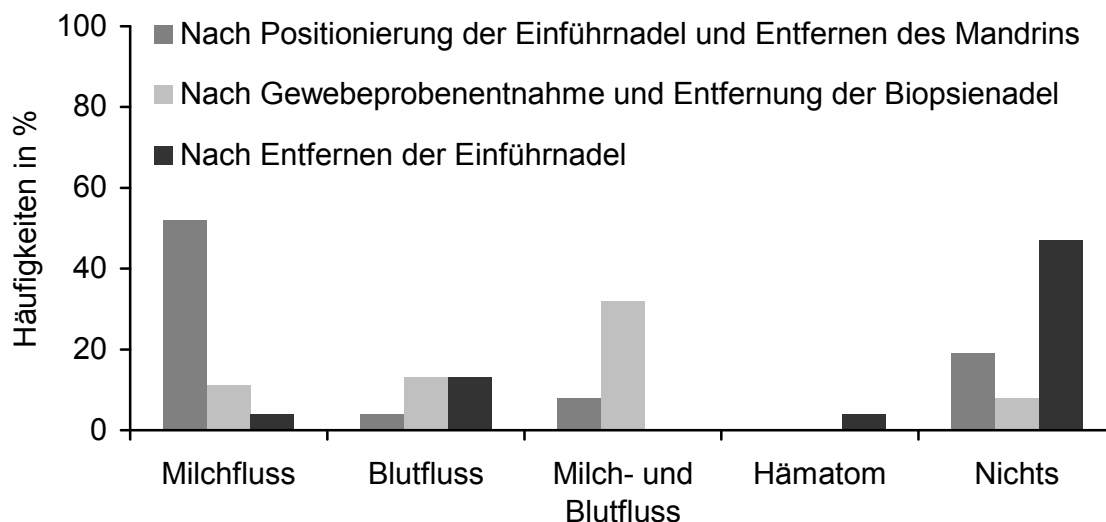


Abbildung 20: Auftreten lokaler Komplikationen in Zusammenhang mit der Biopotentnahme am bovinen Euter (n = 64); Zeitpunkte im Vergleich.

4.3.1 Milchbefunde vor und nach der Biopotentnahme

Vor der Biopotentnahme wurde das Euter und die Milch untersucht. Die Untersuchung am Tag nach der Gewebeprobenentnahme wurde bei den Tieren (n = 8) durchgeführt, die nicht sofort nach dem Eingriff euthanasiert oder geschlachtet wurden. Vor dem Eingriff waren 56 Viertel weich-elastisch, eines prall-elastisch und 39 zeigten makroskopisch ein unverändertes Sekret. Der CMT war bei 23 Vierteln negativ oder einfach positiv. Sieben Viertel hatten ein derb-festes Parenchym und Flocken im Sekret. Hier fiel der CMT dann dreifach positiv aus.

Bei der Untersuchung am Tag nach der Biopotentnahme waren die Viertel, bis auf zwei mit derbem Parenchym, in 30 Fällen weich- bis prall-elastisch. Im CMT zeigte sich für 27 Viertel eine Erhöhung um ein Plus oder ein gleich bleibender Wert, nie ein geringerer. Im Gemelk war in 24 Fällen Blut von unterschiedlicher Menge enthalten und bei 14 Vierteln waren Blutkoagel enthalten. In einem Fall wurde das Sekret gelblich und enthielt Flocken. Das Ende der Hämogalaktie lag zwischen null und dreizehn Tagen, im Durchschnitt waren es etwa sechs Tage und subkutane Hämatome waren nach einer Woche vollständig resorbiert. Die von den 32 vor und nach der Biopsie untersuchten Vierteln abweichende Anzahl der Viertel im CMT (n = 31) rührt aus der Atrophie eines Viertels, welchem keine Milchprobe entnommen werden konnte (Tabelle 2 und Abbildung 21).

Tabelle 2: Milchbefunde vor und am Tag nach der Bioplatentnahme bei Kühen (n = 8), o. b. B. = ohne besonderen Befund, CMT = California Mastitis Test.

		Vor Bioplatentnahme	Nach Bioplatentnahme
CMT (n = 31)	o. b. B.	13 (42 %)	4 (13 %)
	+	7 (23 %)	8 (26 %)
	++	7 (23 %)	10 (32 %)
	+++	4 (13 %)	9 (29 %)
Milchcharakter (n = 31)	o. b. B.	30 (97 %)	6 (19 %)
	Flocken	1 (3 %)	1 (3 %)
	Hämogalaktie +	0	16 (52 %)
	Hämogalaktie ++	0	6 (18 %)
	Hämogalaktie +++	0	2 (6 %)
	Blutkoagel	0	14 (45 %)
Euterpalpa- tion (n = 32)	weich-elastisch	30 (94 %)	21 (66 %)
	prall-elastisch	1 (3 %)	9 (28 %)
	derb-fest	1 (3 %)	1 (3 %)
	derb-warm	0	1 (3 %)

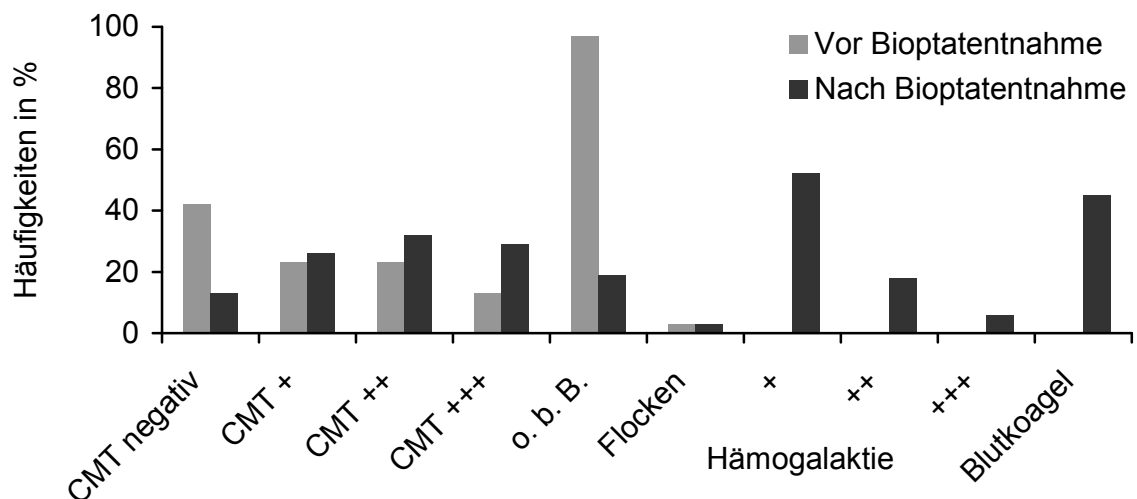


Abbildung 21: Häufigkeiten der Milchbefunde (n = 31); Zeitpunkte im Vergleich; CMT = California Mastitis Test, o. b. B. = ohne besonderen Befund.

4.3.2 Mikrobiologische Befunde

Von Milch- und Gewebeproben wurden im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) mikrobiologische Befunde erhoben.

4.3.2.1 Milch

Soweit es sich nicht um Färsen, Trockensteher oder atrophiierte Euterviertel handelte, wurde vor jeder Bioplatentnahme eine Viertelgemelksprobe (n = 45) entnommen. Bei der anschließenden mikrobiologischen Untersuchung dieser Proben im LHL konnten pathogene und apathogene Bakterien nachgewiesen werden. Zu den pathogenen Arten zählten *Arcanobacterium pyogenes*, coliforme Keime und *Staphylococcus aureus*. Diese konnten in vier Milchproben diagnostiziert werden (Abbildung 22).

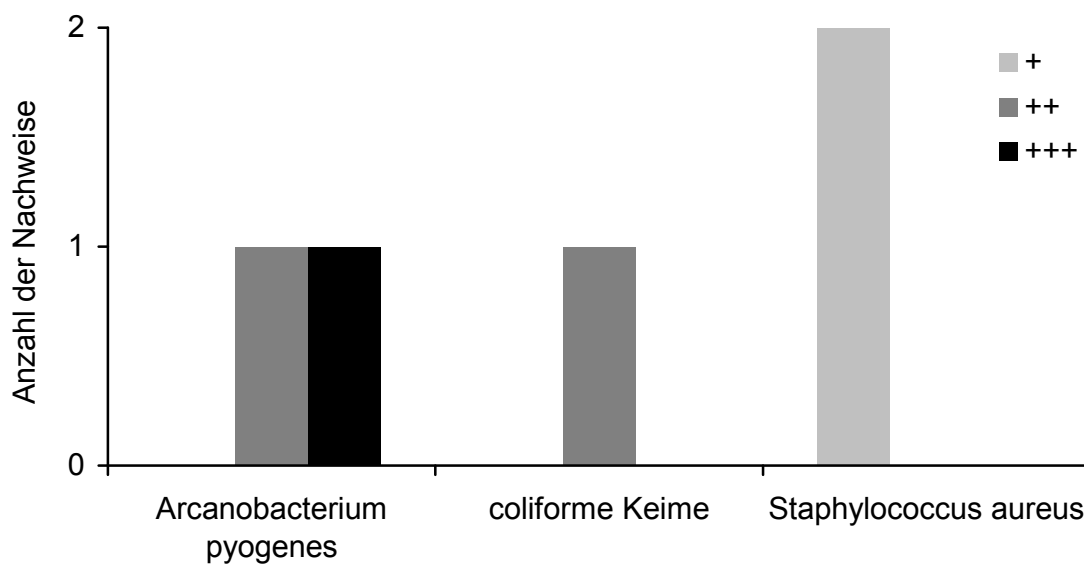


Abbildung 22: Anzahl der in den Milchproben (n = 45) nachgewiesenen pathogenen Keime.

In 23 Proben waren apathogene Bakterien wie aerobe Bazillen, koagulasenegative Staphylokokken, aesculinpositive Streptokokken, Corynebacterium spezies und Enterokokken zu finden (Abbildung 23).

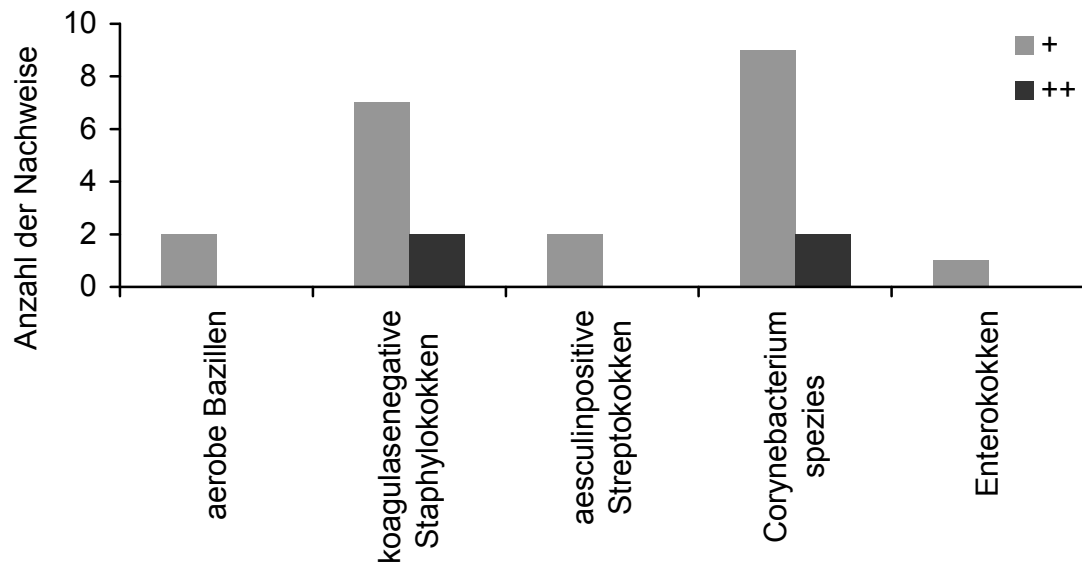


Abbildung 23: Anzahl der in den Milchproben (n = 45) nachgewiesenen apathogenen Keime.

Frei von Bakterien waren 21 Viertelgemelksproben.

4.3.2.2 Gewebe

Die Gewebeproben (n = 64) konnten bis auf eine Probe, welche zu klein war, im LHL mikrobiologisch untersucht werden. Auch hier konnten pathogene und apathogene Bakterien unterschieden werden. Die zu den pathogenen Keimen gezählten *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Nocardia species* waren in elf der untersuchten Proben (n = 63) enthalten (Abbildung 24).

