

Aus dem Zentrum für Lebensmittelwissenschaften

Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit

- Milchhygiene -

der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

**Zu Wirkungsmechanismus und Aussagefähigkeit des California Mastitis Tests  
unter besonderer Berücksichtigung der Eutergesundheitsbeurteilung von  
Auktionstieren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

**Diane Kleinschmidt**

aus Remscheid

Hannover 2007

Wissenschaftliche Betreuung:

Univ.-Prof. Dr. Jörn Hamann

1. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Jörn Hamann

2. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Martina Hoedemaker

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2007

**Für meine Eltern**

**in Liebe und Dankbarkeit**



## Inhaltsverzeichnis

Diane Kleinschmidt: Zu Wirkungsmechanismus und Aussagefähigkeit des California Mastitis Tests unter besonderer Berücksichtigung der Eutergesundheitsbeurteilung von Auktionstieren

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Mastitis</b> .....	<b>4</b>
2.1.1	<i>Definition</i> .....	5
2.1.2	<i>Färsenmastitis</i> .....	9
2.1.3	<i>Diagnostik</i> .....	10
2.1.3.1	Zellgehalt (SCC) .....	10
2.1.3.1.1	Fossomatic® (Foss) .....	18
2.1.3.1.2	DeLaval Zellzahl-Messgerät DCC® (DCC®) .....	18
2.1.3.2	Elektrische Leitfähigkeit .....	19
2.1.3.3	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAGase) .....	21
<b>2.2</b>	<b>California Mastitis Test</b> .....	<b>23</b>
2.2.1	<i>Entwicklung</i> .....	23
2.2.2	<i>Reaktionsmechanismus des CMT</i> .....	25
2.2.3	<i>Weiterentwicklung und Objektivierung des CMT sowie vergleichbare Tests</i> .....	27
2.2.3.1	Falling ball Viscosimeter .....	27
2.2.3.2	Rolling ball Viscometer .....	28
2.2.3.3	Rotary Viscometer .....	28
2.2.3.4	Mit dem CMT vergleichbare Reaktionen .....	28
2.2.3.4.1	Brabanter Mastitis Reaktion (BMR) .....	28
2.2.3.4.2	Wisconsin Mastitis Test .....	29

---

2.2.4	<i>Einflüsse auf CMT-Ergebnisse.....</i>	29
2.2.5	<i>CMT im Rahmen der Mastitis-Diagnostik.....</i>	32
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	<i>Betrieb 1.....</i>	34
3.1.2	<i>Betrieb 2.....</i>	35
3.1.3	<i>Tiere der Osnabrücker Herdbuchgesellschaft (OHG) .....</i>	36
<b>3.2</b>	<b>Material .....</b>	<b>37</b>
3.2.1	<i>Milchprobenentnahme.....</i>	37
3.2.2	<i>Blutentnahme .....</i>	38
3.2.3	<i>Elektrische Leitfähigkeit .....</i>	38
3.2.4	<i>California Mastitis Test.....</i>	39
3.2.5	<i>Bakteriologie .....</i>	39
3.2.6	<i>Zellgehalt .....</i>	39
3.2.7	<i>NAGase .....</i>	39
3.2.8	<i>DCC® .....</i>	40
3.2.9	<i>Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT .....</i>	40
3.2.10	<i>Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten mit dem Schalmreagenz .....</i>	40
3.2.11	<i>Zellvitalität .....</i>	42
3.2.12	<i>Reagenzien verschiedener Hersteller .....</i>	43
3.2.13	<i>Eutergesundheit bei Auktionstieren.....</i>	44
3.2.14	<i>Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des Automatischen Melkens (VMS) .....</i>	44
<b>3.3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.3.1	<i>Milchprobenentnahme.....</i>	44
3.3.1.1	<i>Viertelvorgemelk (VVG) .....</i>	44

3.3.1.2	Viertelanfangsgemelk (VAG).....	45
3.3.1.3	Viertelgemelk Hand (VGH).....	45
3.3.2	<i>Blutentnahme</i> .....	45
3.3.3	<i>Probenanalyse</i> .....	45
3.3.3.1	Elektrische Leitfähigkeit .....	45
3.3.3.2	California Mastitis Test (CMT).....	45
3.3.3.3	Bakteriologie .....	46
3.3.3.4	Zellgehalt .....	47
3.3.3.5	NAGase .....	47
3.3.3.6	DCC® .....	47
3.3.4	<i>Laborversuche</i> .....	48
3.3.4.1	Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT .....	48
3.3.4.2	Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (PMN) mit dem CMT-Reagenz.....	48
3.3.4.2.1	Gewinnung von Lymphozyten .....	49
3.3.4.2.2	Gewinnung von PMN .....	49
3.3.4.2.3	Schalmen der Zellfraktionen.....	50
3.3.4.3	Zellvitalität .....	50
3.3.4.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	50
3.3.4.3.2	Probenahme.....	51
3.3.4.3.3	Isolation von Milchzellen .....	52
3.3.4.3.4	Bestimmung der Zellvitalität im FACS® .....	52
3.3.4.4	Reagenzien verschiedener Unternehmen .....	52
3.3.5	<i>Feldversuche</i> .....	53
3.3.5.1	Eutergesundheit von Auktionstieren.....	53
3.3.5.2	Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des Automatischen Melkens (VMS®) .....	55
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertungen</b> .....	<b>56</b>

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Laborversuche .....</b>	<b>59</b>
4.1.1	<i>Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT .....</i>	59
4.1.2	<i>Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten mit dem CMT- Reagenz.....</i>	63
4.1.3	<i>Zellvitalität .....</i>	65
4.1.4	<i>Reagenzien verschiedener Hersteller .....</i>	68
<b>4.2</b>	<b>Feldversuche.....</b>	<b>79</b>
4.2.1	<i>Eutergesundheit von Auktionstieren.....</i>	79
4.2.2	<i>Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des automatischen Melkens.....</i>	96
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>113</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT .....</b>	<b>114</b>
<b>5.2</b>	<b>Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten mit dem CMT-Reagenz.....</b>	<b>116</b>
<b>5.3</b>	<b>Zellvitalität .....</b>	<b>117</b>
<b>5.4</b>	<b>Reagenzien verschiedener Hersteller .....</b>	<b>118</b>
<b>5.5</b>	<b>Eutergesundheit von Auktionstieren .....</b>	<b>122</b>
<b>5.6</b>	<b>Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des automatischen Melkens .....</b>	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>132</b>

<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>140</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 4-1	Mittelwerte der gemittelten CMT-Ergebnisse von CMT, CMT_US1 und CMT_US2.....	61
Abb. 4-2	Mittelwerte der logarithmierten Zellzahlergebnisse (LOG <sub>SCC</sub> und LOG <sub>SCC_US</sub> .....	61
Abb. 4-3	Vergleich der CMT-Ergebnisse von LYM und PMN der verschiedenen Stufen.....	64
Abb. 4-4	Häufigkeitsverteilungen der CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz A (n = 359 Proben) .....	72
Abb. 4-5	Häufigkeitsverteilungen der CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz B (n = 359 Proben) .....	73
Abb. 4-6	Häufigkeitsverteilungen der CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz C (n = 359 Proben) .....	73
Abb. 4-7	Häufigkeitsverteilungen der CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz D (n = 359 Proben) .....	74
Abb. 4-8	Häufigkeitsverteilungen der CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz E (n = 359 Proben) .....	74
Abb. 4-9	CMT-Ergebnisse (Mittelwerte) der Reagenzien (für alle Zellgehaltsgruppen) (n = 359).....	75
Abb. 4-10	Mittelwerte der Reagenzien in den verschiedenen Zellgehaltsgruppen bei gleichzeitiger Darstellung der mittleren Zellzahl.....	76
Abb. 4-11	Mittelwerte der elektrischen Leitfähigkeit (logarithmiert) (n = 568 Proben) .....	81
Abb. 4-12	Mittelwerte der CMT-Ergebnisse (n = 568 Proben).....	81
Abb. 4-13	Mittelwerte der NAGase-Aktivitäten (logarithmiert) (n = 568 Proben).....	82
Abb. 4-14	Mittelwerte der Zellgehalte/ml (logarithmiert) (n = 568 Proben).....	82

Abb. 5-1	Verschiebung der Besetzung von Eutergesundheitskategorien über den Zeitraum PB – PA2.....	125
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1	Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde im Rahmen der Mastitis-Kategorisierung (in Anlehnung an IDF, 1967).....	5
Tab. 2-2	Eigenschaften von kuhassoziierten und umweltassoziierten Erregern (DE KRUIF et al. 1998).....	7
Tab. 2-3	Einflüsse auf den Zellgehalt der Milch (HAMANN et al. 1990).....	13
Tab. 2-4	Kuhassoziierte Faktoren, die den Zellgehalt in der Milch beeinflussen.....	14
Tab. 2-5	Umweltassoziierte Faktoren, die den Zellgehalt beeinflussen.....	16
Tab. 2-6	Einflussfaktoren auf die Elektrische Leitfähigkeit (EL) der Milch.....	20
Tab. 2-7	Einflussfaktoren auf die NAGase-Aktivität in der Milch.....	22
Tab. 2-8	Vergleich des CMT-Scores mit dem Mittelwert der Gesamtzellzahl [x1000]/ml Milch (Auszug aus einer Tabelle von Schalm u. Noorlander 1957).....	25
Tab. 2-9	Einflussfaktoren auf das CMT-Ergebnis.....	30
Tab. 2-10	Vor- und Nachteile des Schalmtest (CMT).....	32
Tab. 3-1	Beprobte Betriebe der Osnabrücker Herdbuchgesellschaft (OHG).....	36
Tab. 3-2	CMT-Scores.....	46
Tab. 3-3	Probenverarbeitung.....	48
Tab. 3-4	Termine.....	53
Tab. 3-5	Verteilung der Tiere jedes Betriebes auf die Auktionstermine.....	54
Tab. 3-6	Probennahmetermine und beprobte Tiere bzw. Viertel.....	56
Tab. 3-7	Proben und deren Verarbeitung.....	56
Tab. 3-8	Prozeduren SAS.....	57
Tab. 4-1	Vergabe der Bezeichnungen.....	60
Tab. 4-2	Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen (n = 20) vor und nach den Behandlungen mit Ultraschall.....	62
Tab. 4-3	Signifikanzen zwischen den SCC-Ergebnissen (n = 20).....	62
Tab. 4-4	Konzentrationsstufen.....	63

Tab. 4-5	Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz der Mittelwerte der CMT-Ergebnisse.....	65
Tab. 4-6	Mittelwerte und Standardabweichungen der zyto-biochemischen Parameter.....	66
Tab. 4-7	CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt im Versuch Zellvitalität.....	66
Tab. 4-8	Zellgehalts-Gruppen im Rahmen der Zellvitalitätsbestimmung.....	66
Tab. 4-9	Relative Anteile vitaler PMN in den Zellgehaltsgruppen, aufgeteilt nach CMT-Score.....	67
Tab. 4-10	Zellgehaltsgruppen der VGH (n = 359 Proben).....	68
Tab. 4-11	Mittelwert und Standardabweichung für elektrische Leitfähigkeit, CMT- und Zellgehaltsbefunden.....	69
Tab. 4-12	Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen der verschiedenen Reagenzien unter Berücksichtigung des Zellgehalt-niveaus.....	70
Tab. 4-13	CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz A.....	70
Tab. 4-14	CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz B.....	71
Tab. 4-15	CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz C.....	71
Tab. 4-16	CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz D.....	71
Tab. 4-17	CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz E.....	71
Tab. 4-18	Korrelationskoeffizienten (Spearman) der CMT-Ergebnisse mit dem Zellgehalt (SCC) (n = 359 Proben).....	77
Tab. 4-19	Auswertungsschema zur Berechnung der „Vier-Felder-Korrelation“ (Vierfeldertafel).....	77
Tab. 4-20	Vierfeldertafel für die verschiedenen Reagenzien.....	78
Tab. 4-21	Mittelwert und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter für jede Probenahme (PB, PA1, PA2).....	80
Tab. 4-22	Signifikanzen zwischen den Parameterdifferenzen.....	83
Tab. 4-23	Die CMT-Scores und ihr korrespondierender SCC für alle drei Probenahmen (PB, PA1 und PA2) zusammengefasst (n = 1704).....	84
Tab. 4-24	Vierfeldertafeln der drei Probenahmen.....	84

---

Tab. 4-25	Auswertungsschema (Vierfeldertafel) für elektrische Leitfähigkeit bzw. NAGase-Aktivität auf Basis der Ergebnisse zum Gehalt somatischer Zellen in Milch.....	85
Tab. 4-26	Sensitivität, Spezifität und Youden-Index für CMT, elektrische Leitfähigkeit (EL) und NAGase (PB, PA1, PA2 jeweils n = 568).....	86
Tab. 4-27	Korrelationen der Parameter mit dem Zellgehalt/ml.....	87
Tab. 4-28	Diagnoseschema (nach HAMANN u. FEHLINGS 2002, in Anlehnung an IDF 1967).....	87
Tab. 4-29	Eutergesundheit der Tiere zur ersten Probenahme (PB).....	88
Tab. 4-30	Eutergesundheit der Tiere zur ersten Probenahme (PA1).....	88
Tab. 4-31	Eutergesundheit der Tiere zur ersten Probenahme (PA2).....	88
Tab. 4-32	Entwicklung der Eutergesundheit im Verlauf der Probenahmen.....	89
Tab. 4-33	Verteilung der CMT-Ergebnisse auf die Kategorien der Eutergesundheit.....	91
Tab. 4-34	Zusammenfassende Darstellung der Verteilung der CMT-Ergebnisse auf die Eutergesundheitskategorien.....	92
Tab. 4-35	Nachgewiesene Mastitisreger anlässlich der drei Probenahmen.....	93
Tab. 4-36	Probenahmeintervalle für Feldversuch 4.2.1 und Melkintervalle für 4.2.2.....	93
Tab. 4-37	Signifikanzen zwischen den Ergebnissen für LOGSCC und CMT der Melkintervallgruppen.....	94
Tab. 4-38	Signifikanzen zwischen den Ergebnissen von Zellgehalt bzw. CMT- Befunden anlässlich PB, PA1 und PA2 unter Berücksichtigung der jeweiligen Melkintervalle.....	95
Tab. 4-39	Signifikanzen der Differenzen (LOGSCC; CMT) zwischen zwei gleichen MI zu den unterschiedlichen Probezeitpunkten.....	95
Tab. 4-40	Mittelwerte und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter in „KON“.....	97
Tab. 4-41	Mittelwerte und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter in „VMS“.....	97

Tab. 4-42	Mittelwerte und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter in „Cowside“.....	98
Tab. 4-43	CMT-Scores und ihr korrespondierender SCC für „KON“, „VMS“ und „Cowside“.....	99
Tab. 4-44	Korrelationskoeffizienten mit SCC der „KON“-Herde (n = 483), der „VMS“-Herde (n = 1041) und des „Cowside“-Versuchs (n = 383).....	100
Tab. 4-45	Vergleichende Darstellung der Präzision von Befunden unterschiedlicher Parameter (Referenz: SCC) für „KON“.....	101
Tab. 4-46	Vergleichende Darstellung der Präzision von Befunden unterschiedlicher Parameter (Referenz: SCC) für „VMS“.....	102
Tab. 4-47	Vergleichende Darstellung der Präzision von Befunden unterschiedlicher Parameter (Referenz: SCC) für „Cowside“.....	103
Tab. 4-48	Sensitivität [%], Spezifität [%] und Youden-Index [%] der Parameter CMT, elektrische Leitfähigkeit, NAGase und DCC für „KON“.....	104
Tab. 4-49	Sensitivität [%], Spezifität [%] und Youden-Index [%] der Parameter CMT, elektrische Leitfähigkeit, NAGase und DCC für „VMS“.....	105
Tab. 4-50	Sensitivität [%], Spezifität [%] und Youden-Index [%] der Parameter CMT, elektrische Leitfähigkeit, NAGase und DCC für „Cowside“.....	106
Tab. 4-51	Eutergesundheit der „KON“-Herde zur Probenahme 1.....	107
Tab. 4-52	Eutergesundheit der „KON“-Herde zur Probenahme 2.....	107
Tab. 4-53	Eutergesundheit der „KON“-Herde zur Probenahme 3.....	107
Tab. 4-54	Eutergesundheit der „VMS“-Herde zur Probenahme 1.....	108
Tab. 4-55	Eutergesundheit der „VMS“-Herde zur Probenahme 2.....	108
Tab. 4-56	Eutergesundheit der „VMS“-Herde zur Probenahme 3.....	108
Tab. 4-57	Eutergesundheit im „Cowside“-Versuch zur Probenahme 1.....	109
Tab. 4-58	Eutergesundheit im „Cowside“-Versuch zur Probenahme 2.....	109
Tab. 4-59	Eutergesundheit im „Cowside“-Versuch zur Probenahme 3.....	109
Tab. 4-60	Verteilung der CMT-Scores auf die Diagnosen in „KON“.....	110

---

Tab. 4-61	Verteilung der CMT-Scores auf die Diagnosen in „VMS“ .....	110
Tab. 4-62	Verteilung der CMT-Scores auf die Diagnosen in „Cowside“ .....	110
Tab. 4-63	Signifikanzen zwischen den Ergebnissen von SCC und CMT- Reaktion der verschiedenen Melkintervalle im Versuch „VMS“ .....	111
Tab. 4-64	Signifikanzen zwischen den Ergebnisse von SCC und CMT- Reaktion zu verschiedenen Melkintervallen im Versuch „Cowside“ ...	112
Tab. 5-1	Häufigkeitsverteilungen der CMT-Scores in den Zellzahlgruppen.....	119
Tab. 5-2	Prozentuale Verteilung der Diagnosen.....	124

## Abkürzungsverzeichnis

A. tridest	Aqua tridestillata
Abb.	Abbildung
AMS	Automatisches Melksystem
bzw.	beziehungsweise
C.	Corynebacterium
CMT	California Mastitis Test; Schalmtest
DCC <sup>®</sup>	DeLaval Zellzahlmessgerät DCC <sup>®</sup>
DCC	Gehalt an somatischen Zellen, gemessen im DCC <sup>®</sup> -Gerät
DNA	Desoxyribonucleid acid
DNase	Nuklease, zerlegt DNA in kürzere Molekülketten
DNS	Desoxyribonucleinsäure
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Elektrische Leitfähigkeit in mS/cm
et al.	et alii; und andere
FACS	FACSCalibur Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson
Foss	Fossomatic <sup>®</sup>
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
ha	Hektar
HL	Euterviertel hinten links
HR	Euterviertel hinten rechts
IDF	International Dairy Federation
IQR	Inter Quarter Ratio
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
KON	Bezeichnung für eine konventionell gemolkene Herde
Ig	Logarithmus zur Basis 10
LOG <sub>DCC</sub>	Logarithmus zur Basis 10 der SCC gemessen im DCC <sup>®</sup>
LOG <sub>NAG</sub>	Logarithmus zur Basis 10 des NAGase-Wertes

LOG <sub>SCC</sub>	Logarithmus zur Basis 10 der SCC gemessen in der Fossomatic®
LYM	Lymphozyten
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MI	Melkintervall bzw. Probenahmeintervall
min	Minuten
MLP	Milchleistungsprüfung
mS	Millisiemens
n	Stichprobengröße
NAG	NAGase
NAGase	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase
NaOH	Natronlauge
ns	nicht signifikant
OHG	Osnabrücker Herdbuchgesellschaft
PA1	erste Probenahme auf der Auktion
PA2	zweite Probenahme auf der Auktion
PB	Probenahme auf dem Betrieb, am Tag vor der Auktion
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
2xPBS	doppelt konzentriertes PBS
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
REGWQ	Ryan-Einot-Gabriel-Welsch-Multiple-Range-Test
S.	Staphylococcus
Sc.	Streptococcus
SCC	Somatic Cell Count (Gehalt somatischer Zellen/ml Milch)
sec.	Sekunde
std	Standardabweichung
spp.	Spezies
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett

VAG	Viertelanfangsgemelk
VGH	Viertelgemelk Hand
VK	Variationskoeffizient
VL	Euterviertel vorne links
VMS <sup>®</sup>	Voluntary Milking System <sup>®</sup>
VR	Euterviertel vorne rechts
VVG	Viertelvorgemelk
$x g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung
$\bar{X}$	arithmetischer Mittelwert
$\bar{X}_g$	geometrischer Mittelwert
ZMZ	Zwischenmelkzeit bzw. Probenahmeintervalle

**Zeichenerklärung**

<	kleiner
>	größer
≤	kleiner gleich
≥	größer gleich
*	p < 0,05
**	p < 0,01
***	p < 0,001
↑	Tendenz ansteigend
↓	Tendenz abfallend
↕	Tendenz ansteigend und wieder abfallend, bzw. abfallend und wieder ansteigend

**Hinweise:**

CMT und Schalm-Test wird synonym verwendet.

Es werden für die Parameter elektrische Leitfähigkeit, NAGase, DCC<sup>®</sup> und SCC zum besseren Verständnis sowohl die logarithmierten als auch die nicht-logarithmierten Werte angegeben.

Sensitivität = richtig positive (Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker als krank erkannt wird)

Spezifität = richtig negative (Wahrscheinlichkeit, mit der ein Gesunder als gesund erkannt wird)

Youden-Index (%) = Sensitivität (%) + Spezifität (%) – 100%

„Majore“ Erreger = Erreger mit hoher Pathogenität (z.B. *S. aureus*, *Sc. agalactiae*)

„Minore“ Erreger = Erreger mit geringer Pathogenität (z.B. *KNS*, *C. spp.*)

# 1 Einleitung

Mastitiden stellen multifaktorielle Infektionskrankheiten der bovinen Milchdrüse dar, die auch heute noch weltweit – trotz erheblicher wissenschaftlicher und technisch-industrieller Bemühungen in den vergangenen Dezennien – als die ökonomisch bedeutsamsten Krankheitskomplexe laktierender Rinder gelten. Plurikausale Faktoren lassen Mastitiden oft als ein nicht lösbares Herdenproblem erscheinen. In den vergangenen Jahren wurde auch in der Bundesrepublik Deutschland eine massive Änderung der Betriebsgrößen und damit auch der Milchtierherden deutlich. Nach aktuellen Aussagen des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz kann erst oberhalb einer Fläche von 75 ha mit einem hinreichenden Betriebsergebnis gerechnet werden. Die letztmalig 2006 von der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter herausgegebenen Jahreszahlen der Rinderproduktion in Deutschland weisen aus, dass die insgesamt 4,1 Mio. Milchkühe in Westdeutschland in Herden mit durchschnittlich 32 Tieren stehen, während die mittlere Herdengröße in Ostdeutschland 172 Milchkühe ausmacht. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen, dass mit zunehmender Bestandsgröße (> 50 Milchkühe) und modernen Haltungsformen häufig Verschiebungen des Spektrums der Mastitiserreger von kuhassoziierten Keimen in Richtung auf umweltassoziierte Erreger verbunden sind. Jedoch gilt für alle Mastitiserreger, dass beim Vorliegen von subklinischen oder klinischen Mastitisfällen, die unter Praxisbedingungen erzielbaren Heilungserfolge nicht zufriedenstellend sind. Wenngleich z. B. klinische Mastitiden sowohl unter Tierschutzgesichtspunkten als auch unter therapeutischen Aspekten eine chemotherapeutische Medikation erfordern, führt diese häufig nicht zu einer Erregereliminierung und somit zu keiner Heilung im medizinischen Sinn, wie eine Stellungnahme des DVG-Sachverständigenausschusses „Subklinische Mastitis „ zur Therapie der bovinen Mastitis jüngst beschrieb.

Eine deutliche Mehrheit nationaler und internationaler Mastitisexpertengruppen ist sich darin einig, dass es erforderlich ist, den Schwerpunkt einer effektiven Mastitisbekämpfung auf die Vorbeuge zu legen. Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination und Infektion der bovinen Milchdrüse zielen auf eine keimarme Umwelt des Einzeltiers ab.

Ein nicht zu unterschätzendes Risiko der Erregereinschleppung besteht für eine Herde im Zukauf bereits infizierter und/oder erkrankter Färsen bzw. Kühe. Diese Aussage wird auch dadurch untermauert, dass zumeist in Betrieben, die ausschließlich eigene Nachzucht für die Rekrutierung ihrer Herde verwenden, nur eine niedrige Mastitisrate feststellbar ist. Damit ergibt sich die Forderung nach dem gezielten Zukauf eutergesunder Tiere.

Hier setzt die vorliegende Dissertation an, die sich mit dem California-Mastitis-Test, als Verfahren zur Früherkennung von Mastitiden bzw. Eutererkrankungen auseinandersetzt. Der Sachverständigenausschuss „Subklinische Mastitis“ der DVG plädiert schon seit mehr als 20 Jahren dafür, dass tierärztliche Kontrollen von Zukaufstieren (z. B. auf Auktionen) neben einer klinischen Euteruntersuchung im Falle laktierender Tiere einen California-Mastitis-Test umfassen und Viertelanfangsgemelksproben für eine zytobakteriologische Untersuchung beinhalten.

Eine Bewertung der Aussagefähigkeit des CMT zur Beurteilung der Eutergesundheitskategorien erfolgte bisher nicht durch den DVG-Sachverständigenausschuss und ansonsten nur mit selektiertem Material in wenigen Veröffentlichungen. Es kommt hinzu, dass heute in der überwiegenden Zahl der Fälle seit ca. 2 – 4 Wochen abgekalbte, laktierende Färsen anlässlich einer Auktion zum Verkauf angeboten werden. Alle involvierten Personengruppen wie Auktionsleitung, Verkäufer und Käufer haben ein hohes Interesse schon während der Auktion ein aussagefähiges Ergebnis zur allgemeinen und Eutergesundheit des zum Verkauf gestellten Tieres zu erhalten. Zeitaufwändige Verfahren wie klassische zytobakteriologische Untersuchungen von Viertelgemelken können ergänzend

eingesetzt werden, sind jedoch für eine Aussage während des Auktionsgeschehens zu zeitaufwändig. Hier bieten sich die unmittelbar an der Seite des Tieres vorzunehmende direkte Zellzählung mithilfe des DCC<sup>®</sup> an oder aber die Durchführung eines CMT.

Als Mitglied der Arbeitsgruppe Mastitisforschung des Instituts für Lebensmittelqualität und –sicherheit des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften (Direktor: Prof. Dr. G. Klein) wurde mir von Herrn Prof. Dr. Dr. habil. J. Hamann die Bearbeitung folgender Fragestellungen übertragen:

- 1.) Überprüfung des Einflusses von Aktivität und Typ unterschiedlicher Zellen (PMN, Lymphozyten) sowie der DNA-Gehalte auf die Reaktion des CMT
  
- 2.) Überprüfung der diagnostischen Aussagefähigkeit des CMT auf der Basis von drei Viertelgemelksproben (vor, während und nach der Auktion) laktierender Färsen
  
- 3.) Überprüfung des Einflusses unterschiedlicher Melkverfahren – konventionell und automatisch – auf die Reaktion des CMT

## **2 Literatur**

### **2.1 Mastitis**

Die IDF (1987) definiert Mastitis als entzündliche Reaktion der Milchdrüse, wobei die milchbildenden, -speichernden und -ableitenden Abschnitte betroffen sein können.