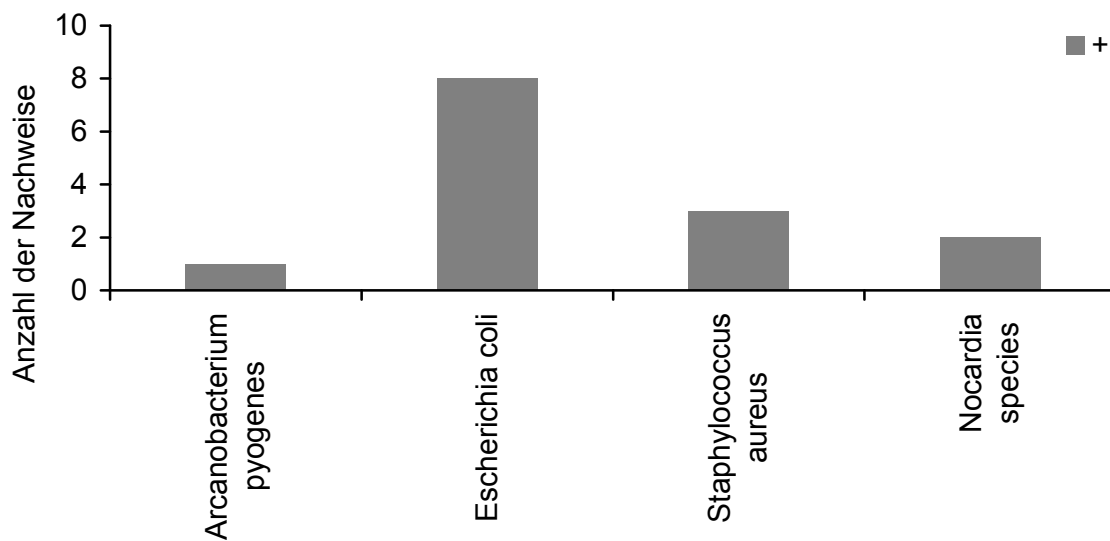


Abbildung 24: Anzahl der in den Gewebeproben (n = 63) nachgewiesenen pathogenen Keime.

In 36 Proben konnten apathogene Keime wie aerobe Bazillen, koagulasenegative Staphylokokken, aesculinpositive Streptokokken, *Corynebacterium* spezie, alpha-hämolysierende Streptokokken, *Yersinia enterocolitica*, Enterokokken, bewegliche Aeromonaden und *Staphylococcus warneri* nachgewiesen werden (Abbildung 25).

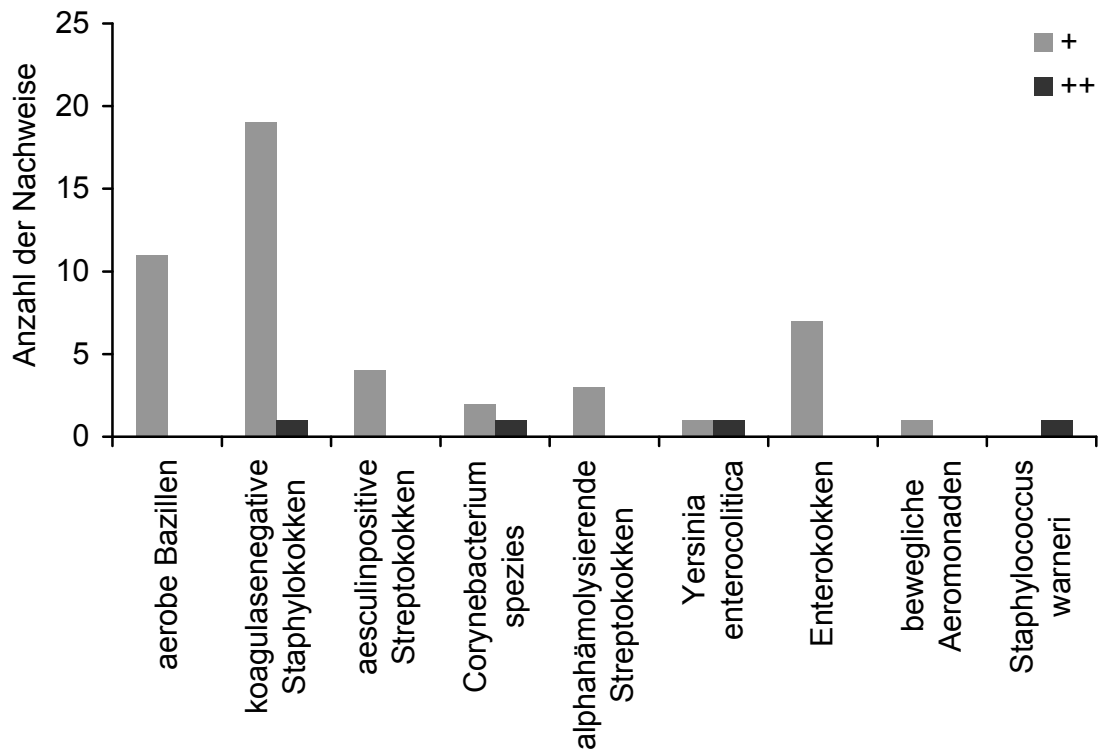


Abbildung 25: Anzahl der in Gewebeproben (n = 63) nachgewiesenen apathogenen Keime.

In 25 der untersuchten Proben konnten keine Bakterien gefunden werden.

4.4 Histologische Befunde

Die aus den Schlachthofeutern ($n = 10$) und Eutern lebender Kühe ($n = 16$) entnommenen Gewebeproben wurden histologisch untersucht.

Von den Proben aus Schlachthofeutern konnten 97 histologische Präparaten angefertigt werden, von welchen 92 auswertbar waren. Die durchschnittliche Fläche betrug $2,30 \pm 2,28 \text{ mm}^2$, davon waren im Mittel $1,66 \pm 1,73 \text{ mm}^2$ auswertbar. Dies entsprach 72 % (Abbildung 26).

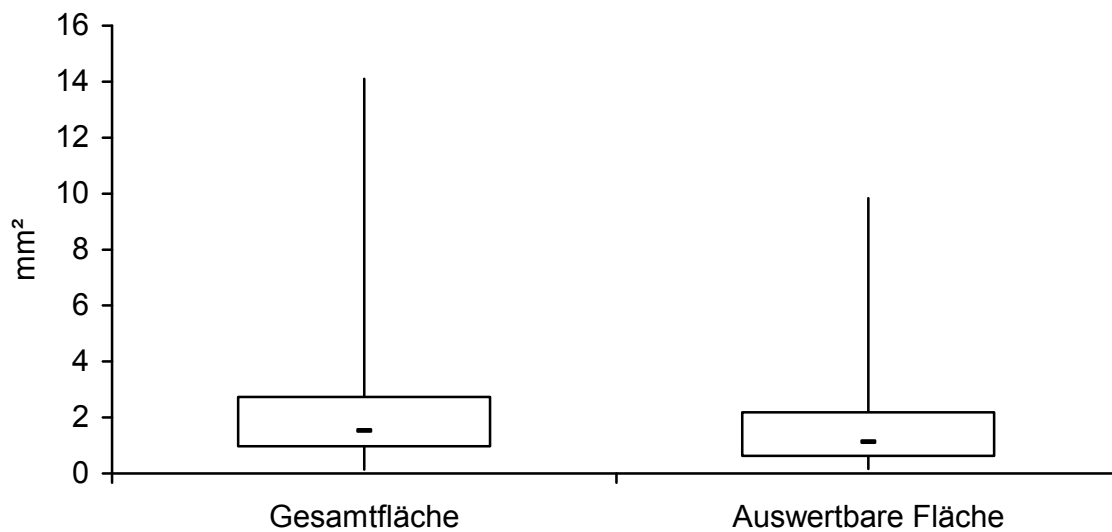


Abbildung 26: Verteilung der Gesamtflächen ($n = 97$) und der auswertbaren Flächen ($n = 92$) in mm^2 der Präparate aus Schlachthofeutern. Darstellung als Box and Whisker Blot.

In drei Parafinblöcken konnte beim Anfertigen der Schnitte kein Gewebe gefunden werden. Ein Präparat oder eine Teilfläche war nicht auswertbar, wenn keine zusammenhängenden Gewebestrukturen dargestellt werden konnten (Abbildung 27).

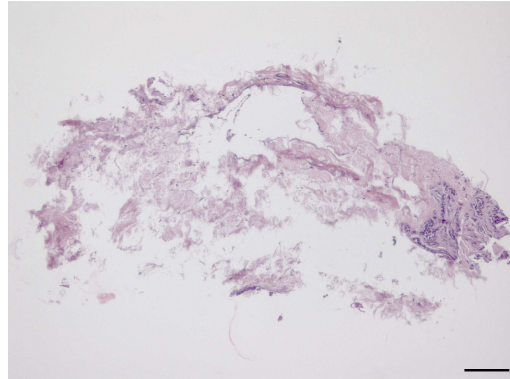


Abbildung 27: Histologische Darstellung eines nicht auswertbaren Präparats aus einem Rindereuter (H. E., Balkenlänge 100 µm).

Des Weiteren fand eine histologische Untersuchung auf Entzündungsparameter statt. Die Polymorphen Neutrophilen Granulozyten kamen in 23 Fällen vor. Lymphozyten waren in 37, Makrophagen in 49, Plasmazellen in 6, Fibroblasten in 43 und Gefäßproliferationen in 10 Präparaten nachzuweisen (Abbildung 28).

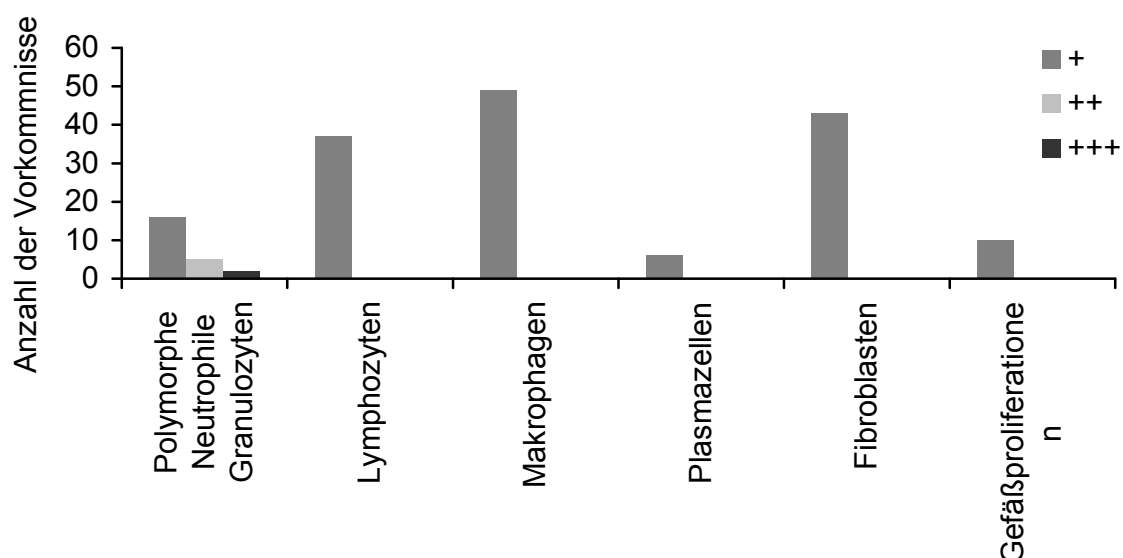


Abbildung 28: Vorkommen von Entzündungsparametern in histologischen Präparaten (n = 92) aus Schlachthofeutern.

Von den Gewebeschnitten der lebenden Kühe waren alle 64 auswertbar. Im Mittel betrug die Fläche $5,1 \pm 2,79 \text{ mm}^2$. Hiervon waren im Durchschnitt 87 %, also $4,4 \pm 2,71 \text{ mm}^2$ verwertbar (Abbildung 29).