Bereits 1854 beschrieb RAST die Problematik von Mastitiden wie folgt:

„So unscheinbar die Krankheit ist, so wenig sie das allgemeine Befinden der Thiere stört, so muss doch die Behandlung mit allem Nachdruck und Energie durchgeführt werden; ich glaube, das sei eine Hauptursache der bis dahin unnütz ablaufenden Behandlung, weil die Krankheit so wenig krankhaftes bemerken lässt. Die Ökonomen und Bauern, die früher gewohnt waren, mit den früheren und älteren Pfuschärzten zu markten und zu disputieren über die Krankheit, können jetzt noch nicht glauben, dass es nöthig sei, innerliche Mittel zu reichen, wenn ein Thier gehörig frisst und säuft und wiederkaut.“ (RAST 1854)

Gut 150 Jahre später ist die Mastitis des Rindes immer noch die wirtschaftlich bedeutendste Krankheit. Sie führt zu dramatischen Milchverlusten, vorzeitigem Abgang der Tiere, Beeinträchtigung der technischen Eigenschaften der Milch und Änderungen ihrer hygienischen Beschaffenheit und Zusammensetzung (HAMANN 2002).

### 2.1.1 Definition

Die Mastitis als infektiöse Entzündung des Euters hat vielfältige Ursachen. Eine Unterscheidung mit scharfer Grenze zwischen gesund und krank ist für das Euter ebenso wenig möglich, wie für jedes andere Organ (HAMANN u. FEHLINGS 2002). Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) definierte in Anlehnung an den Internationalen Milchwirtschaftsverband (IDF 1967; 1971) vier Kategorien der Eutergesundheit für die Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde aus Viertelanfangsgemelken (HAMANN u. FEHLINGS 2002, Tabelle 2-1).

Tab. 2-1 Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde im Rahmen der Mastitis-Kategorisierung (in Anlehnung an IDF, 1967)

Zellgehalt pro ml Milch (VAG)	Euterpathogene Mikroorganismen	
	nicht nachgewiesen	nachgewiesen
< 100.000	normale Sekretion	latente Infektion
> 100.000	unspezifische Mastitis	Mastitis

Die Definition gilt für die Untersuchung von Viertelanfangsgemelksproben, die zur üblichen Melkzeit aus dem Gemelk von Kühen normaler Laktation entnommen wurden (HAMANN u. FEHLINGS 2002). Die Festlegung des Zellzahlgrenzwertes beruht auf Untersuchungen, in denen der Zellgehalt aus Viertelanfangsgemelken ungeschädigter Euter von Erstkalbinnen untersucht wurde (DOGGWEILER u. HESS 1983). Der Modalwert (Maximum der Häufigkeitsverteilung) betrug 20.000 Zellen/ml; die zweifache Standardabweichung, die in der Medizin übliche Sicherheitsgrenze der Norm, umfasste als obersten Wert 100.000 Zellen/ml.

Aus wissenschaftlicher Sicht erfordert eine medizinisch fundierte Mastitisdiagnose den Nachweis des ursächlichen Agens (Erregernachweis) sowie der durch den jeweiligen Erreger ausgelösten Abwehrreaktion des betroffenen Milchdrüsenkomplexes über die Messung von Entzündungsindikatoren wie Zellzahl, NAGase etc. (Entzündungsnachweis) (HAMANN u. FEHLINGS 2003).

Eine nahezu zweifelsfreie Diagnostik kann nur dann als gewährleistet angenommen werden, wenn zumindest drei Probenentnahmen im wöchentlichen Abstand vorliegen (HAMANN u. FEHLINGS 2002).

Aus ökonomischen Gründen wird unter Praxisbedingungen jedoch auf eine wiederholte Probenentnahme verzichtet und häufig eine alleinige Messung von Entzündungsindikatoren vorgenommen.

Ursachen einer Mastitis sind vielfältig, häufig werden Bakterien nachgewiesen, aber auch Hefen und Pilze kommen in Betracht (TOLLE 1975).

Bakterielle Mastitiserreger können – wenngleich mit fließenden Übergängen – grob drei Gruppen zugeordnet werden.

1. kuhassozierte Mastitiserreger: *Staphylococcus (S.) aureus*, *Streptococcus (Sc.) agalactiae*, *Sc. dysgalactiae* sowie *Mycoplasma spp.*
2. umweltassozierte Erreger: *Sc. uberis*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia (E.) coli*, *Klebsiellen* und sonstige *Enterobacteriaceae*
3. Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) (FEHLINGS 2001; SCHÄLLIBAUM 2001).

In Tabelle 2-2 sind wichtige Charakteristika von kuhassozierten und umweltassozierten Mastitiserregern zusammengestellt.

Tab. 2-2 Eigenschaften von kuhassoziierten und umweltassoziierten Erregern (DE KRUIF et al. 1998)

Kuhassoziierte Erreger	Umweltassoziierte Erreger
Reservoir: infizierte Tiere	Reservoir: Umwelt
Gute Adaption an das Eutergewebe	Niedrige Prävalenz
Übertragung während des Melkens	Kurze Infektionsdauer
Lange Infektionsdauer	Ver mehrt akute Mastitiden
Gehäuft subklinische Mastitiden	Zellgehalt in der Herdensammelmilch oft nicht beeinflusst
Probleme mit erhöhten Zellzahlen	

In den vergangenen Jahren hat sich das Spektrum der mastitisverursachenden Erreger verändert. Programme zur Mastitisbekämpfung führten zu einem starken Abfall der Inzidenz von durch kuhassoziierte Erreger verursachte Mastitiden (BOOTH 1997). Dabei sank die Inzidenz von Mastitiden allerdings nicht (BERRY 1998; KOSSAIBATI et al. 1998), vielmehr gewannen durch Umwelterreger verursachte Mastitiden an Bedeutung (BRADLEY u. GREEN 2002).

Unter Bezugnahme auf den Gehalt somatischer Zellen in der Tankmilch konnten BRADLEY und GREEN (2002) beobachten, dass in Herden mit hohem Zellgehalt die Ursache rezidivierender Mastitiden nach wie vor bei den kuhassoziierten Erregern liegt, während man bei Herden mit niedrigem Zellgehalt entsprechende Mastitisverläufe im Zusammenhang mit umweltassoziierten Erregern vorfand.

Eutergesundheitskategorien auf Basis zyto-bakteriologischer Befunde aus Viertelanfangsgemelksproben lassen sich wie folgt definieren (HAMANN u. FEHLINGS 2002):

Gesunde Euterviertel mit normaler Sekretion zeigen keine äußerlichen pathologischen Veränderungen und ihre Milch weist keine euterpathogenen Mikroorganismen sowie normalen Zellgehalt auf.

Werden Mastitiserreger nachgewiesen, der Zellgehalt bewegt sich jedoch in der Norm, handelt es sich um eine latente Infektion.

Werden keine Mastitiserreger nachgewiesen, aber ein erhöhter Zellgehalt, so spricht man von einer unspezifischen Mastitis.

Bei gleichzeitigem Nachweis von Mastitiserregern und erhöhtem Zellgehalt in Viertelanfangsgemelken liegt eine Mastitis vor.

„Euterentzündungen in Form von unspezifischer Mastitis oder Mastitis treten in unterschiedlichen Verlaufsformen und in Verbindung mit verschiedenartigen klinischen Symptomen auf“ (HAMANN u. FEHLINGS 2002).

Subklinische Mastitiden sind Entzündungen des Euters ohne äußerlich erkennbare Symptome, aber mit Vorliegen von erhöhter Zellzahl und dem Nachweis von Mastitiserregern in zwei von drei Untersuchungen (bei einem wöchentlichen Probenahmeintervall).

Klinische Mastitiden sind durch Entzündungssymptome wie Flocken in der Milch, Schwellung, Rötung, Schmerzhaftigkeit, vermehrte Wärme des Euterviertels und evtl. Fieber gekennzeichnet. Der Milchcharakter kann vollständig verloren gehen. Je nach Schweregrad wird zwischen gering-, mittel- und hochgradigen klinischen Mastitiden unterschieden.

Die zeitliche Dauer der Erkrankung wird durch die Begriffe subakut, akut und chronisch beschrieben.

### 2.1.2 Färsenmastitis

Abgesehen von Maßnahmen zur Bekämpfung der Holsteinischen Euterseuche findet die Milchdrüse von tragenden und nichttragenden Färsen wenig Beachtung (BRENTROP 1998). Entgegen der weit verbreiteten Meinung, dass Färsen grundsätzlich eutergesund sind, wurde in den letzten Jahren festgestellt, dass das Auftreten von Färsen-Mastitiden um den Abkalbetermin herum, zu einem immer größeren Problem geworden ist (EDINGER 2001). Während Umbauprozessen der Milchdrüse, wie der Kolostrogenese, befindet sich das Tier in einer immunsupprimierten Situation (KEHRLI et al. 1989), in der das Euter empfänglicher für Mastitiden ist, welche sich in der Früh-laktation häufig als klinische Mastitiden darstellen (OLIVER u. SORDILLO 1988).

Infektionen des Färseneuters können zu einem frühen Lebensabschnitt stattfinden. Infektionsquellen hierfür sind die Verfütterung von mit *Sc. agalactiae* oder *S. aureus* kontaminierter Milch (TSCHISCHKALE 1996), gegenseitiges Besaugen (BRENTROP 1998; KEIL et al. 2000), Übertragung von *Arcanobacterium pyogenes* durch Fliegen bei Weidehaltung und das gemeinsame Aufstallen mit trockenstehenden Kühen. Spontaner Milchabfluss vor dem Abkalben oder in der frühen Laktation erleichtert das Eindringen von Erregern in den geöffneten Zitzenkanal (SCHUKKEN et al. 1990; WAAGE et al. 1998). Ferner sind Euterödeme bei Färsen in der Regel stärker ausgeprägt als bei Kühen. Dadurch wird die lokale Blutzufuhr vermindert, wodurch die Funktionsfähigkeit des Verschlussmechanismus des Zitzenkanals beeinträchtigt wird (HAMANN 1989), was Schmierinfektionen mit Umweltkeimen begünstigt (BRENTROP 1998).

In zahlreichen Veröffentlichungen wurden *Koagulase-negative Staphylokokken* (KNS) als häufigste Erregerart von Färsenmastitiden nachgewiesen (OLIVER u. MITCHELL 1983; TRINIDAD et al. 1990; WILDMAN et al. 1990; PANKEY et al. 1991; COOK u. FIEZ 1992, NICKERSON et al. 1995).

Während es bei älteren Kühen zu einer Kompensation hinsichtlich der Milchleistung durch gesunde Euterviertel kommen kann, konnte dies für Färsen nicht belegt werden (WOOLFORD 1985).

Mastitis von Erstkalbinnen führt zu erhöhten Abgängen. So ist das Risiko innerhalb des ersten Monats post partum abzugehen für Färsen mit einer Mastitis 2,4-mal höher (WAAGE et al. 2000) als bei pluriparen Tieren.

Zur Bekämpfung der Färsenmastitis wird vielfach der prophylaktische Einsatz von Antibiotika ante partum vorgeschlagen, jedoch stehen dieser Vorgehensweise die erhöhte Verletzungsgefahr (bei intrazisternaler Applikation), die Gefahr von Antibiotikarückständen in der Milch und die Förderung der Resistenzbildung entgegen (OLIVER et al. 1992, RULLOF 1997, NICKERSON et al. 1995, MYLLYS u. RAUTALA 1995, WENDT 1997, BRENTRUP 1998). Grundsätzlich darf die Bedeutung der Therapie als Element der Mastitisbekämpfung, insbesondere im Zusammenhang mit subklinischen Mastitiden, nicht überschätzt werden (HAMANN u. FEHLINGS 2003). Im Mittel lässt sich zwischen „antibiotisch bedingten Heilungsraten“ und „Selbstheilungsraten“ nur eine Differenz von 10% ermitteln, die häufig statistisch nicht zu sichern ist (WILSON et al. 1998).

### **2.1.3 Diagnostik**

Eine Reihe von Parametern verändert sich in der Milch während einer Mastitis. Im Folgenden sind die in den eigenen Untersuchungen einbezogenen Parameter näher beschrieben.

#### **2.1.3.1 Zellgehalt (SCC)**

Alle Zellen im Blut stammen von den gleichen Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, ab. Dazu gehören die roten Blutzellen (Erythrozyten), die Thrombozyten und die weißen Blutzellen (Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten) des Immunsystems.

Die weißen Blutzellen (Leukozyten) spielen im Körper aller Lebewesen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung und Verhütung von Krankheiten. Die Immunantwort des Körpers auf Krankheitserreger wird eingeteilt in eine angeborene Immunantwort, an der vor allem phagozytische Zellen (Makrophagen und Granulozyten (neutrophile)) beteiligt sind, und einer erworbenen (adaptiven) Immunantwort durch Lymphozyten (JANEWAY et al. 1997).

Die Makrophagen stellen die gereifte Form der Monozyten dar, die im Blut zirkulieren und zu Makrophagen differenzieren, sobald sie in das Gewebe einwandern. Hauptaufgaben der Makrophagen sind die Phagozytose von Fremdpartikeln und die Rekrutierung (Anlockung) anderer Immunzellen durch die Produktion bestimmter Mediatoren (Chemokine). In der Trockenstehzeit scheinen Makrophagen vermehrt Fett und Kasein zu phagozytieren, Milchreste und untergegangene Zellen aufzunehmen und damit zur Rückbildung des Euters beizutragen (OUTTERIDGE u. LEE 1981; FOX et al. 1988).

Granulozyten (polymorphkernige Leukozyten, PMN) teilen sich in drei Arten auf: neutrophile Zellen, eosinophile Zellen und basophile Zellen. Die neutrophilen Granulozyten (PMN) bilden die umfangreichste und wichtigste zelluläre Komponente der angeborenen Immunantwort. Im Falle einer bakteriellen Invasion strömen PMN, durch Mediatoren angelockt, in Massen in das Euter ein, um Bakterien abzutöten. Hierfür stehen ihnen Phagozytose (Aufnahme der Bakterien) und Freisetzung verschiedener Reagenten zur Verfügung. Es hängt vom jeweiligen zu bekämpfenden Bakterium ab, ob es durch die PMN zu sauerstoffabhängigen (Respiratory Burst) oder sauerstoffunabhängigen Reaktionen durch verschiedene Proteine (Lysozym, Laktoperoxidase, Laktoferrin und kationische Proteine), die mikrobizid wirken, kommt. PMN werden als wichtigster Schutz vor Mastitiden eingestuft. Neben dem Pool im Knochenmark, zirkulieren PMN im Blut und es existieren Reserven, die marginal der Wand der Blutgefäße angelagert sind. Aus diesen Reserven wandern sie, angelockt durch Signale, die u.a. von Makrophagen ausgesandt werden, als Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen in Körperhöhlen und Gewebe (JAIN 1976). Die PMN der Milch werden mit anderen Zellen der Milch regelmäßig

während des Melkens aus dem Euter gespült und aus der Blutbahn neu rekrutiert. Die kontinuierliche Migration der PMN in die Milchdrüse stellt nach Ansicht vieler Autoren die erste immunologische Barriere gegen invasive Bakterien dar (BURVENICH et al. 1994, 1995; PAAPE et al. 2000).

Lymphozyten teilen sich nach ihrer Entstehung im Knochenmark in Abhängigkeit vom Ort ihrer Reifung (Knochenmark oder im Thymus) in B- und T-Lymphozyten auf. Lymphozyten regulieren die Immunantwort auf ein Antigen, jeder Lymphozyt ist für ein bestimmtes Antigen sensibel. Bekommt ein Lymphozyt Kontakt zu „seinem“ Antigen, werden verschiedene immunologische Reaktionen initiiert, zu denen auch die Produktion von Antikörpern (Immunglobulinen) gehört.

In der Milch sind T-Lymphozyten für zellverbundene Immunreaktionen verantwortlich, während B- Lymphozyten Antikörper produzieren.

In Milch mit physiologischen Zellgehaltsbefunden setzt sich die Leukozytenpopulation aus Makrophagen (60%), Lymphozyten (25%) und PMN (12%) zusammen (PAAPE et al. 1981). Außerdem findet man noch Epithelzellen (2%), eosinophile Granulozyten, Monozyten und Plasmazellen, deren Anteil jedoch so gering ist, dass er bei einer quantitativen Betrachtung außer Acht gelassen werden kann (HAMANN 1992). Die Hauptreaktion der Milchdrüse auf eine Infektion ist das schnelle Einströmen von PMN, in weit geringerem Maß auch von Lymphozyten und Makrophagen, in die Milch, wodurch der Zellgehalt auf einige Millionen pro ml steigen kann. In der akuten Phase der Entzündung stellen die PMN bis zu 95% der somatischen Milchzellen (BURVENICH et al. 1995; LABOHM et al. 1998).

Einflüsse auf den Zellgehalt der Milch lassen sich folgenden Faktorengruppen zuordnen (Tabelle 2-3).

Tab. 2-3 Einflüsse auf den Zellgehalt der Milch (HAMANN et al. 1990)

Faktorengruppe	Einflüsse
1. Mastitis verursachende Faktoren	Krankheitserreger
	Toxine
	Mechanische Schädigungen
2. Physiologische/pharmakologische Faktoren	Laktationsstadium
	Rasse
	Tierarzneimittel
3. Stressfaktoren	Änderung der Fütterung
	Transport
	Management

Die Tabellen 2-4 und 2-5 fassen in verschiedenen Studien beschriebene Einflussfaktoren auf den Zellgehalt der Milch zusammen.

Tab. 2-4 Kuhassozierte Faktoren, die den Zellgehalt in der Milch beeinflussen

Faktor	Literatur	Veränderung der Zellzahl in der Milch (Viertelanfängsgemelk)
Alter/ Laktationsnummer	REICHMUTH 1975; DOGGWEILER u. HESS 1983; HOLDAWAY et al. 1996	Anstieg $\bar{X}_a$ SCC je älter die Kühe sind, gleichzeitig: Erhöhung der Infektionswahrscheinlichkeit/Mastitisprävalenz
	JONES et al. 1984	Höhere SCC nach Abkalbung von Erstkalbinnen im Vergleich zu pluriparen Tieren
	LABOHM et al. 1998	SCC-Anstieg mit steigender Laktationsnummer
	LAEVENS et al. 1997	Kein signifikanter Effekt auf die SCC bakteriologisch negativer Euterviertel
	SCHULTZ 1977	Anstieg der SCC um 100.000 Zellen mit jeder Laktationsnummer
Laktationsstadium	DOGGWEILER u. HESS 1983; HOLDAWAY et al. 1996; LABOHM et al. 1998	Anstieg der SCC mit voranschreitender Laktation
	LAEVENS et al. 1997	Kein signifikanter Effekt für bakteriologisch negative Euterviertel
	NG-KWAI-HANG et al. 1984; WILLIAMS et al. 1991	SCC am Laktationsanfang hoch, Minimum nach zwei Monaten, kontinuierlicher Anstieg bis zum Ende der Laktation
	REICHMUTH 1975	Hohe SCC in den ersten Tagen der Laktation und Zellzahlanstieg bis zum Ende der Laktation
	HURLEY 1989	Massive Leukozyteneinwanderung ins Trockenstehersekret
Gemelksfraktionen	ÖSTENSSON et al. 1988; HOLDAWAY et al. 1996	Beim Vergleich der Gemelksfraktionen: Höchste Werte im Residualgemelk
	HAMANN u. GYODI (1999)	Anstieg der SCC im Verlauf des Melkvorganges mit maximalen Zellzahlwerten im Viertelnachgemelk

Tab. 2-4 Fortsetzung

Faktor	Literatur	Veränderung der Zellzahl in der Milch (Viertelanfängsgemelk)
Milchmenge	COFFEY et al. 1986	Einfluss auf SCC ab zweiter Laktation an signifikant
	SCHULTZ 1977; NG-KWAI-HANG et al. 1984; MILLER et al. 1993	SCC-Reduktion mit zunehmender Milchmenge (Verdünnungseffekt)
Herde	COFFEY et al. 1986	Herdenindividuelle Einflüsse für Tiere gleicher Rasse
Rasse	DOGGWEILER u. HESS 1983	Simmenthaler Fleckvieh zeigte mit 16.000 Zellen/ml den niedrigsten $\bar{X}_g$ im Vergleich zu Braunvieh mit 20.000/ml und Schwarzfleckvieh mit 22.000/ml

Tab. 2-5 Umweltassoziierte Faktoren, die den Zellgehalt beeinflussen

Faktor	Literatur	Veränderungen der Zellzahl in der Milch (Viertelanfangsgemelk)
Jahreszeit	REICHMUTH 1975; NG-KWAI-HANG et al. 1984; WIGGANS u. SHOOK 1987	Indirekter Einfluss durch jahreszeitlich synchronisierte Laktationen
Tageszeit	MARSCHKE et al. 1987	Höhere Zellzahl im Abendgemelk (bei kürzerer ZMZ)
Stress	HAMANN u. REICHMUTH 1990; HAMANN 1992	Erhöhung des Infektionsrisikos (Mastitisprädisposition durch Verringerung der Infektionsabwehr) oder durch SCC-Anstieg in bereits infizierten Eutervierteln durch Exazerbation verborgener Mastitiden
	BERNING et al. 1987	Keine Veränderung normal sezernierender Viertel
Fütterung	REICHMUTH 1975	Indirekt infolge Stress: Anstieg der Zellzahl (in vorgeschädigten Eutern)
Melktechnik	OLNEY et al. 1983	Fehler in der Melktechnik (zu hohes Vakuum, zu schnelle Pulsation, etc.) führen zu Zellzahlanstiegen in bereits infizierten, nicht jedoch bei gesunden Eutervierteln

Zytobakteriologische Befunde können auf drei verschiedenen Diagnostikebenen erhoben werden: Viertel, Euter und Tank. Eine Diagnostik im eigentlichen Sinne ist aber nur auf der Ebene des einzelnen Viertels möglich, da sich durch vielfältige Mischungs- und Kombinationsmöglichkeiten der Milch von gesunden und weniger ausgeprägt erkrankten Eutervierteln in Gesamtgemelken oder Tankmilch diagnostisch trennscharfe Grenzwerte nicht definieren lassen (HAMANN u.

FEHLINGS 2002). Befunderhebungen auf Euterebene (Gesamtgemelk) haben ihren Wert als zusätzliche Informationen, besonders wenn sie regelmäßig durchgeführt werden, um tierindividuelle Entwicklungen zu erkennen (monatliche Leistungskontrolle). Feststellungen des Zellgehalts auf Tankmilchebene haben praktische Bedeutung, da routinemäßig mindestens einmal monatlich im Rahmen der Gütebewertung die Zellgehaltsbestimmung erfolgt und das Ergebnis den Auszahlungspreis dann beeinflusst, wenn  $\bar{X}_g$  über drei Monate  $> 400\,000$  Zellen/ml beträgt.

Zur Bestimmung des Zellgehalts (somatische Zellen/ml) in Milch kommen zwei Untersuchungsprinzipien zur Anwendung: Indirekte und direkte Zählverfahren.

#### Indirekte Methoden:

- California Mastitis Test (CMT)
- Brabanter Mastitis Reaktion (BMR)

Auf diese Methoden wird in Abschnitt 2.2 eingegangen.

#### Direkte Verfahren:

- Mikroskopische Zählung
- Kieler Sedimentausstrich-Verfahren
- Elektronische Zellzählung mit dem Coulter Counter
- Fluoreszenzoptische Verfahren

a) Fossomatic®

b) DeLaval Zellzahl-Messgerät DCC® (DCC®)

Im Folgenden werden die in den eigenen Untersuchungen angewandten fluoreszenzoptischen Verfahren beschrieben:

#### 2.1.3.1.1 *Fossomatic*<sup>®</sup> (Foss)

Die Fossomatic ist ein Gerät, welches nach fluoreszenzoptischem Verfahren arbeitet und in welchem die Milchproben mit Ethidiumbromid versetzt werden. Ethidiumbromid färbt die DNS der Zellkerne an und fluoresziert unter UV- oder Laseranregung. Neuere Geräte nutzen das durchflusszytometrische Prinzip. Jedes fluoreszierende Partikel wird als elektrischer Impuls empfangen. Bakterien und Fettpartikel fluoreszieren mit einer anderen Amplitude und werden so von der Messung ausgeschlossen. Der Zellgehalt wird durch das Gerät in Tausend pro ml angegeben. Der Variationskoeffizient dieser Methode liegt zwischen 2 und 5% (SCHMIDT MADSEN 1975).

#### 2.1.3.1.2 *DeLaval Zellzahl-Messgerät DCC*<sup>®</sup> (DCC<sup>®</sup>)

Das DCC<sup>®</sup> ist ein tragbares, batteriebetriebenes Zellzahlmessgerät. Das Gerät beruht ebenfalls auf fluoreszenzoptischem Prinzip, allerdings mit Propidiumjodid, das an die DNS der Zellkerne bindet. Die Zellen werden von einem ladungsgekoppelten Bauelement-Sensor (Charged Coupled Devices, CCD) gezählt. Die Emissionswelle der Light Emitting Diodes (LEDs) beträgt 540 nm, die Absorptionswellenlänge liegt bei 620 nm. Ein Absorptionsfilter zwischen LEDs und dem Sensor lässt nur emittiertes Licht passieren (DeLAVAL 2003; HAMANN et al. 2004; LIND et al. 2005).

Jeweils 60 µl jeder Milchprobe werden in die zum Gerät zugehörigen Kassetten aufgezogen und vermischen sich dort mit allen für die Messung notwendigen Chemikalien. Der Messbereich beträgt 10.000 bis 4.000.000 Zellen/ml, wobei mit einem Variationskoeffizienten zwischen 7 und 12% gearbeitet wird. Das gemessene Volumen beträgt 1 µl, d. h. es werden 100 bis 400 Zellen gezählt und das Ergebnis für die Umrechnung auf den Zellgehalt pro ml mit 1000 multipliziert. Zweiundachtzig Prozent der Proben mit einem Zellgehalt zwischen 100.000 und 2.500.000 haben einen Variationskoeffizienten von kleiner als 10% (DeLAVAL 2003; HAMANN et al. 2004; LIND et al. 2005; RØNTVED et al. 2005). Der „optimale“ Messbereich beginnt bei einem Zellgehalt von 100.000 Zellen, in niedrigeren Zellzahlbereichen steigt der

Variationskoeffizient (VK) an: In Proben mit einem Zellgehalt von unter 50.000 Zellen liegt der VK zwischen 22,77% bis 47,4%. Für Zellgehalte zwischen 50.000 und 100.000 Zellen liegt der VK im Bereich von 13,96% bis 16,99% (SULZER 2005).

#### 2.1.3.2 Elektrische Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit der Milch hängt von Konzentration und Beweglichkeit der dissoziierten Ionen (v. a. Chlorid-, Kalium- und Natrium-Ionen) ab. Milch aus eutergesunden Vierteln weist eine höhere Kalium-Ionen-Konzentration und einen niedrigeren Gehalt an Natrium- und Chlorid-Ionen als das Blut auf. Die Blut-Euterschranke hält dieses Konzentrationsgefälle aufrecht. Während einer Euterentzündung wird diese Barriere durchlässiger mit der Folge, dass sich die Ionen-Konzentrationen der Milch denen des Blutes angleichen und somit die Leitfähigkeit ansteigt (HAMANN u. ZECCONI 1998).

Zahlreiche Faktoren (siehe auch Tabelle 2-6) beeinflussen die elektrische Leitfähigkeit: das Laktationsstadium, die Rasse, die Fütterung, das Melkintervall, die Gemelksfraktion und der allgemeine Kuhstatus (HAMANN u. ZECCONI 1998).