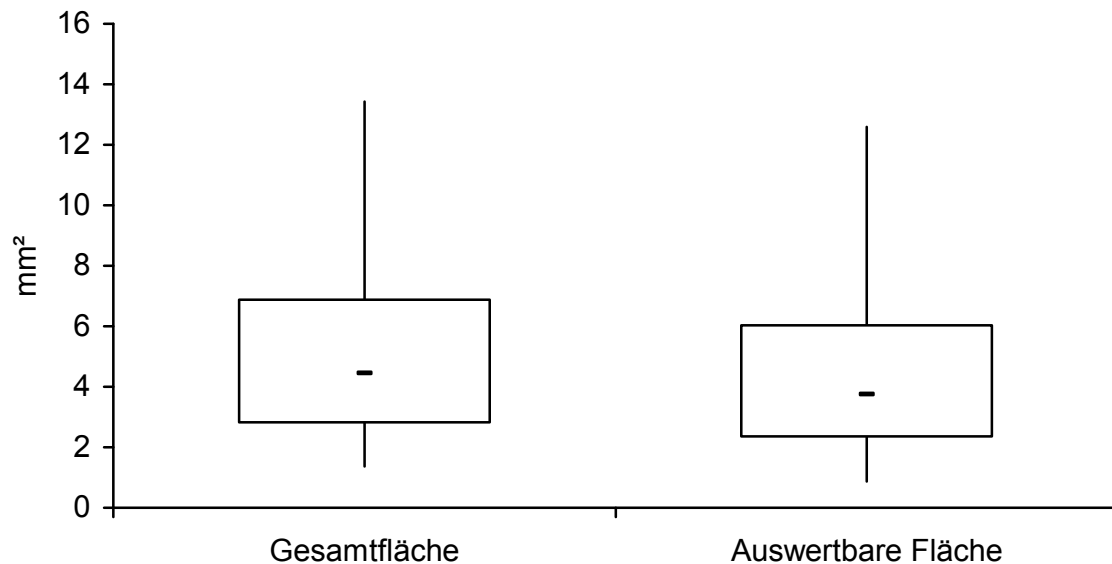


Abbildung 29: Verteilung der Gesamtflächen ($n = 64$) und der auswertbaren Flächen ($n = 64$) in mm^2 der histologischen Präparate aus Eutern lebender Kühe. Darstellung als Box and Whisker Plot.

Polymorphe Neutrophile Granulozyten waren in 17 Fällen vorhanden. Lymphozyten kamen in 38, Makrophagen in 48, Plasmazellen in 25, Fibroblasten in 46 und Gefäßproliferationen in 34 Präparaten vor (Abbildung 30).

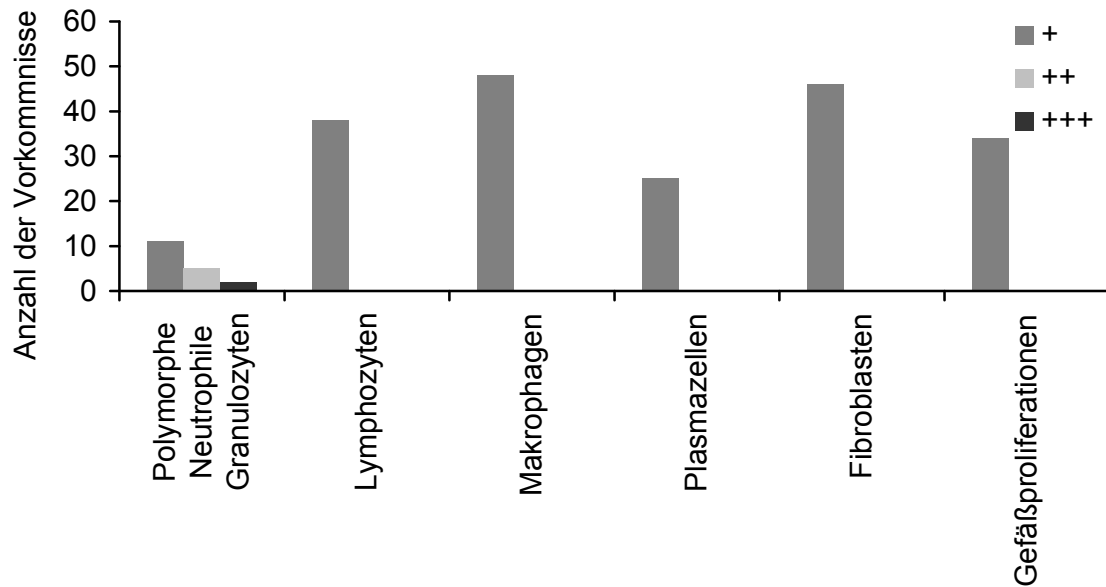
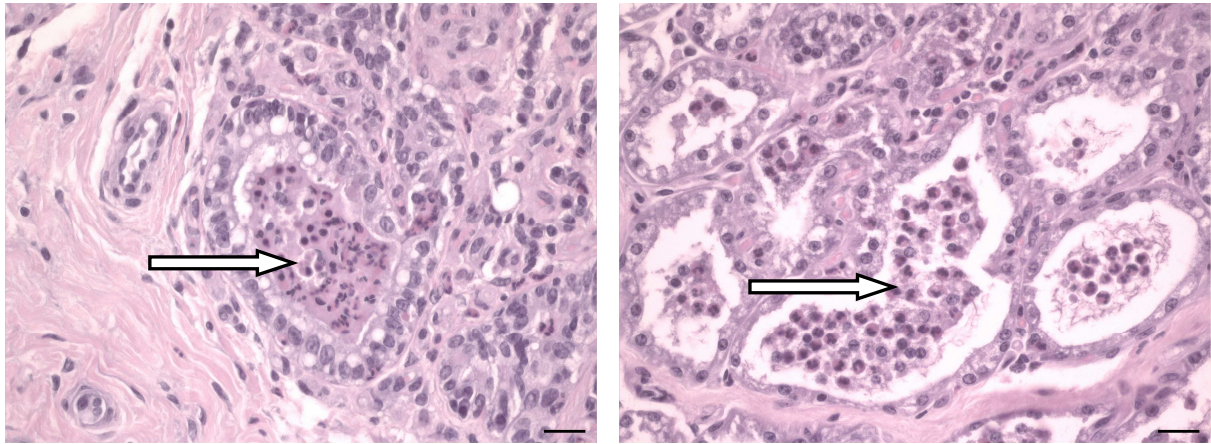


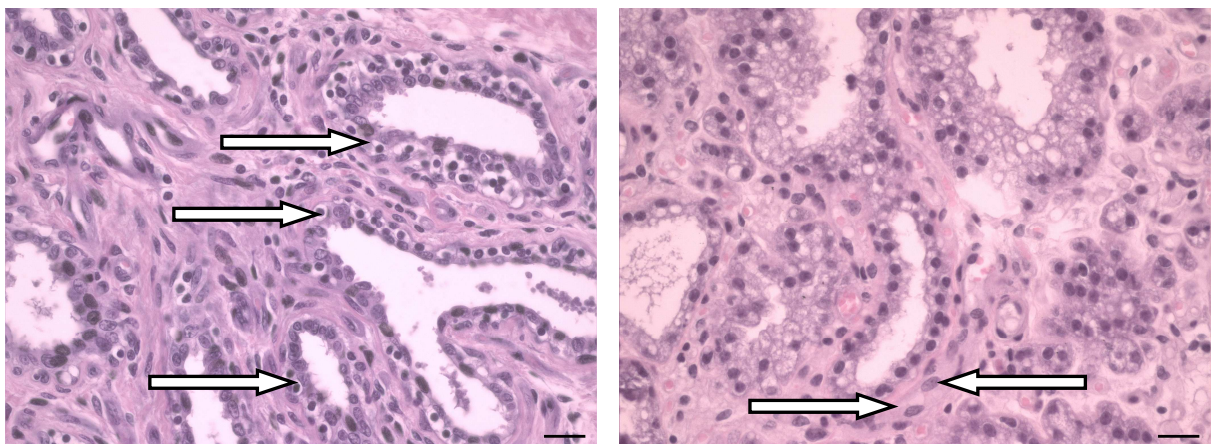
Abbildung 30: Vorkommen von Entzündungsparametern in Präparaten (n = 64) aus Eutern lebender Kühe.

Die in den Präparaten gefundenen Polymorphen Neutrophilen Granulozyten waren in den Alveolarlumina zu finden (Abbildungen 31).



Abbildungung 31: Histologische Darstellung von Drüsenparenchym eines Rindereuters. In den Alveolarlumina befinden sich Polymorphe Neutrophile Granulozyten (Pfeile). Gewebeprobe aus Schlachthofeuter (Bild links) und aus dem Euter einer lebenden Kuh (Bild rechts) (H. E., Balkenlänge 20 μ m).

Lymphozyten zeigten sich beim Durchwandern des Alveolarepithels, während die Makrophagen im Interstitium um die Alveolen auftraten (Abbildung 32).



Abbildungung 32: Histologische Darstellung von Drüsenparenchym eines Rindereuters. Lymphozyten (Pfeile) beim Durchwandern des Alveolarepithels (Bild links) und Makrophagen (Pfeile) im Interstitium (Bild rechts) (H. E., Balkenlänge 20 μ m).

Weitere im Bindegewebe anzutreffende Entzündungsparameter waren Plasmazellen und Fibroblasten (Abbildung 33).

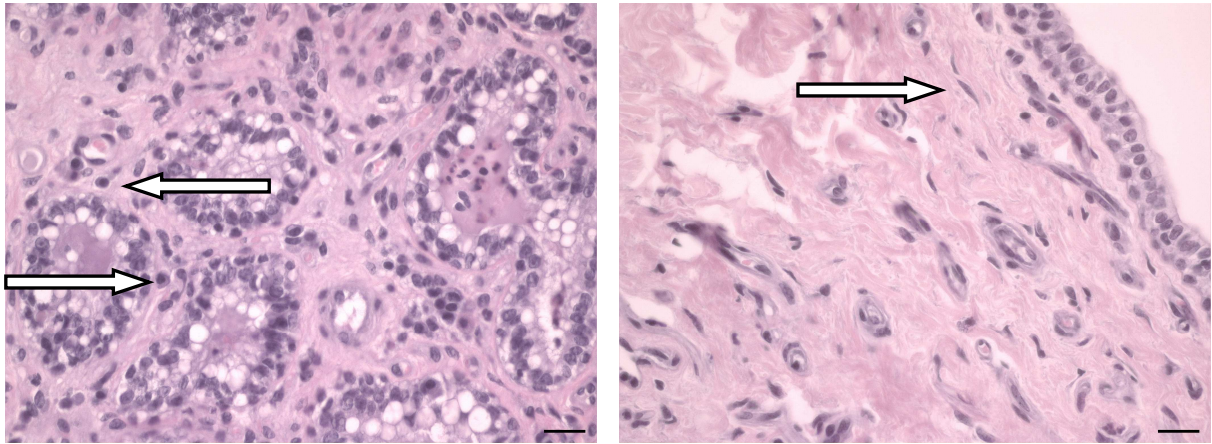


Abbildung 33: Histologische Darstellung von Drüsenparenchym eines Rindereuters. Im Interstitium befinden sich Plasmazellen (Pfeile, Bild links) und im Bindegewebe sind Fibroblasten (Pfeil, Bild rechts) zu erkennen (H. E., Balkenlänge 20 μ m).

In den Kapillaren der Gefäßproliferationen waren Erythrozyten zu sehen (Abbildung 34).

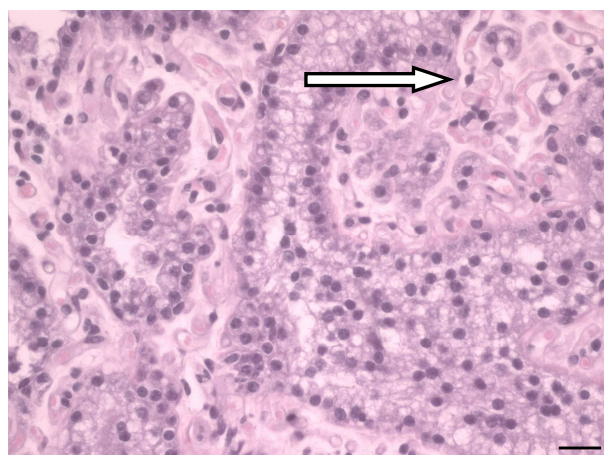


Abbildung 34: Histologische Darstellung von Drüsenparenchym eines Rindereuters. Im Interstitium sind Gefäßproliferationen (Pfeil) zu erkennen (H. E., Balkenlänge 20 μ m).