Tab. 2-6 Einflussfaktoren auf die Elektrische Leitfähigkeit (EL) der Milch

Einflussfaktor	Einfluss auf die EL	Literatur
Rasse	Beeinflussung der Ionenzusammensetzung der Milch	HAMANN u. ZECCONI 1998
Laktationsstadium	Schwankung der Ionenkonzentration der Milch innerhalb einer Laktation	MIELKE u. SCHULZ 1983; HOLT 1985
Laktationsnummer	Laktationsnummer ohne signifikanten Einfluss	HAMANN u. ZECCONI 1998
Fütterung	Beeinflussung der Protein- und Fett-Konzentration der Milch durch die Fütterung	RÜEGG et al. 1980
Melkintervall (MI)	Signifikanter Einfluss: Kurzes MI (3 h) = hohe EL; Langes MI (9-15 h) = niedrige EL	FERNANDO u. SPAHR 1983
	Bei verkürzter ZMZ: Carry over-Effekt des erhöhten Fettanteils im Nachmelk, dadurch Erhöhung der von den Ionen zu überbrückenden Distanz	PRENTICE 1962
Gemelksfraktion	Niedrigste Werte im Endgemelk: niedriger Anteil dissoziierter anorganischer Salze und hoher Milchfettanteil	HAMANN u. GYODI 1999; PRENTICE 1962
Allgemeiner Kuhstatus	Beeinflussung der EL durch Östrus und systemische Erkrankungen	LINZELL u. PEAKER 1972

Die beschriebene Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit von multikausalen Faktoren lässt die alleinige Anwendung zur Mastitisdiagnostik nicht sinnvoll erscheinen, sodass zusätzliche Parameter herangezogen werden sollten. Die Aussagefähigkeit der elektrischen Leitfähigkeit lässt sich verbessern, indem man die Werte der Viertel untereinander (Inter-Quarter-Ratio, IQR) vergleicht (LINZELL u. PEAKER 1975; SHELDRAKE et al. 1983; EMANUELSON et al. 1987). Diese Methode hat allerdings auch Nachteile, da beim Vorliegen erhöhter Werte auf allen vier Vierteln, der Wert der IQR entsprechend klein ist, aber dennoch Veränderungen auf allen Vierteln vorliegen, die bei alleiniger Betrachtung der IQR unentdeckt blieben. Aufgrund unterschiedlicher Sekretionsleistungen der vorderen Viertel im Vergleich zu den hinteren, sollten nur die beiden vorderen, bzw. die beiden hinteren Viertel untereinander verglichen werden.

Die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit kann mit Handgeräten („Cow side test“) oder durch Sensoren in der Melkmaschine erfolgen (SCHULTZE 1985). In Milch gesunder Euterviertel weist sie einen physiologischen Bereich von 4,8 – 6,2 mS/cm auf (HAMANN u. FEHLINGS 2002).

#### 2.1.3.3 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAGase)

NAGase ist ein intra- und extrazellulär wirksames lysosomales Enzym, das überwiegend von epithelialen Zellen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) freigesetzt wird. Im Rahmen von Infektionen konnte eine gesteigerte Aktivität in der Milch nachgewiesen werden (SANDHOLM u. MATTILA 1985; SCHÜTTEL 1999; GRABOWSKI 2000).

Beobachtungen ergaben einen bis zu zehnfachen Anstieg der Aktivität des Enzyms sowie eine enge Korrelation mit dem Zellgehalt (SCHULTZE 1985). Somit kann ihre Aussagefähigkeit der des Zellgehaltes gleichgestellt werden (HAMANN et al. 1999). Ein Vorteil dieses Indikators ist seine Unabhängigkeit von Allgemeinerkrankungen (KRÖMKER et al. 1999). In Tabelle 2-7 sind Einflussfaktoren auf die NAGase-Aktivität in der Milch dargestellt.

Tab. 2-7 Einflussfaktoren auf die NAGase-Aktivität in der Milch

Einflussfaktor	Einfluss auf die NAGase-Aktivität	Literatur
Gemelksfraktion	Signifikant höhere Werte im Viertelgesamt- und Kuhgemelk als im Viertelanfangsgemelk	SCHÜTTEL 1999
Viertelposition	Kein signifikanter Unterschied	HAMANN et al. 1999
Laktations- stadium	Hohe Aktivitäten zu Beginn der Laktation, Rückgang in den ersten vier Wochen, Plateaubildung auf niedrigerem Niveau	SCHÜTTEL 1999
	Hohe Werte in der peripartalen Phase durch Blutbeimengungen in der Milch (Werte der NAGase-Aktivität im Blut deutlich höher als in Milch, 5- 90 nmol/ml/min)	HAMANN et al. 2006
Kuhindividuelle Einflüsse	Höhere Variationen der NAGase-Aktivität zwischen Kühen als innerhalb einer Kuh	SCHÜTTEL 1999; SANDHOLM u. MATTILA 1985; BERNING et al. 1987
Stress	Kein signifikanter Einfluss durch Hitzestress, wohl aber durch dreimalige Gabe von adrenokortikotropem Hormon	BERNING et al. 1987

Die NAGase-Aktivität zeigt nur beim Vorliegen mastitisassoziierter erhöhter Zellzahlbefunde eine parallele Entwicklung zur Zellzahl, nicht jedoch bei physiologisch bedingtem Zellzahlanstieg, was die Option zur Unterscheidung infizierter und nicht infizierter Viertel beinhaltet (HAMANN et al. 1999).

Die NAGase-Aktivitätsbestimmung hat das Potenzial zur Unterscheidung „majorer“ (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) und „minorer“ (CNS, *Corynebacterium spp.*) Mastitiserreger (MATTILA u. SANDHOLM 1985). Die Zellzahlbestimmung hingegen unterscheidet nur zwischen normaler Sekretion und gestörter Sekretion.

Die Messung der NAGase-Aktivität erfolgt fluoreszenzoptisch im Mikrotiterplattenverfahren. Das Ergebnis wird in  $\text{nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  angegeben. Der Referenzbereich in Milch liegt zwischen 1,1 und 2,8  $\text{nmol} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$  (SCHÜTTEL 1999).

## **2.2 California Mastitis Test**

### **2.2.1 Entwicklung**

Der California Mastitis Test (CMT), auch als Schalm-Test bezeichnet, wurde 1957 von SCHALM und NOORLANDER als indirekte Zellzählmethode in Kalifornien entwickelt, um damit einen schnellen, zuverlässigen Test, der direkt neben der Kuh durchzuführen ist, bereitzustellen (SCHALM u. NOORLANDER 1957).

Als Ausgangspunkt diente ihnen das „Whiteside phenomenon“, welches 1939 von W.H. Whiteside beschrieben wurde. Zunächst wurden dazu 2 ml Natronlauge (4%) mit 10 ml Milch vermischt, später wurden die Volumina beim „Modifizierten Whiteside Test“ auf 1 Tropfen Natronlauge und 5 Tropfen Milch verringert. Nach Vermischen der Natronlauge mit der Milch auf einer Glasplatte, konnte je nach Höhe des Zellgehalts keine, bzw. eine schwächere oder stärkere Bildung einer viskösen Masse beobachtet werden (SCHALM et al. 1955).

Um diesen Test praxistauglicher zu machen, wurden schließlich mit 2 ml Natronlauge präparierte Röhrchen benutzt, in welche die Milch direkt bis zu einer Markierung von 12 ml ermolken wurde. Dieses Vorgehen wurde als „Field Whiteside Test“ bezeichnet. Trotzdem bestand weiterhin der Nachteil des Handlings von 4%iger NaOH und Glasware im Melkstand.

Im Bestreben diese Nachteile auszuschalten, ersetzten SCHALM und NOORLANDER die Natronlauge durch Alkyl-Aryl-Sulfonat (oberflächenaktives Agens) und benutzten statt Glasplatten oder –röhrchen eine Plastikplatte mit vier Vertiefungen bzw. Behältern, um die Milch jeden Viertels getrennt aufzunehmen. Außerdem versetzten sie die Testflüssigkeit mit einem Indikator Bromcresolpurpur um auch einen pH-Umschlag im Falle des Vorliegens euterentzündungsbedingt veränderter Milch feststellen zu können. Zur Durchführung des Testes konnten sowohl Viertelgemelke, Herdensammelmilch als auch Tankmilch benutzt werden. Der CMT sollte wie folgt durchgeführt werden: „Nach Einmelken der Milch in die vier Behälter der Testschale, die Schale fast senkrecht halten, dadurch verbleiben jeweils etwa 2 ml in jedem Behälter. Anschließend Testflüssigkeit im Verhältnis von jeweils 1:1 zugeben und die Schale schwenken. Den Test innerhalb weniger Sekunden ablesen.“ Als Beurteilungsschlüssel empfahlen Schalm und Noorlander eine Skala von – (negativ) über T (Trace) bis zu 3 (stark positiv).

Die nachfolgende Tabelle 2-8 zeigt den Tabellenauszug einer Veröffentlichung von Schalm und Noorlander aus dem Jahre 1957:

Tab. 2-8 Vergleich des CMT-Scores mit dem Mittelwert der Gesamtzellzahl [x1000]/ml Milch (Auszug aus einer Tabelle von SCHALM u. NOORLANDER 1957)

	Anzahl Proben n	Beurteilungsschlüssel				
		Negativ	Trace	1	2	3
<b>VAG</b>	<b>n = 481</b>	271	52	95	43	20
<b>(herd SSH)</b>	<b>Zellen/ml</b>	<b>81,4</b>	431	1157	3250	11435
<b>VAG</b>	<b>n = 92</b>	54	2	10	10	16
<b>(assambled herd)</b>	<b>Zellen/ml</b>	<b>87</b>	500	753	3590	12400

### 2.2.2 Reaktionsmechanismus des CMT

Seit Entwicklung des CMT im Jahre 1957 ist der Reaktionsmechanismus nicht abschließend geklärt. Verschiedene Theorien zur Entstehung des Gels wurden aufgestellt:

1. Nach Zerstörung der Zellmembran der somatischen Zellen in der Milch durch das Detergens, brechen die Bindungen des freigesetzten korpuskulären Proteins, und das entfaltete Protein-Molekül verbindet sich mit dem Detergens unter Bildung eines Gels (SCHALM u. NOORLANDER 1957).

2. In einer anderen Arbeit wird postuliert, dass die Molkenproteine der Milch als Reaktionspartner des Detergens zur Bildung des Gels dienen (CHRIST 1961). Das Reaktionsvermögen mit Netzmitteln sei geradezu ein Charakteristikum der Proteine. CHRIST schloss dies aus der Beobachtung, dass abzentrifugierte „California-Test“-Gallerte aus rund 3% Protein und 90% Prozent Fett im lyophilisierten Trockengut besteht. Beim Vorliegen einer Sekretionsstörung kommt es zu einer Konzentrationsverschiebung der Molkenproteine, die der des Blutes ähnlicher wird. Er behauptete des Weiteren, dass die California-Reaktion vornehmlich an die

Rahmschicht der Milch gebunden sei. Demnach sollten folgende Bindungen zur Bildung des Gels beitragen:

- Salzartige Bindungen zwischen kationischen Proteinresten
- Assoziationen überschüssiger Detergensmoleküle durch weiche Bindungen wie van der Waalsche Kräfte

Als Einflussfaktoren auf die Fähigkeit zur Bildung dieser Bindungen gab er den pH-Wert, die Temperatur und das Mengenverhältnis Detergens/Protein an.

3. Eine weitere Publikation besagt, dass zumindest ein Teil des Proteins des DNA-Protein-Komplexes der Leukozytenkerne zusätzlich zum nativen DNA-Polymer notwendig sei, um eine Gallerte während der CMT-Reaktion zu bilden (NAGESWARARAO u. DERBYSHIRE 1969). Es wurde festgestellt, dass mit Dauer der Lagerung von Milchproben sich die Gelbildung von Tag zu Tag vermindert, was auf den sinkenden Gehalt an vitalen Leukozyten zurückgeführt wurde. Der gleiche Effekt wurde nach Einfrieren und Auftauen der Milchproben beobachtet. Zugabe von Casein, bzw. Erhöhung des pH-Wertes oder Zugabe von EDTA – was beides zu mehr freigesetztem Casein führt - resultierte in diesen Versuchen in vermehrter Gelbildung. DNase oder proteolytische Enzyme verminderten oder verhinderten, je nach Konzentration, eine Gelbildung da einige Bindungen in der DNA brechen durch DNase, bzw. Proteine werden durch proteolytische Enzyme zu kleinen Peptiden verdaut. Die Gelbildung wurde schließlich folgendermaßen erklärt: Das Detergens setzt DNA-Protein-Komplexe aus den Zellkernen der Leukozyten frei und diese bilden daraufhin spontan ein Gel.

4. Die Gelbildung während des CMT korreliert positiv ( $r = 0,94$ ) mit dem Gehalt an DNA in der verwendeten Milch (MILNE u. De LANGEN 1977).

5. Das CMT-Gel ist eine nicht-homogene, nicht-Newton-Flüssigkeit mit rheopektischem und rheodestruktivem Verhalten (WHYTE et al. 2005). Nach Färben des CMT-Gels und Betrachtung bei zehnfacher Vergrößerung, konnten wahllos und

chaotisch verteilte DNA-Histon-Detergens-Fäden beobachtet werden. WHYTE et al. (2005) postulierten schließlich folgenden Reaktionsmechanismus des CMT: Das Detergens löst die somatischen Zellen auf. Die um Histone gewickelte DNA wird freigesetzt, es kommt zu ionischen Bindungen zwischen den negativ geladenen Detergens-Molekülen und den positiv geladenen Histonen. Sie untermauern ihre Theorie mit der Beobachtung, dass DNAse die Gelbildung mindert bzw. verhindert, was sie mit dem Brechen der DNA und der damit vorhandenen freien Beweglichkeit der Histon-Detergens-Verbindungen erklären. Als weiteren Punkt zur Bestätigung ihrer Theorie sehen sie die Beobachtung, dass auch Proteinasen die Gelbildung verhindern, indem sie, so wurde vermutet, die Histone derartig verändern bzw. verdauen, dass sie ihre Fähigkeit zur Bindung mit dem Detergens verlieren.