4.5 Korrelation der mikrobiologischen und histologischen Befunde

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Milch und des Gewebes sowohl mikrobiologisch als auch histologisch, wurden jeweils auf der Basis eines Euterviertels miteinander verglichen.

Zuerst wurde das gleichzeitige Vorkommen eines Keimes in der mikrobiologischen Untersuchung von Milch und Gewebe in einer paarweisen Auszählung miteinander verglichen. Dieser Vergleich basierte auf dem quantitativen Vorkommen (feine Aufteilung in null bis drei Plus) eines Bakteriums. Für *Arcanobacterium pyogenes* konnte eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem quantitativen Vorkommen in Milch- und Gewebeprobe festgestellt werden ($r_s = 0,68$; $p < 0,0001$) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung auf *Arcanobacterium pyogenes* beim Vergleich von Milch- und Gewebeprobe, Quantifizierung in: - = Ergebnis negativ; +, ++, +++ = Ergebnis ein- bis dreifach positiv.

<i>Arcanobacterium pyogenes</i>		Milch				Summe
		-	+	++	+++	
Gewebe	-	42	0	0	1	43
	+	0	0	1	0	1
	++	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0
Summe		42	0	1	1	44

Die gleiche statistisch signifikante positive Korrelation konnte in dem Vergleich des quantitativen Vorhandenseins von *Staphylococcus aureus* in der mikrobiologischen Untersuchung von Milch- und Gewebeproben nachgewiesen werden ($r_s = 0,70$; $p < 0,0001$) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung auf *Staphylococcus aureus* beim Vergleich von Milch- und Gewebeprobe, Quantifizierung in: - = Ergebnis negativ; +, ++, +++ = Ergebnis ein- bis dreifach positiv.

<i>Staphylococcus aureus</i>		Milch				Summe
		-	+	++	+++	
Gewebe	-	42	1	0	0	43
	+	0	1	0	0	1
	++	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0
Summe		42	2	0	0	44

In der paarweisen Auszählung über das quantitative Vorkommen der übrigen Keimarten in Milch- und Gewebeproben konnte keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($r_s \leq 0,04$; $p > 0,05$).

Dem nächsten Vergleich lag das gleichzeitige qualitative Vorkommen (grobe Aufteilung in null und ein Plus) eines Keimes in der mikrobiologischen Untersuchung von Milch und Gewebe zugrunde. Bei dieser Betrachtung, ob eine Übereinstimmung vorliegt oder nicht, konnte für *Arcanobacterium pyogenes* mit dem exakten Test von Fisher ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten in Milch- und Gewebeproben nachgewiesen werden als bei anderen Keimarten ($p = 0,045$) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung auf *Arcanobacterium pyogenes* beim Vergleich von Milch- und Gewebeprobe, vergrößerte Betrachtung (- = Bakteriologie negativ; + = Bakteriologie positiv).

<i>Arcanobacterium pyogenes</i>		Milch		Summe
		-	+	
Gewebe	-	42	1	43
	+	0	1	1
Summe		42	2	44

Für den Vergleich über gleichzeitiges qualitatives Vorkommen von *Staphylococcus aureus* in Milch und Gewebe war das Ergebnis des exakten Test von Fisher ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten in den beiden Proben ($p = 0,045$) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung auf *Staphylococcus aureus* beim Vergleich von Milch- und Gewebeprobe, vergrößerte Betrachtung (- = Bakteriologie negativ; + = Bakteriologie positiv).

<i>Staphylococcus aureus</i>		Milch		Summe
		-	+	
Gewebe	-	42	1	43
	+	0	1	1
Summe		42	2	44

In der paarweisen Auszählung über das quantitative Vorkommen der übrigen Keimarten in Milch- und Gewebeproben konnte im exakten Test von Fisher kein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten festgestellt werden ($p > 0,05$).

Als nächstes wurden jeweils positive mikrobiologische Untersuchungen von Milch oder Gewebe mit den Vorkommen der einzelnen Entzündungsparameter in der Histologie verglichen. Der exakte Test von Fisher zeigte für eine positive bakteriologische Untersuchung der Milch und das Vorkommen von Plasmazellen in der Histologie ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten ($p = 0,0015$) (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der bakteriologischen Untersuchung der Milch mit dem Vorhandensein von Plasmazellen in der Histologie (- = Bakteriologie / Histologie negativ; + = Bakteriologie / Histologie positiv).

	Histologie	Plasmazellen		Summe
		-	+	
Bakteriologie				
Milch	-	17	4	21
	+	8	16	24
Summe		25	20	45

Gefäßproliferationen kamen laut exaktem Test von Fisher signifikant häufiger gleichzeitig mit einem positiven Ergebnis der bakteriologischen Milchuntersuchung vor ($p = 0,014$) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der bakteriologischen Untersuchung der Milch mit dem Vorhandensein von Gefäßproliferationen in der Histologie (- = Bakteriologie / Histologie negativ; + = Bakteriologie / Histologie positiv).

	Histologie	Gefäßproliferationen		Summe
		-	+	
Bakteriologie				
Milch	-	13	8	21
	+	6	18	24
Summe		19	26	45

Im Vergleich der positiven Bakteriologie der Milch mit den übrigen Parameter der Histologie und der positiven Bakteriologie des Gewebes mit allen Parametern der Histologie konnten keine Zusammenhänge gefunden werden ($p > 0,05$).

Bei der Gegenüberstellung des Vorhandenseins der pathogenen Keime im Gewebe oder der Milch mit dem Vorkommen eines der histologischen Parameter konnte im exakten Test von Fisher ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten von Bindegewebsproliferation und pathogenen Bakterien im Gewebe nachgewiesen werden ($p = 0,046$) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich der bakteriologischen Untersuchung des Gewebes auf pathogene Keime mit dem Vorhandensein von Bindegewebsproliferation in der Histologie (- = Bakteriologie / Histologie negativ; + = Bakteriologie / Histologie positiv).

	Histologie	Bindegewebsproliferation		Summe
Bakteriologie		-	+	
Pathogene im Gewebe	-	12	40	52
	+	6	5	11
Summe		18	45	63

Polymorphe Neutrophile Granulozyten in der Histologie wurden signifikant häufiger gemeinsam mit pathogenen Bakterien in der Milch festgestellt ($p = 0,030$) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich der bakteriologischen Untersuchung der Milch auf pathogene Keime mit dem Vorhandensein von Polymorphen Neutrophilen Granulozyten in der Histologie (- = Bakteriologie / Histologie negativ; + = Bakteriologie / Histologie positiv).

	Histologie	Polymorphe Neutrophile Granulozyten		Summe
Bakteriologie		-	+	
Pathogene in der Milch	-	34	1	35
	+	7	3	10
Summe		41	4	45

Es wurde überprüft, ob zwischen dem Nachweis von *Staphylococcus aureus* in Milch oder Gewebe und dem Vorkommen eines der histologischen Parameter ein Zusammenhang besteht. Hier konnte für *Staphylococcus aureus* in der Milch und Polymorphe Neutrophile Granulozyten in der Histologie ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten im exakten Test von Fisher nachgewiesen werden ($p = 0,046$) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vergleich der bakteriologischen Untersuchung der Milch auf *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mit dem Vorhandensein von Polymorphen Neutrophilen Granulozyten in der Histologie (- = Bakteriologie / Histologie negativ; + = Bakteriologie / Histologie positiv).

	Histologie	Polymorphen Neutrophilen Granulozyten		Summe
		-	+	
Bakteriologie				
<i>S. aureus</i>	-	35	0	35
in der Milch	+	8	2	10
Summe		43	2	45

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Durch Mastitiden ergibt sich ein hoher wirtschaftlicher Ausfall in der Konsummilchproduktion (DOBBINS, 1977; BLOSSER, 1979; KOSSAIBATI und ESSLEMONT, 1997). Eine gezielte und erfolgreiche Behandlung ist nur dann möglich, wenn Kenntnis über den verursachenden Erreger vorliegt. Da es alleine mit einer Viertelgemelkuntersuchung oft nicht gelingt die Ursache einer ständig erhöhten Zellzahl zu bestimmen, ist die Feinnadelbiopsie als schonendes Gewebeentnahmeverfahren eine alternative Möglichkeit, um die Diagnostik zu verbessern. Die Biopotentnahme wurde am bovinen Euter bisher nur experimentell (HEDSTRÖM, 1932) und außer von MARX und CARULO (1963) mit großen Biopattendurchmessern (HIBBITT, 1964; FARR et al., 1995; COSTA et al., 2004) oder chirurgisch (KNIGHT et al., 1992) durchgeführt. So stellte sich die Frage, ob die Feinnadelbiopsie als Instrument zur Routinediagnostik am Euter der Kuh geeignet ist.

Aus diesem Grund wurden zu Beginn der Studie die Euter von gesunden laktierenden Kühen ultrasonographisch nach dem von JENNINGER (1989) etablierten Schema untersucht. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf der Gefäßversorgung der Milchdrüse, um geeignete Einstichstellen für die spätere Gewebeentnahme zu lokalisieren.

Im Zuge der Untersuchungen wurden dann Faktoren wie die Qualität der Proben, Eignung des Biopsieinstruments, Toleranz der Tiere, Komplikationen während des Eingriffs und danach sowie die Dauer bis zum Ende der Hämogalaktie nach Biopotentnahme beurteilt.

Die Erkenntnisse aus dieser Untersuchung sollen helfen, die Diagnostik im Bereich der bovinen Mastitis zu verbessern und das Instrument der Euterbiopsie für wissenschaftliche Untersuchungen auf diesem Gebiet zu etablieren.

5.2 Diskussion der Methode

Um den Gesundheitsstatus der Milchdrüsen bestimmen zu können, fand bei den lebenden Probanden, an welchen die sonographische Untersuchung oder die Biopotentnahme durchgeführt wurde, zuerst eine klinische Euteruntersuchung statt.

Die für die sonographische Examination zur Verfügung stehenden Milchkühe befanden sich alle in der Laktation und hatten gesunde Milchdrüsen. Durch das Abscheren der Euterbehaarung und die Verwendung von Ultraschallgel konnte eine gute Ankopplung erzielt werden, wodurch es gelang, die inneren Strukturen wie Blutgefäße, Milchgänge und den Milchsammelraum darzustellen. Auch die Nutzung einer Rektalsonde mit Dopplerfunktion war von Vorteil. So erlaubte die flache Bauweise mit parallel zum Schallkopf abgeführtem Anschlusskabel, die engen Bereiche zwischen Hinterbeinen und Milchdrüse mühelos zu erreichen. Die vorhandene monochrome Farbdopplerfunktion war ausreichend, um Blutgefäße und Milchgänge sicher voneinander zu differenzieren. Verifizierbar war diese Funktion an Stellen, an denen ein Milchgang in die Drüsenzisterne mündete. Die im Ultraschallgerät gespeicherten Bilder konnten mit einfacher Hardware problemlos auf den Computer übertragen und dort gespeichert werden. Die Untersuchung der Milchdrüsen von Kühen der Rasse Fleckvieh in einem Milchviehbetrieb wurde nach dem von JENNINGER (1989) erarbeiteten Schema durchgeführt. Hierbei wird jedes Viertel separat untersucht und die Untersuchungsrichtung erfolgt von proximal nach distal. Um die erhobenen Befunde bei der späteren Auswertung besser zuordnen zu können, wurde eine Rastereinteilung für die Lateralflächen von Vorder- und Hintervierteln sowie für die Kaudalflächen der Hinterviertel erstellt. Die Breite des Schallkopfes diente als Maß für die Höhe eines Rasters, die Breite ergab sich durch die Ausdehnung des Euterviertels. So entstanden mit der Ausnahme von kleinen Vordervierteln in der Regel vier Etagen. Die Eindringtiefe von 5,7 cm war ausreichend, um die anatomischen Strukturen bis in die Eindringtiefe des Biopsieinstruments von 4 cm darstellen zu können und lieferte eine gute Auflösung. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das von JENNINGER (1989) erarbeitete Verfahren der sonographischen Untersuchung für Fleckviehkühe auch bei Schwarzbunten Milchkühen einzusetzen ist.

Die Biopotentnahme gliederte sich in zwei Abschnitte. Zuerst wurden Euter vom Schlachthof verwendet, später erfolgten die Probenentnahmen in vivo.

Bei dem Vorversuch an Organen wurde die Eignung des Biopsieinstrumentes für die Probenentnahme am bovinen Euter erprobt. Zum Einsatz kam ein Biopsieinstrument mit geringem Durchmesser, um so wenig Komplikationen wie möglich zu verursachen, mit dem jedoch ausreichend große Gewebestücke für die histologische und später bei den in vivo Untersuchungen für die mikrobiologische Untersuchung gewonnen werden konnten. Diese Biopsienadel kam zuvor in einer Studie von RICHTERICH et al. (2009) an Hengsthoden zum Einsatz. ANDERSEN et al. (2002) und VELS et al. (2009) nutzten die perkutane Feinnadelbiopsie, um minimalinvasiv bovines Lebergewebe zu gewinnen. Um den physiologischen Verhältnissen am lebenden Tier möglichst nahe zu kommen, wurden die Euter in ein Metallgestell gehängt. Da diese Proben ausschließlich einer histologischen Untersuchung zugeführt wurden, konnte auf sterile Kautelen bei der Entnahme verzichtet werden und es wurde sich lediglich auf eine Säuberung der Euterhaut mit Wasser beschränkt. Beim Positionieren der Einführnadel konnte mittels verstellbaren Federrings und Zentimeter-skala auf selbiger eine Einstichstiefenbegrenzung vorgenommen werden, welche ein zu weites Eindringen in das Euter verhinderte. Auf diese Weise konnten die Proben immer aus der gleichen Tiefe des Organs entnommen werden. Nach Positionierung und Entfernung des eingeschraubten Mandrins wurde das gespannte Biopsieinstrument vollständig in die Hohl-nadel eingeführt. Da im gespannten Zustand die Kammer für die Probe geschlossen ist, konnte ausgeschlossen werden, dass anderes Gewebe, als das von der zu beprobenden Stelle mit entnommen wurde. Dies wurde im Rahmen der histologischen Untersuchungen überprüft. Beim Verschieben der Entnahmekammer und beim Vorschnellen der Hülse im Auslösevorgang musste darauf geachtet werden, dass das Biopsieinstrument gerade in der Einstichrichtung positioniert blieb, da es sonst zu Deformationen der feinen Spitzen kommen konnte. Die defekten Nadeln konnten zum Teil nur schwer oder gar nicht durch die Einführnadel zurückgezogen werden. In diesem Fall mussten sie zusammen entnommen werden. Da die Vorversuche an Schlachthoforganen stattfanden, konnte diese Komplikation bei den lebenden Probanden vermieden werden. Bei erfolgreich gewonnener Probe lies sich das geschlossene Biopsieinstrument problemlos entnehmen. Nach Spannen der Feder konnte die Kammer geöffnet und das Gewebe in das entsprechende Behältnis überführt werden.

In der Gruppe der lebenden Probanden waren verschiedene Funktionszustände der Milchdrüsen vorhanden. So wurden neben gesunden und erkrankten Milchdrüsen

auch Proben von Eutern von Färsen und trockenstehenden Tieren gewonnen. Vor jeder Biopatentnahme wurde eine klinische Euteruntersuchung durchgeführt. So konnte neben der Feststellung des Gesundheitszustandes, im Vergleich mit den Untersuchungen an den darauf folgenden Tagen die Auswirkung des Eingriffs auf das Organ bestimmt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Viertelgemelksproben zur bakteriologischen Untersuchung gewonnen.

Wie in der Literatur von FARR et al. (1996) beschrieben, konnte durch Rasieren der Haare, Reinigen der Euterhaut mit Alkohol und Abspülen mit Skinsept® eine saubere, keimarme Fläche für den Eingriff geschaffen werden. Ein weiterer Vorteil dieser Prozedur war, dass sich so die oberflächlichen Eutergefäße gut unter der Haut abzeichneten und beim Einstechen der Einführnadel leicht umgangen werden konnten. Das Gerät wurde dann bis zum nächsten Einsatz am selben Probanden in geöffnetem Zustand in einer Nierenschale mit Alkohol gelagert, um eine Desinfektion zu gewährleisten.

Bei den Verlaufsuntersuchungen an den darauf folgenden Tagen bis zum Verschwinden der Hämogalaktie zeigte sich, dass beim ersten Melken in 14 (45 %) Vierteln Blutkoagel den Strichkanal verlegten. Diese wurden wie bei FARR et al. (1996) von Hand abgemolken, sodass das Euter danach mit der Melkmaschine entleert werden konnte. Allgemein tolerierten die Kühe den Melkvorgang von Hand und mit der Maschine gut und zeigten keine Schmerz- oder Abwehrreaktionen. Die Einstiche durch die Haut entzündeten sich in keinem Fall, was nicht zuletzt dem geringen Durchmesser des Biopsieinstruments zu verdanken war, welcher ebenso längeres Nachbluten durch die Haut verhinderte. Das durchschnittliche Ende der Hämogalaktie lag mit sechs Tagen im Bereich der von FARR et al. (1996) beschriebenen 6,5 Tage, wobei hier Gelschwämmchen zum Beschleunigen der Hämostase eingesetzt wurden. Bei den eigenen Probanden war nie länger als 13 Tage nach der Gewebeentnahme makroskopisch sichtbar Blut im Gemelk enthalten. Dieser Wert lag deutlich unter den von MARX und CARULO (1963) genannten 21 Tagen bis zum Ende der Hämogalaktie. Eine Höchstdauer der Nachblutungen von sieben Tagen konnten sie nur erreichen, wenn die Proben mittels Skalpell und anschließender Ligatur der Entnahmestelle gewonnen wurden. Die Resorptionsdauer der subkutanen Hämatome von einer Woche stimmte mit den von FARR et al. (1996) beschriebenen sechs Tagen überein.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Ultrasonographische Ergebnisse

Die Organstrukturen ließen sich wie in der Literatur beschrieben darstellen. Die Euterhaut zeigte sich immer zweischichtig mit stärker echogener *Cutis* und schwächer echogener *Subcutis*. Das Drüsenparenchym war eine Mischung aus starken echogenen und schwachen echogenen Bezirken. Flüssigkeitsgefüllte Hohlräume wie Milchgänge und Blutgefäße erschienen anechogen (JENNINGER, 1989; TAKEDA, 1989; TROSTLE und O'BRIEN, 1998; CARTEE et al., 1986; FLÖCK und WINTER, 2006). Die *Vena mammaria cranialis* konnte bei fast allen Vordervierteln in der proximalen Etage auf Grund ihres Durchmesser von durchschnittlich 1,5 cm (1,1 cm bis 3,8 cm) und der Verfolgbarkeit bis unter die ventrale Bauchdecke eindeutig identifiziert werden. BRAUN und HOEGGER (2008) fanden bei der ultrasonographischen Untersuchung von Braunviehkühen einen Durchschnittswert von 1,3 cm. Mit einer durchschnittlichen Verlauftiefe von 2,4 cm lag sie so oberflächennah, dass ein Biopieren in dieser Region nicht ohne größere Komplikationen möglich gewesen wäre. Da die übrigen Gefäße in der untersuchten Tiefe bis auf oberflächliche und unter der Haut sichtbare Euterven geringe Durchmesser aufwiesen und sich deren Verlauf sehr uneinheitlich zeigte, war eine Gewebeprobenentnahme aus einer Tiefe von bis zu 4 cm auf der restlichen Fläche ohne vorhergehende Sonographie möglich. Um jedoch die Proben von vergleichbaren Orten entnehmen zu können, blieb als einzige Alternative die distalste Etage, also der Bereich des Milchsammelraumes.

5.3.2 Histologische Ergebnisse

Die Herstellung der Gewebeschnitte war auf Grund der relativ kleinen Größe der Biopate unproblematisch. Für die Auswertung waren die Präparate groß genug, um sich ein genaues Bild verschaffen zu können. Dies war auch der exzellenten Funktionsweise des Biopsieinstruments zu verdanken, welches sehr glatte Kanten und kaum Gewebeerreissungen erzeugte. So waren bei den Schnitten aus den Schlachthoforganen 72 % der Biopatfläche auswertbar und bei denen vom Drüsengewebe lebender Tiere 87 %.

Die untersuchten Milchdrüsen wiesen die in der Literatur beschriebenen histologischen Strukturen auf. Es konnten Alveolen in unterschiedlichem Füllungszustand dargestellt werden, wodurch das Alveolarepithel entweder niedrig- oder hochprismatisch erschien (SMOLLICH, 1992). Der Übergang von Alveolen in kleine Milchgänge

und über große Milchgänge in die Drüsenzisterne war durch die Anzahl und Form der Epithelschichten nachweisbar. Die kleinen Milchgänge wiesen ein einschichtig kubisches Epithel auf (LUDEWIG, 1997). Nach dem Übergang dieser in die großen Milchgänge besteht die Wandung aus einem zweischichtig abgeflachten kubischen Epithel (CALHOUN und STINSON, 1976). In Richtung Milchsammelraum nahmen die beiden Epithellagen immer mehr an Stärke zu und wandelten sich im Milchsammelraum zu einem zweischichtig hochprismatischen Epithel (LIEBICH et al., 2003). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermöglichte es, Entzündungszellen eindeutig anzusprechen und darzustellen. Das Erscheinungsbild der Polymorphen Neutrophilen Granulozyten passte zu dem in der Literatur beschriebenen Aussehen (PAAPE et al., 1979) und ein massives Vorkommen in den Alveolen war ein Hinweis auf eine akute Mastitis (PIEPERS et al., 2009). Die Makrophagen als weitere wichtige Phagozyten waren fast überall zu finden und sind im trockenstehenden Euter in der Regel die am häufigsten vorkommende Zellart (PAAPE et al., 1979). Ein vermehrtes Auftreten von Fibroblasten, Plasmazellen und Gefäßproliferation deutete auf einen chronischen Entzündungsprozess der Milchdrüse hin (FUCHS, 1994). Die Lokalisation der Plasmazellen in der Nähe des Drüsenepithels stimmt mit den Angaben in der Literatur überein (LASCELLES, 1979). In einem atrophierten Viertel konnte nur Bindegewebe und kein Drüsenparenchym gefunden werden (FUCHS, 1994).

5.3.3 Mikrobiologische Ergebnisse

Mikrobiologische Untersuchungen wurden in der Milch und dem Gewebe durchgeführt. Die nachgewiesenen Bakterien wurden den beiden Gruppen pathogene und apathogene Keime zugewiesen.

45 Milchproben wurden mikrobiologisch untersucht. Die bakteriell positiven Viertelgemelksproben enthielten in 17 % der Fälle Mastitiserreger und in 92 % apathogene Keime. Die zu den pathogenen Erregern gezählten *Arcanobacterium pyogenes*, Coliforme Keime und *Staphylococcus aureus* kamen in einen Fall in Reinkultur, zweimal in Mischkultur mit einem apathogenen Bakterium und einmal in Mischkultur untereinander vor. In der Gruppe der apathogenen Keime kamen als häufigste Bakterien *Corynebakterium spezie*s und koagulasenegative Staphylokokken vor. Seltenere waren aerobe Bazillen, aesculinpositive Streptokokken und Enterokokken vertreten. Insgesamt lag bei 75 % der positiven Nachweise eine Reinkultur vor, welche zu 94 % aus apathogenen Keimen bestand. Ein nahezu gleiches Keimspektrum fanden

TENHAGEN et al. (2006) bei ihren bakteriologischen Untersuchungen von Viertel-gemelksproben. In dieser Studie waren die am stärksten vertretenen Bakterien auch die apathogenen Keime (63 %) *Corynebakterium* spezieis und koagulasenegative Staphylokokken. Die bakteriologisch negativen Proben (47 %) fielen in den eigenen Untersuchungen niedriger aus als in den Studien von HOGAN et al. (1989) mit 76 %, TENHAGEN et al. (2006) mit 74 % und PIEPERS et al. (2007) mit 80 %. Gegenüber JANOSI und BALTAY (2004) mit 42 % waren die unauffälligen Ergebnisse jedoch fast identisch. Auch das Vorkommen von koagulasenegativen Staphylokokken in dieser Studie (41 %) stimmte mit den eigenen Untersuchungen (38 %) und weiteren anderen (RUFFO und ZECCONI, 1994; CHAFFER et al., 1999; ZECCONI und PICCININI, 2002; PIEPERS et al., 2007) nahezu überein. Dieser Datenvergleich zeigt, dass repräsentative Ergebnisse erzielt wurden.