### **2.2.3 Weiterentwicklung und Objektivierung des CMT sowie vergleichbare Tests**

Um die Auswertung des CMT-Ergebnisses zu objektivieren, wurden verschiedene Verfahren entwickelt:

#### **2.2.3.1 Falling ball Viscosimeter**

Hierbei wird die Reaktionsintensität des Schalmtestes durch die Zähflüssigkeit des Testgemisches bzw. die Durchlaufzeit einer Kugel im Viscosimeter (Fallzeit) ausgedrückt (KIERMEIER u. KEIS 1963). Die visuelle und damit subjektive vom Untersuchenden abhängige Beurteilung wird durch objektive Messung ersetzt. Zur Durchführung dieser Messung werden 20 ml Milch mit 30 ml Schalmreagenz vermischt und in ein Viscosimeter gegeben. Anschließend wird eine Kugel in das mit dem Gemisch gefüllte Fallrohr gegeben und die Durchlaufzeit von einer oberen zu einer unteren Marke gemessen. Die Ergebnisspanne reicht von 151 sec. (negative Schalmreaktion) in 30 Sekunden Schritten bis zu 263 sec. (stark positive Schalmreaktion). Die zügige Durchführung dieser Messmethode ist nach Vermischen

der Milch mit dem Schalmreagenz wichtig, da die Gelbildung reversibel ist und es durch zu lange Wartezeiten zu falschen Ergebnissen kommen kann.

### 2.2.3.2 Rolling ball Viscometer

Um den Nachteil der Entwicklung zu großer Scheerkräfte beim Gebrauch des Falling ball Viscometers auszugleichen, wurde das Rolling ball Viscometer entwickelt, indem eine Kugel nicht wie bei erstgenanntem senkrecht durch ein Fallrohr fällt, sondern durch ein Fallrohr mit 26° Neigung rollt. Ein großer Nutzen im Gebrauch von Viscometern zur Auswertung des CMT liegt in ihrer einfachen Handhabung auch für ungeübte Benutzer (WHITTLESTONE et al. 1970).

### 2.2.3.3 Rotary Viscometer

Bei dieser Form des Viscometers werden jeweils 10 ml Reagenz und Milch in einem Becher vermischt. Der Becher befindet sich auf einer Plattform. Nach Einschalten des Viscometers dreht sich die Plattform mit 250 Umdrehungen pro Minute. Gleichzeitig senkt sich ein Messkopf bzw. eine Platte am Messkopf in das Gemisch. Mit steigender Viskosität wird die Platte nach oben gegen zwei Sensoren gedrückt. Der stärkste gemessene Druck gilt als Endergebnis und wird mittels einer Regressionsgeraden in ein Zellzahlergebnis umgewandelt (NICHOLS u. PHILLIPS 1972).

### 2.2.3.4 Mit dem CMT vergleichbare Reaktionen

#### 2.2.3.4.1 *Brabanter Mastitis Reaktion (BMR)*

Bei dieser Art der indirekten Zellzählung werden 0,6 ml Milch mit 0,4 ml 3%iger Sodiumpyridylsulphonat-Lösung gemischt und in eine Glas-Kapillare gegeben. Die Zeit, die das Gemisch benötigt, um durch die Kapillare zu fließen, wird gemessen und unter Einbeziehung eines Faktors in die in der Milch enthaltenen Zellzahl umgerechnet (WHITTLESTONE u. De LANGEN 1965). Das Ergebnis wird mit einem

Punktesystem bewertet, wobei eine Durchflusszeit von 5 sec. als ein Punkt (•), von 10 sec. als zwei Punkte (••), von 20 sec. als drei Punkte (•••) und von mehr als 60 sec. als vier Punkte (••••) bezeichnet wird (JAARTSVELD 1963).

#### 2.2.3.4.2 *Wisconsin Mastitis Test*

Auch bei dieser Methode wird Milch mit Reagenz (1,25%ige Alkyl-Benzene-Sulphonat) vermischt und in ein Glasröhrchen mit Deckel gegeben. Im Deckel befindet sich ein Loch mit definiertem Durchmesser. Das Röhrchen wird für eine festgelegte Zeitspanne mit dem Deckel nach unten gestülpt. Die Höhe der nach dieser Zeitspanne im Röhrchen verbliebenen Flüssigkeitssäule korreliert (Korrelationsfaktor: 0,91) mit der Quadratwurzel der in der Milch enthaltenen Zellzahl (WHITTLESTONE u. De LANGEN 1965).

### 2.2.4 **Einflüsse auf CMT-Ergebnisse**

In der folgenden Tabelle sind Einflussfaktoren auf das Ergebnis des CMT zusammengefasst.

Tab. 2-9 Einflussfaktoren auf das CMT-Ergebnis

Faktor	Einfluss	Literatur
Alter	Häufig höhere SCC mit steigender Laktationszahl (Ausdruck vorhandener Infektionsgeschehen und erhöhter Disposition) und somit häufiger positive CMT-Ergebnisse	BRAUND u. SCHULTZ 1962
Laktation	Ver mehrt höhere SCC mit voranschreitender Laktation, damit häufiger positive CMT-Ergebnisse	BRAUND u. SCHULTZ 1962
Gemelksfraktion	Tendenz: häufiger positive CMT-Reaktionen aus Vorgemelk als aus anderen Gemelksfraktionen	SCHALM 1960
	Empfehlung zur ausschließlichen Durchführung des CMT aus dem Vorgemelk, nach Verwerfen der ersten Strahlen der Milch empfohlen	HAMANN et al. 2005
Durchführung	Viele Viertel mit CMT positiver Milch werden bei Durchführung des CMT aus Tankmilch nicht erkannt: starker Verdünnungseffekt setzt die Zellzahl pro ml herab und schwächt das CMT-Ergebnis ab	SCHALM 1960; BRAUND u. SCHULTZ 1962
	Richtiges Mischungsverhältnis (1:1) von Detergens und Milch, ausreichendes nicht zu langes Mischen, promptes Ablesen	SCHALM 1960
	CMT-Gel hat rheodestruktive Eigenschaften, bricht also durch zu langes, zu heftiges Mischen	WHYTE et al. 2005
	Signifikanter Einfluss durch subjektive Beurteilung des Durchführenden	KIERMEIER u. KEIS 1963; REDETZKY et al. 2005
	Leichter, nicht signifikanter Einfluss, durch Wahl des Reagenz	HAMANN et al. 2005
Probenlagerung	Ausfall der CMT-Reaktion nach 24 stündiger Lagerung deutlich geringer, als bei frischen Proben	TUCKER u. PAAPE 1965
	DNase ist nicht der Grund für lagerungsbedingten Abfall der CMT-Reaktion, da sie erst nach Aufbrechen der Zellen durch das CMT-Reagenz Gelbildung verhindern kann	SINGH u. MARSHALL 1966
	Enge Korrelation zwischen Anwesenheit vitaler Leukozyten und der Fähigkeit der Milch ein Gel mit dem CMT-Reagenz auszubilden	NAGASWARARAO u. DERBYSHIRE 1969
	Viskosität des CMT-Gels, CMT-Score und Anteil vitaler Leukozyten sinken graduell	NAGASWARARAO u. CALBERT 1969
	Nativer Leukozytenkern ist notwendig zur Bildung des Gels in der CMT-Reaktion	RAO 1965

Tab. 2-9 Fortsetzung

Faktor	Einfluss	Literatur
DNase	DNase kann Gelbildung bei der CMT-Reaktion durch Zerstörung einiger Bindungen im DNA-Polymer abschwächen bzw. verhindern. Folge: DNA-Polymer verliert Fähigkeit zur Netzbildung	CAROLL u. SCHALM 1962; SINGH u. MARSHALL 1966; NAGASWARARAO u. DERBYSHIRE 1969
	Gelbildung wird durch DNase nur verhindert, wenn Zellen schon durch CMT-Reagenz aufgebrochen wurden	SINGH u. MARSHALL 1966
Proteine	Zugabe von Casein oder EDTA (führt zu vermehrter Löslichkeit von Casein) verstärkt die Gelbildung während des CMT	NAGASWARARAO u. DERBYSHIRE 1969
	Nur intakte DNA-Histon- Polymere führen zur Gelbildung, da Histone (= Protein) zur Bildung des CMT-Gel notwendig sind	NAGASWARARAO u. DERBYSHIRE 1969
	Rolle freien Proteins als Reaktionspartner des CMT-Reagenz ist zu vernachlässigen	MILNE u. De LANGEN 1977
Stress	Stress hat bei vorgeschädigtem Euter Einfluss auf den Zellgehalt pro ml in der Milch. CMT ist abhängig von der Höhe der Zellzahl, demnach ist also auch ein Einfluss von Stress auf den CMT zu erwarten	HAMANN u REICHMUTH 1990; HAMANN 1992

## 2.2.5 CMT im Rahmen der Mastitis-Diagnostik

In der folgenden Tabelle werden Vor- und Nachteile des CMT als Mittel zur Mastitisiagnostik dargestellt:

Tab. 2-10 Vor- und Nachteile des Schalmtest (CMT)

Vorteile	Nachteile
Schnell An Einzel-, Kannen- und Tankmilchproben durchführbar (SCHALM 1960)	Bei ausschließlich bakterieller Untersuchung der CMT- positiver Viertel, bleibt ein Teil der infizierten Viertel unerkannt (EASTERDAY et al. 1958)
Das Testreagenz ist nicht-toxisch, lang lagerbar und stabil (GRAY u. SCHALM 1960)	Anwendung des CMT an gelagerten Proben führt zu schwächerem Ausfall des Tests als am Tage der Probengewinnung (TUCKER u. PAAPE 1965; NAGASWARARAO u. CALBERT 1969)
Indirekte Methode zur Bestimmung des Zellgehalts (KIERMEIER u. KEIS 1963)	Bei Anwendung des Tests an Tankmilchproben ist eine Verdünnung und somit ein schwächerer Ausfall des Tests zu beachten (GRAY u. SCHALM 1960)
Durch Nutzung von Viskosimetern ist das Ergebnis objektivierbar (KIERMEIER u. KEIS 1963)	Subjektiv da Beurteilung vom Untersucher abhängig (KIERMEIER u. KEIS 1963)
Dient im Stall als Bindeglied zwischen klinischer und labordiagnostischer Untersuchung (SCHEIDEWIG 1964)	Mastitiserreger werden nicht erfasst (SCHEIDEWIG 1964)
Große Sicherheit im negativen Bereich (95%) (SCHEIDEWIG 1964)	Keine Zelldifferenzierung möglich (SCHEIDEWIG 1964)
Gute Übereinstimmung mit Laboruntersuchungen (92,7%) (SCHEIDEWIG 1964)	Wisconsin Mastitis Test korreliert besser mit mikroskopischer Zellzählung (0,97 -0,99) (JANZEN 1968)
Gut einsetzbar zur Herdendiagnostik und für Nachuntersuchungen (SCHEIDEWIG 1964)	CMT ist subjektiv und zeigt höhere Variabilität (JANZEN 1968)
CMT reagiert auf alle kernhaltigen Zellen: kein Nachteil, da eine Zelldifferenzierung keinen diagnostischen Vorteil bringt (WHITTLESTONE u. De LANGEN 1965)	Nur im Zusammenhang mit der bakteriologischen Untersuchung der Milch ist die Diagnose: „Mastitis“ möglich (HAMANN et al. 2004)

Tab. 2-10 Fortsetzung

Vorteile	Nachteile
Screeningmethode in den ersten fünf Tagen nach dem Kalben (SARGEANT et al. 2001; HAMANN et al. 2004)	Nur von erfahrenen Untersuchern anwendbar (HAMANN et al. 2004)
Bei einer festgelegten Grenze von 100.000 Zellen/ml Milch zeigt der CMT eine ähnliche Genauigkeit bei der Erkennung kultur-positiver Proben wie die Fossomatic® (HAMANN et al. 2004)	
Der CMT zeigt bei einer Grenze von 100.000 Zellen/ml eine Sensitivität von 95,2%, eine Spezifität von 68,4% (HAMANN et al. 2004) und eine diagnostische Genauigkeit von 79% (REDETZKY et al. 2005)	
Kostengünstig (REDETZKY et al. 2006)	

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Versuchstiere**

In den Laborversuchen wurden Blut- und Milchproben von Tieren des Lehr- und Forschungsgutes Ruthe der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Betrieb 1) und des Betriebes Meldau in Adelheidsdorf (Celle) (Betrieb 2) verwendet.

Die für den Feldversuch 3.3.5.1 beprobten Tiere stammten aus dem Einzugsgebiet der Osnabrücker Herdbuchgesellschaft (OHG).

Der Feldversuch 3.3.5.2 erfolgte am Melkroboter des Lehr- und Forschungsgutes Ruthe (Betrieb 1).

#### **3.1.1 Betrieb 1**

Auf dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurden ca. 85 Kühe der Rasse Deutsche Holstein Farbrichtung Schwarzbunt gemolken. Die durchschnittliche Leistung betrug 9500 kg Milch pro Kuh und Jahr. Die Herde war in zwei Gruppen mit zwei unterschiedlichen Haltungssystemen aufgeteilt.

Für die Laborversuche wurde die ca. 40 Tiere umfassende konventionell in einem Doppel-Vierer-Autotandem Melkstand der Firma DeLaval, Tumba, Schweden gemolkene Gruppe genutzt. Die Tiere wurden in einem Tiefstreulaufstall mit Fressgitter gehalten und zweimal täglich in der Zeit von 6.00 – 7.30 Uhr und von 16.00 – 17.30 Uhr gemolken. Das Futter wurde als Mischration aus Gras-Mais-Pressschnitzelsilage, Heu, Gerstenstroh und einer Mineralstoffmischung vorgelegt. Über eine Transponderfütterung am Krafffutterautomaten und im Melkstand fand eine leistungsorientierte Verabreichung von Krafffutter statt. Wasser war über Trogtränken ad libitum verfügbar.

Der Feldversuch 3.3.5.2 wurde an der durchschnittlich 30 Tiere umfassenden Gruppe, die im Melkroboter, Voluntary Milking System<sup>®</sup> (VMS<sup>®</sup>) der Fa. DeLaval<sup>™</sup> Tumba, Schweden gemolken wurde, durchgeführt. Die VMS-Herde wurde in einem Boxenlaufstall mit Spaltenboden gehalten. Der Stall war in einen Liege- und einen Fressbereich unterteilt, zwischen diesen beiden Abteilungen war das automatische Melksystem integriert. Die Tiere konnten vom Fressbereich zu den Liegeplätzen lediglich durch ein nur in Richtung Liegebereich zu öffnendes Einwegtor gelangen und mussten auf dem Weg zurück zum Futtertisch das VMS<sup>®</sup> passieren (gelenkter Kuhverkehr). Der Fressbereich bestand aus einem Laufgang, von dem aus erhöht konzipierte Einzelfressplätze zu erreichen waren. Die Kraftfutterstation war ebenfalls von diesem Laufgang aus zugänglich. Die Hochliegeboxen zu beiden Seiten des Laufgangs im Liegebereich waren mit Kuhmatratzen und Kuhkomfort-Gummimatten ausgelegt, wurden täglich gereinigt und mit Sägespänen eingestreut. Zwei im Stallbereich angebrachte Beckentränken, sowie eine Schalenränke ermöglichten den Tieren sowohl im Fress- als auch im Liegebereich die Wasseraufnahme.

### **3.1.2 Betrieb 2**

Der Betrieb Meldau molk täglich ca. 80 Tiere der Rasse Deutsche Holstein Farbrichtung Schwarzbunt mit einer Jahresleistung von ca. 8000 kg. Die Melkungen erfolgten zweimal täglich in der Zeit von 5.30 – 7.30 Uhr und 17.00 – 19.00 Uhr in einem Doppel-Sechser Fischgrätenmelkstand der Fa. Westfalia<sup>®</sup>, Herdecke. Die Tiere wurden in einem Boxenlaufstall mit sägemehleingestreuten Tiefboxen, Spaltenboden und Fressgitter gehalten, im Sommer wurde den Tieren Weidegang ermöglicht. Das Grundfutter bestand aus Gras- und Maissilage, die mit Kalk und Mineralfutter aufgewertet wurden. Kraftfutter erhielten die Tiere leistungsbezogen über einen Kraftfutterautomaten, Wasser stand ad libitum aus Trogtränken zur Verfügung.

### 3.1.3 Tiere der Osnabrücker Herdbuchgesellschaft (OHG)

Die Tiere, die im Rahmen der Probennahme in Osnabrück beprobt wurden, stammten aus Beständen mit 3 bis zu 230 Tieren. Verschiedenste Haltungssysteme und Fütterungsregime waren vertreten. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der besuchten Betriebe:

Tab. 3-1 Beprobte Betriebe der Osnabrücker Herdbuchgesellschaft (OHG)

Betrieb	Tierzahl	Haltung	Bodenbelag	Melkstand	Leistung/Jahr
1	65	Boxen-Laufstall	Spalten	Fischgrät	11.000
2	20	Anbinde-Haltung	Stroh	-	(nur Färsenaufzucht)
3	70	Boxen-Laufstall	Spalten	Autotandem	10.000
4	38	Boxen-Laufstall	Spalten	Fischgrät	11.750
5	32	Boxen-Laufstall	Spalten	Fischgrät	9.700
6	75	Boxen-Laufstall	Spalten	Autotandem	10.100
7	6	Anbinde-Haltung	Stroh	Eimer	11.000
8	40	Boxen-Laufstall	Plan	?	10.000
9	6	Anbinde-Haltung	Stroh	Eimer	10.500
10	24	Anbinde-Haltung	Stroh	?	10.500
11	32	Boxen-Laufstall	Spalten	Fischgrät	10.000
12	12	Anbinde-Haltung	Rosten	Eimer	8.500
13	20	Anbinde-Haltung	Rosten	Eimer	8.800
14	20	Anbinde-Haltung	Stroh	?	10.000
15	230	Boxen-Laufstall	Spalten/Säge-späne	Fischgrät	10.200
16	22	Anbinde-Haltung	Stroh	Eimer	9.700
17	20	Anbinde-Haltung	Stroh	Eimer	10.700
18	45	Boxen-Laufstall	Spalten/Späne /Stroh	Tandem	11.400
19	55	Boxen-Laufstall	Spalten/Stroh	Fischgrät	10.800

Tab. 3-1 Fortsetzung

Betrieb	Tierzahl	Haltung	Bodenbelag	Melkstand	Leistung/Jahr
20	3	Anbinde-Haltung	Stroh	-	(nur Färsenaufzucht)
21	6	Anbinde-Haltung	Stroh	Rohrmelk-anlage	10.953
22	38	Boxen-Laufstall	Spalten/Häcks el -stroh	Fischgrät	9.900
23	?	Anbinde-Haltung	Stroh	-	(nur Färsenaufzucht)
24	75	Boxen-Laufstall	Spalten	Fischgrät	9.300
25	50	Boxen-Laufstall	Kuhmatratzen	Fischgrät	8.000

## 3.2 Material

### 3.2.1 Milchprobenentnahme

<b>GERÄTE</b>	
-	
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
Haushaltstücher	Goldhand, Düsseldorf
Latexhandschuhe	NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter
Reagenzglas Duran® 13 ml mit Silikonstopfen	Schott Glaswerke, Mainz
<b>REAGENZIIEN</b>	
Alkohol 70%	CG Chemikalien, Laatzen

### 3.2.2 Blutentnahme

<b>GERÄTE</b>	
Staukette nach Witte	Fa. Eikemeyer, Tuttlingen
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
Kanülen 1,2 x 40 mm	Terumo, Eschborn
Vacutainer Luer Ansatzstück mit Ventil	Fa. Becton Dickinson (367300), Heidelberg
Vacutainer Plastikhalter	Fa. Becton Dickinson (367887), Heidelberg
Vacutainerröhrchen, 10 ml mit EDTA-K <sub>2</sub> Zusatz	Fa. Becton Dickinson (368457), Heidelberg
Vacutainerröhrchen, 10 ml mit CAT- (clot-activator) Zusatz	Fa. Becton Dickinson (367896), Heidelberg
<b>REAGENZIEN</b>	
Alkohol 70 %	CG Chemikalien, Laatzen

### 3.2.3 Elektrische Leitfähigkeit

<b>GERÄTE</b>	
Mastitron®	Fa. Milku™, Uelzen
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
-	
<b>REAGENZIEN</b>	
-	

### 3.2.4 California Mastitis Test

<b>GERÄTE</b>	
Schalmschale	Westfalia Surge, Herdecke
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
-	
<b>REAGENZIEN</b>	
CMT-Reagenz: Profilac-Reagent	Westfalia Surge, Herdecke

### 3.2.5 Bakteriologie

Siehe unter Punkt 3.3.3.3. Die Durchführung erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Lebensmittelqualität und –sicherheit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

### 3.2.6 Zellgehalt

Die Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen in Viertelanfangsgemelken fand unter Anwendung des von SCHMIDT MADSEN (1975) beschriebenen fluoreszenzoptischen Verfahren mit Fossomatic<sup>®</sup> -Messgeräten der Fa. Foss Electric<sup>™</sup> (Dänemark) im Zentrum für Tiergesundheit, Milch- und Lebensmittelanalytik des Ahlemer Instituts (Landwirtschaftskammer Hannover) statt. Siehe Literatur unter Punkt 2.1.3.1.1.

### 3.2.7 NAGase

Siehe unter Punkt 3.3.3.5. NAGase-Aktivität wurde gemessen durch: Mitarbeiter des Instituts für Lebensmittelqualität und –sicherheit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

### 3.2.8 DCC®

<b>GERÄTE</b>	
DeLaval Zellzahlmessgerät DCC®	DeLaval (92740080) Tumba, Schweden
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
DCC® Kassetten	DeLaval (92865880) Tumba, Schweden
<b>REAGENZIEN</b>	
-	

### 3.2.9 Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT

<b>GERÄTE</b>	
Schallkopf MSE 150 Watt Ultrasonic Disintegrator	MSE Scientific instruments, Sussex, England
Mastitron®	Fa. Milku™, Uelzen
Schalmschale	Westfalia Surge, Herdecke
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
Babyflaschen (200 ml)	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön
<b>REAGENZIEN</b>	
Bronopol®	Merck Eurolab GmbH (8.17017.0250), Darmstadt
CMT-Reagenz: Profilac-Reagent	Westfalia Surge, Herdecke

### 3.2.10 Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten mit dem Schalmreagenz

Materialien zur Blutentnahme: siehe unter Punkt 3.2.2.

<b>GERÄTE</b>	
Kühlzentrifuge Omnifuge 2.ORS	Heraeus Sepatech, Hanau
Blutanalysegerät Hematology Analyser, Modell MEK – 6108G für Veterinärmedizin, „Celltac®“	NIHON KOHDEN, Bad Homburg
Schalmschale	Westfalia Surge, Herdecke
Pipetten Eppendorf Research® verschiedene Modelle, Einstellbar von 0,5 – 10 µl; 100 – 1000 µl; 500 – 5000 µl; Fixvolumen 10 µl und 50 µl	Eppendorf, Hamburg
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
Pipettenspitzen Standartips; 10 µl; 20 – 200 µl	Eppendorf, 0030 001.168; 0030 000.870, Hamburg
Pasteurpipetten aus Glas, 10 ml	Anfertigung von Landgraf Laborgeräte OHG; Langenhagen
Röhrchen, 15 ml und 50 ml mit Deckel	Sarstedt AG (62.554.502; 62.547.254), Nümbrecht
Safe-Lock-Tubes 1,5 ml (Eppendorf Reaktionsgefäße)	Eppendorf (003120.086), Hamburg
<b>REAGENZIEN</b>	
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , pulverisiert	Sigma Aldrich Chemie GmbH (1000 – 3), München
2 x PBS (doppelte Menge Trockensubstanz in 1l Aqua tridestillata gelöst)	
Aqua tridestillata	
Percoll®, pH 8,9 ± 0,3 (20 °C), Dichte 1,130 ± 0,5 g/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH (P 1644), München
Pancoll (human) Dichte 1,077 g/ml	PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
CMT-Reagenz: Profilac-Reagent	Westfalia Surge, Herdecke

## 3.2.11 Zellvitalität

<b>GERÄTE</b>	
Kühlzentrifuge Omnifuge 2.ORS	Heraeus Sepatech, Hanau
Hamburg MS 1 Minishaker IKA	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Blutanalysegerät Hematology Analyser, Modell MEK – 6108G für Veterinärmedizin, „Celltac®“	NIHON KOHDEN, Bad Homburg
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACSCalibur®, mit angeschlossener Computereinheit	Becton Dickinson, Heidelberg
Multipette® 4780	Eppendorf (4980000.015), Hamburg
Pipetten Eppendorf Research® verschiedene Modelle, Einstellbar von 0,5 – 10 µl; 100 – 1000 µl; 500 – 5000µl; Fixvolumen 10 µl und 50 µl	Eppendorf, Hamburg
Schalmschale	Westfalia Surge, Herdecke
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
Combitips plus (1,0 ml; 2,5 ml)	Eppendorf, (0030 069.234; 0030 069.242), Hamburg
Glasflaschen 250 ml Jenaer Glas	Schott (3501), Mainz
Glasflaschen Duran® mit Schraubverschluss 100 ml, 500 ml und 5 l	Landgraf Laborgeräte OHG, Langenhagen
Pasteurpipetten aus Glas, 10 ml	Anfertigung von Landgraf Laborgeräte OHG; Langenhagen
Pipettenspitzen Standardtips; 10 µl; 20 – 200 µl	Eppendorf, 0030 001.168; 0030 000.870, Hamburg
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5 ml, aus Polypropylen (FACS- Röhrchen)	Sarstedt AG (55.1578), Nümbrecht
Röhrchen, 15 ml und 50 ml mit Deckel	Sarstedt AG (62.554.502; 62.547.254), Nümbrecht
Safe-Lock-Tubes 1,5 ml (Eppendorf Reaktionsgefäße)	Eppendorf (003120.086), Hamburg

<b>REAGENZIEN</b>	
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , pulverisiert	Sigma Aldrich Chemie GmbH (1000 – 3), München
Trägerflüssigkeit für die Durchflusszytometrie (Sheath fluid): Zu sterilfiltriertem PBS wurde 0,1 mg/ml Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) gegeben	Sigma Aldrich Chemie GmbH (1000 – 3), München
SYTO <sup>®</sup> 13 Wurde in der Konzentration 20 mmol/ml gelöst in DMSO gefroren angeliefert. Die für den Versuch benötigte Menge der Stammlösung wurde vor jedem Gebrauch 1:1000 mit PBS verdünnt	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
CMT-Reagenz: Profilac-Reagent	Westfalia Surge, Herdecke

### 3.2.12 Reagenzien verschiedener Hersteller

<b>GERÄTE</b>	
Schalmschale	Westfalia Surge, Herdecke
<b>GLAS und EINMALARTIKEL</b>	
Babyflaschen (200 ml)	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön
<b>REAGENZIEN</b>	
California Milktest	COX Surgical, Surrey, England
DeLaval mastitis test CMT	DeLaval, Poland
Jorvet California Mastitis Test	Jorgensen Laboratories, Inc. Loveland, Colorado
Shoof Mastitis Test Solution	Shoof International LTD, Cambridge, New Zealand
Profilac-Reagent	Westfalia Surge, Herdecke

### **3.2.13 Eutergesundheit bei Auktionstieren**

Material: siehe unter den Punkten: 3.2.1, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6 und 3.2.7.