Bei den Untersuchungen der Gewebeproben (n = 63) konnte von 38 bakteriologisch positiven Befunden in elf Fällen (29 %) einer der pathogenen Keime wie *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oder *Nocardia species* nachgewiesen werden. Zweimal lag eine Reinkultur vor, dreimal eine Mischkultur zweier pathogener Erreger mit einem apathogenen Bakterium und fünfmal eine Mischkultur mit einem apathogenen Keim. In der Gruppe der apathogenen Bakterien waren koagulasenegative Staphylokokken, aerobe Bazillen und Enterokokken die am häufigsten nachgewiesenen Erreger. Weniger häufig kamen aesculinpositive Streptokokken, *Corynebacterium*spezieis, alphahämolysierende Streptokokken, *Yersinia enterocolitica*, bewegliche Aeromonaden und *Staphylococcus warneri* vor. Somit waren in 95 % der mikrobiologisch positiven Gewebeproben apathogene Keime vertreten und bei 50 % dieser lag eine Reinkultur vor, welche zu 90 % aus apathogenen Bakterien bestand. Sehr ähnliche Ergebnisse erhielten BENITES et al. (2002) bei mikrobiologischen Untersuchungen von aus den Eutern geschlachteter Kühe entnommenen Gewebeproben. In dieser Studie lag der Anteil der bakteriologisch negativen Proben mit 30 % in der Größenordnung der eigenen Daten mit 40 % und das Vorkommen von koagulasenegativen Staphylokokken als häufigster Keim stimmte mit 53 % exakt überein.

Yersinia enterocolitica ist ein ubiquitär vorkommender Mikroorganismus (FREDRIKSSON-AHOMAA und KORKEALA, 2003). Als Hauptreservoir gilt das Schwein (BONARDI, 2007). Beim Rind konnte der coliforme Fäkalkeim in den Tonsil-

len und im Fäzes nachgewiesen werden (BONARDI, 2007; BUCHER et al., 2008). Somit könnte der Nachweis dieses Keimes in den eigenen Untersuchungen durch Kontamination zu erklären sein. Da REA (1992) und KAGKLI et al. (2007) das Bakterium in Milchproben nachweisen konnten, kann auch der galaktogene Infektionsweg der Milchdrüse in Betracht gezogen werden, womit kein falsch positives Ergebnis vorliegen würde. Bei der histologischen Untersuchung des Gewebes, in welchem 2-fach positiv *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen wurde, waren Polymorphe Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen und Fibroblasten enthalten. In der 1-fach positiven Gewebeprobe kamen Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen und Fibroblasten vor. Die klinische Untersuchung zeigte bei beiden Vierteln keine Auffälligkeiten.

Das Bakterium *Staphylococcus warneri* gehört zur Gruppe der koagulasenegativen Staphylokokken (GILLESPIE et al., 2009). Häufig werden sie auf der Euterhaut, im Strichkanal und in der Milch nachgewiesen. Nachdem dieses Bakterium früher als apathogen galt, wird heute davon ausgegangen, dass es für erhöhte Zellzahlen und verringerte Milchleistung verantwortlich sein könnte (WATTS et al., 1991). So könnte das Vorkommen des Keims in den Gewebeproben der eigenen Untersuchungen durch Kontamination bei der Probenentnahme oder galaktogene Infektion erfolgt sein. Nach den Erkenntnissen aus einer Studie von BARIGYE et al. (2007) könnte aber auch der hämatogene Infektionsweg in Frage kommen. Hier wurde *Staphylococcus warneri* in verschiedenen Organen eines abortierten Rinderfetus nachgewiesen. Eine aufsteigende Infektion über den Genitaltrakt konnte zwar in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, aber auf Grund von mikroskopisch sichtbaren Plazentalessionen tendierten die Autoren zur Hypothese der hämatogenen Ausbreitung. Dies korreliert mit Erkenntnissen aus der Humanmedizin, welchen zu Folge Infektionen mit koagulasenegativen Staphylokokken oft zu Bakteriämien führen (ANDAY und TALBOT, 1985; MARTIN et al., 1989; KARNATH et al., 1992). Die klinische Untersuchung war bei dem Viertel mit dem 2-fach positiven Nachweis für *Staphylococcus warneri* bis auf einen 3-fach positiven California Mastitis Test unauffällig. Bei der histologischen Untersuchung konnten Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, Fibroblasten und Gefäßproliferationen erkannt werden. Diese Befunde sprechen für eine Infektion der Milchdrüse mit *Staphylococcus warneri*.

5.3.4 Korrelation der histologischen mit den mikrobiologischen Ergebnissen

Nach der Vorlage der Ergebnisse aus der histologischen Untersuchung der Gewebeproben und aus der mikrobiologischen Untersuchung von Milch- und Gewebeproben stellte sich die Frage, ob es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Proben eines Euterviertels gab.

Bei diesem Vergleich konnten sehr wenige signifikante Zusammenhänge gefunden werden. So gab es zwischen dem Vorkommen von *Arcanobacterium pyogenes* in den bakteriologisch untersuchten Paarproben von Milch und Gewebe sowie dem Vorhandensein von *Staphylococcus aureus* in selbigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang. Weitere statistisch signifikante Übereinstimmungen lieferte der Vergleich der mikrobiologischen Untersuchung von Milch- oder Gewebeproben mit den histologischen Befunden. So kam eine positive bakteriologische Untersuchung der Milch häufiger gemeinsam mit Plasmazellen oder Gefäßproliferationen im Gewebe vor. Pathogene Keime im Gewebe waren häufiger mit Bindegewebsproliferationen vergesellschaftet und pathogene Keime in der Milch oder *Staphylococcus aureus* in der Milch traten häufiger zusammen mit Polymorphen Neutrophilen Granulozyten in der histologischen Untersuchung auf.

Da bei der statistischen Überprüfung der Ergebnisse aus den verschiedenen Untersuchungen eines Euterviertels sehr wenige Übereinstimmungen gefunden werden konnten, ergibt sich die Schlussfolgerung, dass ein diagnostisches Instrument allein nicht zuverlässig Aufschluss über den wirklichen Gesundheitszustand der Milchdrüse gibt. So könnte die Biopsientnahme mit anschließender bakteriologischer und histologischer Untersuchung der gewonnenen Gewebeprobe zum Beispiel im Falle eines negativen Ergebnisses der Milchuntersuchung eine weitere Möglichkeit sein, um die Ursache einer erhöhten Zellzahl zu diagnostizieren.

In der Literatur existieren keine Angaben über den Vergleich mikrobiologischer Untersuchungsergebnisse von Milch- und Gewebeproben, welche zum gleichen Zeitpunkt aus einem Euterviertel gewonnen wurden. Vielmehr wurden mikrobiologische Untersuchungsergebnisse von Gewebeproben aus Eutern geschlachteter Kühe mit denen von Milchproben aus einer anderen Studie hinsichtlich des Keimspektrums direkt gegenübergestellt (BENITES et al., 2002; WATTS, 1988). Bei der Entnahme von Gewebe aus den Milchdrüsen geschlachteter Tier besteht die Gefahr, dass das Keimspektrum durch postmortale Kontamination beeinflusst wird. In den eigenen Untersuchungen ähnelte sich die Verteilung der Bakterien in Milch- und Gewebeproben

stark, jedoch zeigt die statistische Bearbeitung der Daten, dass dies nicht aus der Übereinstimmung der Ergebnisse der einzelnen Euterviertel resultiert. So stellt sich die Frage, ob diese Unterschiede aus dem tatsächlichen Vorkommen der Bakterien oder aus Kontaminationen während der Probenentnahmen resultieren. Die Verunreinigungsquellen bei der Milchprobenentnahme sind in den Strichkanal aszendierende Keime oder Schmutzpartikel, welche während des Melkvorganges von der Euter- oder Zitzenhaut in das Entnahmeröhrchen gelangen. Diese können vermieden werden, wenn die ersten Strahlen des Gemelks verworfen werden, das Röhrchen nahezu waagrecht neben der Kuh positioniert wird und die Milch in horizontaler Richtung eingespritzt wird (DVG, 2009). Die Milchprobenentnahme erfolgte im Rahmen der Untersuchungen in genau dieser Weise.

Auch bei der Gewebeprobenentnahme besteht die Gefahr von Kontamination. So können beim Einstich der Einführnadel durch die Haut Keime mit ins Euter gelangen, welche dann beim Bioptieren mit entnommen werden. Auch können Keime von der Körperoberfläche des Tieres nach der Entnahme des Gewebes auf das Biopsieinstrument gelangen. Ein weiteres Risiko besteht während der Ablage der Nadel zwischen den einzelnen Arbeitsschritten. Das Einschleppen von Keimen wird durch Rasieren und Desinfizieren der Euterhaut im Bereich der Einstichstellen verhindert (FARR et al., 1996) und mit der Verwendung eines geschlossenen Biopsiesystems verringert sich die Gefahr der Kontamination durch Mikroorganismen von der Körperoberfläche. Eine Verunreinigung des Instruments zwischen den Gewebeentnahmen konnte durch Lagerung in Ethanol vermieden werden. Nach der Durchführung dieser Hygienemaßnahmen kann davon ausgegangen werden, dass eine Kontamination der Milch- und Gewebeproben als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist.

5.4 Praktische Hinweise für die Biopstatentnahme am bovinen Euter

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen lassen sich folgende Hinweise für die Entnahme von Biopstaten an der bovinen Milchdrüse ableiten:

- Es muss keine sonographische Untersuchung erfolgen, um einen geeigneten Zugang für die Entnahme einer Gewebeprobe zu finden.
- Lediglich die Basis der Vorderviertel sollte auf Grund des Verlaufs der *Venae mammae craniales* gemieden werden.
- Am übrigen Euter sind in einer Tiefe bis zu 5 cm nur kleine Gefäße mit unspezifischem Verlauf zu finden, sodass hier eine Biopstatentnahme ohne größere Komplikationen möglich ist.
- Bei Anwendung des Biopsieinstruments SuperCore™ sollte die Einführnadel während der Entnahme der Gewebeprobe in Einstichrichtung mit einer Hand fixiert werden, um Deformationen der feinen Spitze des Biopsieinstruments zu verhindern.
- Nach Entnahme der Einführnadel sollte die Hautwunde durch einminütiges Abdrücken verschlossen werden, um die Entstehung eines subkutanen Hämatoms zu verhindern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Biopstatentnahme eine Ergänzung der klinischen Untersuchungsmethode darstellt, die gut in der Praxis angewandt werden kann. Zudem sollte dieses Verfahren im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen, die sich mit der Pathogenese der Mastitis in vivo beschäftigen, vermehrt genutzt werden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es ein schonendes Gewebeentnahmeverfahren am bovinen Euter in vivo zur histologischen Untersuchung zu etablieren.

Um eine Einschätzung über das Vorkommen und den Verlauf von Blutgefäßen zu erhalten, wurden die Euter von 16 eutergesunden laktierenden Kühen der Rasse Fleckvieh ultrasonographisch untersucht. Auf dieser Grundlage wurden die Lokalisationen für die Biopstatentnahme gewählt. Zuerst wurden 10 Schlachthoforgane an je 10 Lokalisationen bioptiert. Im nächsten Schritt wurde bei 16 Kühen pro Viertel je ein Euterbiopstat entnommen.

Bei der sich anschließenden histologischen Untersuchung des Eutergewebes wurden die Auswertbarkeit der Schnitte und verschiedene histologische Parameter erfasst. Von den Gewebeproben aller lebenden Kühe wurde zusätzlich ein Teil der Biopsie einer bakteriologischen Untersuchung unterzogen. Diese Ergebnisse wurden mit den histologischen Befunden und den Resultaten einer bakteriologischen Untersuchung einer Milchprobe aus dem entsprechenden Viertel verglichen.

Folgende relevante Ergebnisse wurden erzielt:

Ultrasonographie:

- Subkutane Gefäße und die *Venae mammae craniales* sollten bei der Biopstatentnahme umgangen werden. Bis in die untersuchte Tiefe von 5,7 cm sind die übrigen Gefäße klein und der Verlauf variiert individuell.

Biopstatentnahme:

- Kühe tolerieren den Eingriff sehr gut
- Nach der Probenentnahme konnte bei 56 (87 %) Fällen Milch-, Blutfluss oder beides durch die im Euter verweilende Einführnadel beobachtet werden.
- Bei Entfernung der Einführnadel kam bei 17 (26 %) der bioptierten Viertel Milch- oder Blutfluss durch die Haut vor, bei vier (6 %) entstand ein subkutanes Hämatom und bei 47 (73 %) Vierteln konnten keine Komplikationen festgestellt werden.

Euterbefunde nach der Biopotentnahme:

- Keine der Einstichstellen entzündete sich.
- Ein (3 %) Viertel wurde derb und warm. Der CMT erhöhte sich in vier (13 %) Fällen um zwei oder mehr Kategorien.
- Das Ende der Hämogalaktie nach der Biopotentnahme lag zwischen null und 13 Tagen, im Durchschnitt waren es sechs Tage.
- Subkutane Hämatoome waren nach einer Woche vollständig resorbiert.

Mikrobiologische Befunde der Milch:

- Die am häufigsten nachgewiesenen Bakterienspezies waren *Corynebakterium* Spezies (24 %) und koagulasenegative Staphylokokken (20 %). Alle übrigen Keimarten wurden mit einer Häufigkeit unter 10 % nachgewiesen.

Mikrobiologische Befunde des Gewebes:

- Am zahlreichsten wurden die Bakterienspezies koagulasenegative Staphylokokken (32 %), aerobe Bazillen (18 %), *Escherichia coli* (13 %) und Enterokokken (11 %) nachgewiesen. Die anderen Keimarten waren mit einer Häufigkeit unter 10 % vertreten.
- Mit *Yersinia enterocolitica* (zwei Fälle) und *Staphylococcus warneri* (ein Fall) konnten zwei für die Milchdrüse untypische Keimarten nachgewiesen werden.

Histologische Befunde des Gewebes:

- Jede entnommene Probe konnte histologisch ausgewertet werden. Die Proben weisen mit 87 % auswertbarer Fläche einen guten Zustand auf.
- Im Gewebe konnten Entzündungsparameter wie Polymorphe Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, Fibroblasten und Gefäßproliferationen gefunden werden.

Zusammenhang zwischen bakteriologischer Untersuchung von Milch und Gewebe:

- Für *Arcanobacterium pyogenes* konnte eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem Vorkommen in Milch- und Gewebeprobe festgestellt werden ($r_s = 0,68$; $p < 0,0001$).

- Die gleiche statistisch signifikante positive Korrelation konnte für den Vergleich des Vorhandenseins von *Staphylococcus aureus* in der mikrobiologischen Untersuchung von Milch- und Gewebeproben nachgewiesen werden ($r_s = 0,70$; $p < 0,0001$).
- Beim Vergleich des qualitativen Vorkommens konnte für *Arcanobacterium pyogenes* und *Staphylococcus aureus* ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten im Vergleich zu den anderen Bakterien in Milch- und Gewebeproben nachgewiesen werden ($p = 0,045$).

Zusammenhang zwischen positiver bakteriologischer Untersuchung von Milch oder Gewebe und Vorkommen eines Entzündungsparameters in der Histologie:

- Eine positive bakteriologische Untersuchung der Milch trat signifikant häufiger gemeinsam mit Plasmazellen in der Histologie auf ($p = 0,0015$).
- Gefäßproliferationen kamen signifikant häufiger gleichzeitig mit einem positiven Ergebnis der bakteriologischen Milchuntersuchung vor ($p = 0,014$).

Zusammenhang zwischen Vorhandensein eines pathogenen Keims in Milch oder Gewebe und Vorkommen eines Entzündungsparameters in der Histologie:

- Es konnte ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten von Bindegewebsproliferation und pathogenen Bakterien im Gewebe nachgewiesen werden ($p = 0,046$).
- Polymorphe Neutrophile Granulozyten in der Histologie wurden signifikant häufiger gemeinsam mit pathogenen Bakterien in der Milch festgestellt ($p = 0,030$).
- Für das Vorkommen von *Staphylococcus aureus* in der Milch und Polymorphe Neutrophile Granulozyten in der Histologie konnte ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten nachgewiesen werden ($p = 0,046$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Biopsientnahme am bovinen Euter ohne größere Komplikationen eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse der statistischen Tests zeigen, dass ein diagnostisches Verfahren alleine keine eindeutige Aussage über den wirklichen Gesundheitszustand der Milchdrüse gibt. So kann bei Unklarheiten die Biopsie als Ergänzung der klinischen Untersuchungsmethode eingesetzt werden. Auch für wissenschaftliche Untersuchungen, die sich mit der Pathogenese der Mastitis in vivo beschäftigen, kann diese Methode neue Wege eröffnen.

7 Summary

Aim of the present study was to establish a careful tissue sampling technique at the bovine udder in vivo for histological examination.

To obtain estimation about the occurrence and locations of blood vessels, udders of sixteen healthy lactating simmentaler cows were examined. On this base localizations for biopsy sampling were chosen. At first ten slaughterhouse organs were bioptated at ten localizations. For the next step one udder biopsy per quarter was taken of sixteen cows.

At the following histological examination of mammary tissue the processability of slices and different histological parameters were recorded. Additionally a part of the biopsy of the tissue samples of all living cows was subjected a bacteriological examination. These results were compared with histological findings and results of bacteriological examination of milk samples from corresponding quarters.

Following relevant results were obtained:

Ultrasound:

- Subcutaneous vessels and the *venae mammae craniales* should be passed by during biopsy sampling. Till the examined depth of 5.7 cm the remaining vessels were small and the run varied individually.

Biopsy sampling:

- Cows tolerated intervention very good.
- After sample extraction in 56 (87 %) cases milk flow, blood flow or both could be noticed through the coaxial needle remaining in the udder.
- During the removal of the coaxial needle in 17 (26 %) of bioptated quarters milk- or blood flow appeared through skin, in four (6 %) cases a subcutaneous haematoma occurred and in 47 (73 %) quarters no complications could be recognized.

Udder findings after biopsy sampling:

- None of the punctures inflamed.
- One (3 %) of the quarters got dense and warm. The CMT increased in four (13 %) cases about two or more categories.
- The end of haemogalactia after biopsy sampling laid between zero and thirteen days, to an average of six days.
- Subcutaneous haematoma were totally resorbed after one week.

Microbiological findings of milk:

- Species of bacteria most frequently isolated were corynebacterium species (24 %) and coagulase-negative staphylococci (20 %). The frequency of all other species was lower than 10 %.

Microbiological findings of tissue:

- The bacteria species coagulase-negative staphylococci (32 %), aerobe bacilli (18 %), *Escherichia coli* (13 %) and enterococci (11 %) were detected most frequently. The frequency of all other species was lower than 10 %.
- Two species untypical for the mammary gland were detected: *Yersinia enterocolitica* (two cases) and *Staphylococcus warneri* (one case).

Histological findings of tissue:

- Each extracted sample could be analysed histologically. With 87 % analyzable area samples had a good state.
- Inflammation parameters like polymorph neutrophil granulocytes, lymphocytes, macrophages, fibroblasts and vessel proliferation could be found in tissue.

Correlation between bacteriological examination of milk and tissue:

- There was a significant positive correlation between the appearance of *Arcanobacterium pyogenes* in milk- and tissue samples ($r_s = 0.68$; $p < 0.0001$).
- A significant positive correlation could be found for the comparison of the appearance of *Staphylococcus aureus* in the microbiological examination of milk- and tissue samples ($r_s = 0.70$; $p < 0.0001$).
- At the comparison of qualitative occurrence for *Arcanobacterium pyogenes* and *Staphylococcus aureus* a significant more frequent common incidence could be detected in relation to other species in milk- and tissue samples ($p = 0.045$).

Correlation between positive bacteriological examination of milk or tissue and appearance of an inflammation parameter in histology:

- A positive bacteriological examination of milk occurred significant more frequently in combination with plasma cells in the tissue ($p = 0.0015$).
- Vessel proliferation appeared significant more frequently together with a positive result of bacteriological milk examination ($p = 0.014$).

Correlation between existence of pathogenic bacteria in milk or tissue and appearance of an inflammation parameter in histology:

- A significant more frequent common occurrence of connective tissue proliferation and pathogenic bacteria in tissue could be detected ($p = 0.046$).
- Polymorph neutrophil granulocytes in tissue were significant more frequently found together with pathogenic bacteria in milk ($p = 0.030$).
- For the existence of *Staphylococcus aureus* in milk and polymorph neutrophil granulocytes in tissue a significant more frequent common appearance could be found ($p = 0.046$).

In conclusion it is ascertainable that biopsy sampling could be used without greater complications at the bovine udder. Results of statistic tests showed that one diagnostic method alone doesn't give a statement about the real health status of mammary gland. In case of ambiguity biopsy could be used for supplementation of clinical examination methods. This method can also break new ground for scientific studies, which concentrate on pathogenesis of mastitis in vivo.

8 Literaturverzeichnis

ANDAY, E. K., TALBOT, G. H. (1985)

Coagulase-negative staphylococcus bacteremia – a rising threat in the newborn infant

Ann. Clin. Lab. Sci. 15, 246-251

ANDBERG, W. G., KARLSON, A. G. (1942)

Biopsy of the Bovine Mammary Gland in Connection with Mastitis Studies

Cornell Vet. 32, 237

ANDERSEN, J. B., MASHEK, D. G., LARSEN, T., NIELSEN, M. O., INGVARTSEN, K. L. (2002)

Effects of Hyperinsulinaemia under Euglycaemic Condition on Liver Fat Metabolism in Dairy Cows in Early and Mid-lactation

J. Vet. Med. A. 49, 65-71

BARIGYE, R., SCHAAN, L., GIBBS, P. S., SCHAMBER, E., DYER, N. W. (2007)

Diagnostic evidence of Staphylococcus warneri as a possible cause of bovine abortion

J. Vet. Diagn. Invest. 19, 694-696

BENITES, N. R., GUERRA, J. L., MELVILLE, P. A., DA COSTA, E. O. (2002)

Aetiology and Histopathology of Bovine Mastitis of Espontaneous Occurrence

J. Vet. Med. A. 49, 366-370

BISPING, W., AMTSBERG, G. (1988)

Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals

Parey Verlag Berlin Hamburg

BLOSSER, T. H. (1979)

Economic Losses from and the National Research Program on Mastitis in the United States

J. Dairy Sci. 62 (1), 119-127

BOMMELI, W. (1972)

Die Ultrastruktur der Milchdrüsenalveole des Rindes, insbesondere die Basalfalte des Epithels und der Mitochondrien-Desmosomen-Komplex

Zbl. Vet. Med. C 1, 299-325

BONARDI, S., PARIS, A., BACCI, C., D'INCAU, M., FERRONI, L., BRINDANI, F. (2007)

Detection and Characterization of *Yersinia enterocolitica* from Pigs and Cattle

Vet. Res. Com. 31 (S1), 347-350

BRAGULLA, H., KÖNIG, H. E. (1999)

Kap.: Milchdrüse (Mamma)

In: König, H. E., Liebich, H.-G. (Hrsg.): Anatomie der Haussäugetiere, Band 2, Organe, Kreislauf- und Nervensystem, 1. Aufl., Schattauer Verlag Stuttgart New York, 335-344

BRAUN, U., HOEGGER, R. (2008)

B-mode and colour Doppler ultrasonography of the milk vein in 29 healthy Swiss braunvieh cows

Vet. Rec. 163, 47-49

BUCHER, M., MEYER, C., GRÖTZBACH, B., WACHECK, S., STOLLE, A., FREDRIKSSON-AHOMAA, M. (2008)

Epidemiological Data on Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany During 2000–2006

Foodborne Pathog. Dis. 5 (3), 273-80

CALHOUN, M. L., STINSON, A. W. (1976)

Kap.: Mammary Gland

In: Dellmann, H. D., Brown, E. M. (Hrsg.): Textbook of Veterinary Histology, Verlag Lea und Febiger Philadelphia, 480-485

CARTEE, R. E., IBRAHIM, A. K., MCLEARY, D. (1986)

B-mode ultrasonography of the bovine udder and teat

J. Am. Vet. Med. Ass. 188 (11), 1284-1287

CHAFFER, M., LEITNER, G., WINKLER, M., GLICKMAN, A., KRIFUCKS, O., EZRA, E., SARAN, A. (1999)

Coagulase-negative *Staphylococcus* and mammary gland infections in cows

J. Vet. Med. A. 46, 707-712

COSTA, E. O., RIBEIRO, M. G., RIBERO, A. R., ROCHA, N. S., NARDI JUNIOR, G. (2004)

Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining and scanning electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak

Mycopathologia 158, 81-85

DIXON, W. J. (1993)

BMDP Statistical Software Manual, Volume 1, 2 and 3. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

DOBBINS, C. N. Jr. (1977)

Mastitis losses

J. Am. Vet. Med. Ass. 170, 1129-1132

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis (2009)

Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern

DVG

EL HAGRI, M. A. A. M. (1945)

The Aterial System of the Udder of the Cow

Vet. J. 101, 75-88

ELLENBERGER, W., GÜNTHER, G. (1908)

Kap.: Die Milchdrüse, das Euter, Mamma

In: Ellenberger, W., Günther, G. (Hrsg.): Histologie der Haussäugetiere, 3. Auflage, Paul Parey Verlag Berlin, 203-208

FARR, V. C., STELWAGEN, K., CATE, L. R., MOLENAAR, A. J., MCFADDEN, T. B., DAVIS, S. R. (1996)

An Improved Method for the Routine Biopsy of the Bovine Mammary Tissue
J. Dairy Sci. 79 (4), 543-549

FLÖCK, M., WINTER, P. (2006)

Diagnostic ultrasonography in cattle with diseases of the mammary gland
Vet. J. 171 (2), 314-321

FLÜCKIGER, M. (1997)

Kap.: Grundlagen der Ultraschalldiagnostik

In: Braun, U. (Hrsg.): Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik beim Rind, Parey Buchverlag Berlin, 1-8

FRANZ, S., HOFMANN-PARISOT, M., BAUMGARTNER, W. (2004)

Evaluation of the three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland
Am. J. Vet. Res. 65 (8), 1159-1163

FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORKEALA, H. (2003)

Low Occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem
Clin. Microbiol. Rev. 16 (2), 220-229

FUCHS, H.-W. (1994)

Kap.: Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes

In: Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H., Fuchs, H.-W. (Hrsg.): Euter- und Gesäugekrankheiten, Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 226-434

GEYER, H. (2005)

Kap.: Milchdrüse, Mamma

In: Salomon, F.-V., Geyer, H., Gille, U. (Hrsg.): Anatomie für die Tiermedizin, Enke Verlag Stuttgart, 645-655

GILLESPIE, B. E., HEADRICK, S. I., BOONYAYATRA, S., OLIVER, S. P. (2009)

Prevalence and persistence of coagulase-negative Staphylococcus species in three dairy research herds

Vet. Microbiol. 134, 65-72

GLÄTTLI, H. (1924)

Anatomie des Venensystems des Kuheuters

Diss. med. vet. Zürich

GRUNERT, E. (1990)

Kap.: Euter

In: Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (Hrsg.): Die klinische Untersuchung des Rindes, 3. Aufl., Verlag Paul Parey Berlin Hamburg, 525-548

HABERMEHL, K.-H. (1996)

Kap.: Haut und Hautorgane

In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere, Band 3: Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane, 3. Aufl., Paul Parey Verlag im Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH Berlin, 485-491

HEDSTRÖM, H. (1932)

Juvertuberkulos hos ko, en experimentell studie

Skand. Vet.-tidskr. 22 (12), 628-631

HIBBITT, K. G. (1964)

Biopsy of the Bovine Mammary Gland

Vet. Rec. 76 (13), 418-420

HOGAN, J. S., SMITH, K. L., HOBLET, K. H., SCHOENBERGER, P. S., TODHUNTER, D. A., HUESTON, W. D., PRITCHARD, D. E., BOWMAN, G. L., HEIDER, L. E., BROCKETT, B. L., CONRAD, H. R. (1989)

Field Survey of Clinical Mastitis in Low Somatic Cell Count Herds

J. Dairy Sci. 72 (6), 1547-1556

HOSPES, R., SEEH, C. (1999)

Kap.: Embryonale Entwicklung, Nomenklatur und Anatomie der Zitze

In: Sonographie und Endoskopie an der Zitze des Rindes – Atlas und Lehrbuch, Schattauer Verlag Stuttgart New York, 9-12

JANOSI, S., BALTAY, Z. (2004)

Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the california mastitis test and bacteriological status of the udder in dairy cows

Acta Vet. Hung. 52 (2), 173-183

JENNINGER, S. (1989)

Ultraschalluntersuchungen an der Milchdrüse des Rindes. Physiologische und pathologische Befunde.

Diss. med. vet., München

KAGKLI, D. M., VANCANNEYT, M., VANDAMME, P., HILL, C., COGAN, T. M. (2007)

Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces

J. Appl. Microbiol. 103, 1393-1405

KARNATH, U., SINGER, C., ISENBERG, H. D. (1992)

Clinical significance of Staphylococcus warneri bacteremia

J. Clin. Microbiol. 30, 261-264

KNIGHT, C. H., HILLERTON, J. E., TEVERSON, R. M., WINTER, A. (1992)

Biopsy of the Bovine Mammary Gland

Br. Vet. J. 148 (2), 129-132

KOCH, T. (1956)

Die Milchdrüse (Glandula lactifera, Mamma) des Rindes

Mh. Vet. Med. 11, 527-532

KOCH, T., BERG, R. (1993)

Kap.: Euter der Kuh, Über

In: Lehrbuch der Veterinär – Anatomie, Band 3, Die großen Versorgungs- und Steuersysteme, 5. Aufl., Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 569-577

KOSSAIBATI, M. A., ESSLEMONT, R. J. (1997)

The Costs of Production Diseases in Dairy Herds in England

Vet. J. 154 (1), 41-51

KRÖLLING, O. (1960)

Kap.: Die Milchdrüse

In: Krölling, O., Grau, H. (Hrsg.): Lehrbuch der Histologie und vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere, 10. Auflage, Paul Parey Berlin Hamburg, 466-472

LASCELLES, A. K. (1979)

The Immune System of the Ruminant Mammary Gland and its Role in the Control of Mastitis

J. Dairy Sci. 62 (1), 154-160

LE ROUX, J. M. W., WILKENS, H. (1959)

Beitrag zur Blutgefäßversorgung des Euters der Kuh

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 66, 429-435

LIEBICH, H.-G. (2003)

Kap.: Wandbau größerer Blutgefäße

In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Aufl., Schattauer Verlag Stuttgart New York, 133-141

LIEBICH, H.-G., REESE, S., BUDRAS, K. D. (2003)

Kap.: Milchdrüse (Glandula mammaria, Mamma, Euter, Gesäuge)

In: Liebich, H.-G. (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4. Aufl., Schattauer Verlag Stuttgart New York, 323-327

LORENZ, R. J. (1996)

In: Grundbegriffe der Biometrie, 3. Aufl., Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York

LUDEWIG, T. (1996)

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Blut-Milch-Schranke der laktierenden Milchdrüse des Rindes

Anat. Histol. Embryol. 25, 121-126

LUDEWIG, T. (1997)

Milchgänge und Chaos

Anat. Histol. Embryol. 26, 277-280

MARTIN, M. A., PFALLER, M. A., WENZEL, R. P. (1989)

Coagulase-negative staphylococcal bacteremia. Mortality and hospital stay.

Ann. Intern. Med. 110, 9-16

MARX, G. D., CARULO, E. V. (1963)

Method of Biopsy of the Mammary Gland of Cows and Goats

J. Dairy Sci. 46, 576-579

MICHEL, G. (1979a)

Zum Bau der Milchgänge des Rindereuters

Mh. Vet.-Med. 34, 133-137

MICHEL, G. (1979b)

Zur Morphologie der Alveolen des Rindereuters

Mh. Vet.-Med. 34, 385-389

- PAAPE, M. J., WERGIN, W. P., GUIDRY, A. J., PEARSON, R. E. (1979)
Leukocytes-Second Line of Defense Against Invading Mastitis Pathogens
J. Dairy Sci. 62 (1), 135-153
- PIEPERS, S., DE MEULEMEESTER, L., DE KRUIF, A., OPSOMER, G., BARKEMA, H. W., DE VliegHER, S. (2007)
Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium
J. Dairy Res. 74, 478-483
- PIEPERS, S., OPSOMER, G., MEYER, E., DEMEYERE, K., BARKEMA, H. W., DE KRUIF, A., DE VliegHER, S. (2009)
Heifer and quarter characteristics associated with periparturient blood and milk neutrophil apoptosis in healthy heifers and in heifers with subclinical mastitis
J. Dairy Sci. 92, 4330-4339
- PLATONOW, I., BLOBEL, H. (1962)
Biopsy of the Bovine Mammary Gland
Am. J. Vet. Res. 23, 166-167
- REA, M. C., COGAN, T. M., TOBIN, S. (1992)
Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland
J. Appl. Bacteriol. 73, 331-336.
- RICHTERICH, P., BERGMANN, M., WERHREND, A. (2009)
Testicular biopsy in stallions
Reprod. Dom. Anim. 44 (S1), 29
- ROMEIS, B. (1989)
Kap.: Färben der Schnitte
In: Böck, P. (Hrsg.): Mikroskopische Technik, 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg Wien, 179-250

RUFFO, G., ZECCONI, A. (1994)

Update on mastitis aetiology and epidemiology

Proc. 18th World Buiatrics Congress, Bologna (29.08-02.09.1994), 167-175

SCHALM, O. W., NOORLANDER, D. O. (1957)

Experiments and observations leading to the development of the Californian mastitis test

J. Am. Vet. Med. Ass. 130, 199-207

SHAKESPEARE, A. S. (1998)

Use of endoscopy to investigate abnormalities within the bovine udder and teat

Vet. Rec. 142, 672-673

SHVABE, A. K., SOLOVIRA, V. N. (1960)

Application of a Method of Biopsy for Studying the Mammary Gland of the Cow

Izvest. Timiryazev. sel' shokoz. Akad. 35, 214-219

SMOLLICH, A. (1992):

Kap.: Milchdrüse

In: Smollich, A., Michel, G. (Hrsg): Mikroskopische Anatomie der Haustiere, Gustav Fischer Verlag Jena, 336-353

STOCKER, H., RÜSCH, P. (1997)

Kap.: Euter und Zitzen

In: Braun, U. (Hrsg): Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik beim Rind, Parey Buchverlag Berlin, 163-175

TAKEDA, T. (1989)

Diagnostic ultrasonography of the bovine udder

Japan. J. Vet. Res. 37 (2), 133

- TENHAGEN, B. A., KÖSTER, G., WALLMANN, J., HEUWIESER, W. (2006)
Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany
J. Dairy Sci. 89: 2542-2551
- TROSTLE, S. S., O'BRIEN, R. T. (1989)
Ultrasonography of the Bovine Mammary Gland
Comp. Cont. Educ. Pract. 20 (2), 64-71
- VANGROENWEGHE, F., VAN DEN BROECK, W., DE KETELAERE, A., VAN BREE, H., DUCHATEAU, L., BURVENICH, C. (2006)
Endoscopic Examination and Tissue Sampling of the Bovine Teat and Udder Cistern
J. Dairy Sci. 89 (5), 1516-1524
- VELS, L., RØNTVED, C. M., BJERRING, M., INGVARTSEN, K. L. (2009)
Cytokine and acute phase protein gene expression in repeated liver biopsies of dairy cows with a lipopolysaccharide-induced mastitis
J. Dairy Sci. 92, 922-934
- WATTS, J. L. (1988)
Etiological Agents of Bovine Mastitis
Vet. Microbiol. 16, 41-66
- WATTS, J. L., RAY, C. H., WASHBURN, P. J. (1991)
A Convenient Method for Differentiation of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mammary Glands
J. Dairy Sci. 74 (2), 426-428
- ZECCONI, A., PICCININI, R. (2002)
Intramammary infections: epidemiology and diagnosis
In: Kaske, M., Scholz, H., Höltershinken, M. (Hrsg.): Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine, Keynote Lectures, 7th World Buiatrics Congress, Hannover (18-23.08.2002), 346-359

ZIETSCHMANN, O. (1985)

Kap.: Das Euter der Wiederkäuer

In: Ellenberger, W., Baum, H. (Hrsg.): Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere, 18. Aufl., Reprint, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokio, 1056-1062

ZWART, S. G. (1911)

Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Milchdrüse des Rindes

Diss med vet Bern



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5732-9



9 783835 957329