### **3.2.14 Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des Automatischen Melkens (VMS)**

Material: siehe unter den Punkten: 3.2.1, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6, 3.2.7 und 3.2.8.

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 Milchprobenentnahme**

Es wurden aus jedem funktionellen Drüsenkomplex Milchproben gewonnen, die sich in drei Fraktionen – Vorgemelk, Viertelanfangsgemelk und je nach Versuch Viertelhandgemelk – aufteilten. Zur Probenentnahme am Roboter wurde dieser in den manuellen Betrieb versetzt. Die Ausführung der Probenahme erfolgte nach den Leitlinien der DVG (2000) zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen. Anschließend wurden die Proben umgehend zum Institut transportiert und hier entweder sofort weiterverarbeitet oder im Kühlraum (4°C) bis zur Verarbeitung gelagert.

#### **3.3.1.1 Viertelvorgemelk (VVG)**

Aus der nicht gereinigten und unstimulierten Zitze wurden ca. 2 ml Milch in die Messkammer des Gerätes Mastitron<sup>®</sup> gemolken und die elektrische Leitfähigkeit in mS/cm bestimmt.

### 3.3.1.2 Viertelanfangsgemelk (VAG)

Nach trockener Reinigung der Zitze erfolgte eine gründliche Desinfektion mit Haushaltspapier, das mit 70%igem Ethylalkohol getränkt war. Ein steriles Glasröhrchen wurde mit ca. 10 ml Milch gefüllt und umgehend mit einem sterilen Silikonstopfen verschlossen.

### 3.3.1.3 Viertelgemelk Hand (VGH)

Nach Gewinnung der VAGs wurden je nach Versuch 10 - 200 ml Milch in sterile Glasflaschen oder Röhrchen gemolken.

## 3.3.2 Blutentnahme

Blut wurde mit Hilfe des Vacutainersystems unter sterilen Bedingungen aus der V. jugularis gewonnen. Nach Anlegen der Staukette nach Witte wurde die zu punktierende Halsstelle mit 70%igem Alkohol desinfiziert und aus der gestauten Vene die benötigte Blutmenge entnommen.

## 3.3.3 Probenanalyse

### 3.3.3.1 Elektrische Leitfähigkeit

Zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit in Viertelvorgemelken wurde das Gerät Mastitron<sup>®</sup> (Fa. Milku<sup>™</sup>) verwendet. Die Angabe erfolgte in Millisiemens pro Zentimeter (mS/cm).

### 3.3.3.2 California Mastitis Test (CMT)

Ca. 1,5 ml des Viertelanfangsgemelks wurden entweder direkt in die vier Felder der CMT-Schale gemolken oder im Labor pipettiert. Danach wurden 1,5 ml des CMT-Reagenz zugesetzt, die Schale einige Male gut geschwenkt und die Hälfte des

Gemisches verworfen: Das Verhältnis von Milch und CMT-Reagenz sollte gleich sein, da es sonst durch Schwimmen der Milch auf dem Reagenz zu verfälschten Ergebnissen kommen kann. Um das Fließverhalten (Schlierenbildung) des Gemisches ausreichend beurteilen zu können, darf zudem nicht zuviel des CMT-Milch-Gemisches in der CMT-Schale verbleiben. Anschließend erfolgte unter Heranziehung der unten abgebildeten Skala die Beurteilung der Viskosität bzw. der Schlierenbildung, indem die Schale einige Male schräg gehalten und das Fließen des Gemisches beobachtet wurden.

Tab. 3-2 CMT-Scores

<b>CMT-Score</b>	<b>Art der Reaktion</b>
<b>0</b>	Keine Reaktion
<b>0,5</b>	Fraglich
<b>1</b>	Ggr. Schlierenbildung
<b>2</b>	Mgr. Schlierenbildung
<b>3</b>	Hgr. Schlierenbildung
<b>4</b>	Beginnende Gallerte
<b>5</b>	Gallerte
<b>6</b>	Flocken

### 3.3.3.3 Bakteriologie

Jeweils 10 µl der VAGs wurden mittels Einmalösen auf einer halben Blutagarplatte mit Äskulinzusatz ausgestrichen. Die Einordnung der Bakterienkulturen erfolgte jeweils nach 24- und nach 48-stündiger Bebrütung im Wärmeschrank (37°C) anhand von Koloniemorphologie, Hämolyseverhalten, Äskulinspaltung sowie Anzahl der Kolonien. Nach Bedarf wurde eine Subkultivierung einzelner Kolonien durchgeführt.

#### 3.3.3.4 Zellgehalt

Nach Fixierung der VAGs mit 60 µl Bronopol wurden diese zur Messung des Zellgehaltes pro ml Milch (SCC = Somatic Cell Count) mit dem Gerät Fossomatic® ins Zentrum für Tiergesundheit, Milch und Lebensmittelanalytik des Ahlemer Instituts der Landwirtschaftskammer Hannover verbracht. Dazu wurde jede Probe mit Ethidiumbromid versetzt und die Zahl der Zellen pro ml fluoreszenzoptisch bestimmt.

#### 3.3.3.5 NAGase

Die Erfassung der N-Acetyl-β-D-glucosaminidase-Aktivität erfolgte fluoreszenzspektroskopisch mit dem Gerät Fluoroskan II® (Fa. Labsystems) nach dem Mikrotiterplattenverfahren. Über die Anwendung der Software SeroCalc® Version 4 (DEMOS Computer GmbH, Köln) wurde die ermittelte optische Dichte in die jeweilige Enzymaktivitätskonzentration ( $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) umgerechnet. Zur Anwendung kamen dabei die Vorschriften nach NOGAI et al. (1996). Für diese Verfahrensweise wurde in einem Bereich von 30 bis  $500 \times 10^3$  Zellen/ml ein mittlerer VK-Wert von 4,83% ermittelt.

#### 3.3.3.6 DCC®

Es wurden 60 µl der zu messenden Milchprobe (VAG) in eine DCC®-Kassette aufgezogen und innerhalb der Kassette mit Propidiumbromid vermischt. Anschließend wurde die Kassette in das DCC®-Gerät eingesetzt und der Zellgehalt nach fluoreszenzoptischem Prinzip gemessen.

### 3.3.4 Laborversuche

#### 3.3.4.1 Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT

Nach Feststellung der elektrischen Leitfähigkeit aus dem Vorgemelk wurden 20 VAGs zu je 200 ml gewonnen. Die weitere Verarbeitung und Behandlung der Proben ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tab. 3-3 Probenverarbeitung

1.	Abfüllen von 40 ml jeder Probe und Fixierung mit 200 µl Bronopol für die Fossomatic®
2.	Schalmen von je 1,5 ml jeder Probe
3.	Abfüllen von 50 ml jeder Probe und Behandlung mit Ultraschall (150 Watt; 18 Microns) für zweimal zehn Sekunden
4.	Entnahme von jeweils 1,5 ml jeder Probe und Durchführung des CMT
5.	Zweite Behandlung mit Ultraschall für zweimal zehn Sekunden (150 Watt; 18 Microns)
6.	Entnahme von 1,5 ml jeder Probe und Durchführung des CMT
7.	Abfüllen von 40 ml jeder Probe und Fixierung mit 200 µl Bronopol für die Fossomatic

#### 3.3.4.2 Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (PMN) mit dem CMT-Reagenz

Von sechs Rindern des Lehr- und Forschungsgutes Ruthe wurden Blutproben gezogen. Pro Tier wurde jeweils ca. 200 ml Blut zu einem Teil in mit Heparin-Röhrchen zur Lymphozytengewinnung, zum anderen Teil in mit EDTA versetzten Röhrchen zur Gewinnung von PMN, gewonnen.

### 3.3.4.2.1 Gewinnung von Lymphozyten

Heparinisiertes Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnen
Jeweils 15 ml Pancoll mit 30 ml der Blutmischung überschichten
Dichtezentrifugation: 30 min., 1100 x g, 10 °C, ohne Bremse
Jeweils die Interphase gewinnen
Dreimaliges Waschen ( 500, 250 und 80 x g) mit jeweils 10 ml PBS
Zellpellet in 1 ml PBS aufnehmen
Konzentration der Lymphozyten im Celltac <sup>®</sup> bestimmen

### 3.3.4.2.2 Gewinnung von PMN

Falcon-Röhrchen (50 ml) mit EDTA-Blut befüllen
Zentrifugation: 15 min., 1000 x g, ohne Bremse
Proben erschütterungsarm aus der Zentrifuge entnehmen
Plasma, Buffy coat und ein Drittel der Erythrozyten mit Pasteurpipette entnehmen und werfen
Sediment in 30 ml PBS resuspendieren
Zentrifugation und Abnehmen des Buffy coats wiederholen
Sediment durch Rütteln lösen
Zugabe von 20 ml A. tridest und 20 sec. leicht schwenken zur Lyse der Erythrozyten
Wiederherstellung der Isotonie durch Zugabe von 20 ml 2 x PBS
Zentrifugation: 10 min. , 1000 x g, Bremse
Überstand abgießen
Lyse zweimal mit je 10 ml A. tridest und 2x PBS wiederholen
Zellpellet mit 30 ml PBS resuspendieren
Zentrifugation: 5 min., 1000 x g, Bremse
Überstand werfen
Zellpellet in 1 ml PBS aufnehmen
Konzentration der PMN im Celltac <sup>®</sup> bestimmen

### 3.3.4.2.3 *Schalmen der Zellfraktionen*

Nach Gewinnung der Lymphozyten bzw. der PMN wurde jeweils eine Verdünnungsreihe mit den Stufen: 10.000 („Stufe 0“), 20.000 („Stufe 0,5“), 60.000 („Stufe 1“), 180.000 („Stufe 2“), 400.000 („Stufe 3“), 960.000 („Stufe 4“) und 3.000.000 („Stufe 5“) Zellen/ml durch Zugabe von PBS hergestellt. Die Wahl der Stufen erfolgte in Anlehnung an Angaben von REDETZKY et al. (2004), wonach Zellgehalte den CMT-Scores zugeordnet wurden, die in ihrer Größenordnung der in diesem Versuch gewählten Stufen entsprechen. Anschließend wurden jeweils 1,5 ml jeder Stufe mit 1,5 ml CMT-Reagenz versetzt, geschwenkt und das Ergebnis mittels CMT-Score beurteilt (siehe Tabelle 3-2).

### 3.3.4.3 *Zellvitalität*

#### 3.3.4.3.1 *Prinzip der Durchflusszytometrie*

Die zu untersuchenden Zellen müssen in Trägerflüssigkeit suspendiert sein und werden per Druckluft in die Messküvette des Gerätes gedrückt. Der Probenstrom wird von einem Argon-Ionen-Laser oder von einem Dioden-Laser bestrahlt. Abhängig von Größe und Granularität der Zellen, die den Strahl passieren, wird das Licht unterschiedlich abgelenkt. Die Ablenkung des Lichts in Richtung des einfallenden Strahls wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) bezeichnet, die des im rechten Winkel zum Strahlengang gestreuten Lichtes als Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC). Die Zellen können mit Fluorochromen, d.h. mit fluoreszierenden Farbstoffen versetzt werden, in Abhängigkeit ihres Absorptionsspektrums von einem Argon-Laser (Wellenlänge des emittierten Lichts = 488 nm) oder einem Diodenlaser (Wellenlänge = 635 nm) angeregt werden und Lichtquanten einer ihnen charakteristischen Wellenlänge emittieren. Das verwendete Durchflusszytometer erlaubt die Erfassung von Grün- (FI-1, Wellenlänge 515 – 545 nm), Orange- (FI-2, Wellenlänge 564- 606 nm), Rot- (FI-3, > 650 nm) und Blaufluoreszenzen (FI-4, 653 – 669). So können pro Partikel, welches die beiden Laser passiert, bis zu 6 Parameter (FSC, SCC, FI-1, FI-2, FI-3 und FI-4) erfasst werden.

Die Messwerte werden von der an das Gerät angeschlossenen Computereinheit gespeichert und können nach dem Messvorgang ausgewertet werden. Das Analyseprogramm CellQuestPro ermöglicht unter anderem die Darstellung von zwei Parametern gegeneinander in einem Koordinatensystem (Punktdiagramm, Dotplot) sowie die eines Parameters gegen die Zahl der gemessenen Ereignisse (Histogramm). So kann die Zahl an gemessenen Partikeln (Events) erfasst werden, die eine bestimmte Eigenschaft besitzen, sowie ihre mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die MFI gibt den Mittelwert der Fluoreszenz aller ausgewählten Events an.

#### 3.3.4.3.2 *Probenahme*

Einhundertundeinundneunzig Viertel wurden beprobt (48 Tiere, davon ein Dreistrich). Nach Feststellung der elektrischen Leitfähigkeit aus dem Viertelvorgemelk, wurde eine sterile Probe des Viertelanfangsgemelks gewonnen. Aus dieser Fraktion erfolgte die Bestimmung des Zellgehalts pro ml mittels Fossomatic<sup>®</sup> und die Durchführung der bakteriologischen Diagnostik. Zuletzt wurde aus jedem Viertel ein Viertelhandgemelk (50 ml) ermolken, aus welchem die Zellen zur Vitalitätsmessung im FACS gewonnen werden sollten.

### 3.3.4.3.3 *Isolation von Milchzellen*

Während der gesamten Aufbereitung Proben grundsätzlich mit Eis kühlen
Falcon-Röhrchen mit 50 ml jeder Probe (VGH) befüllen
Zentrifugation: 15 min., 800 x g, ohne Bremse
Nach Zentrifugation Fett mit Spatel entfernen
Magermilch abgiessen
Röhrchen für einige Zeit umgedreht auf Papiertuch lagern
Zellpellet aufrütteln
Röhrchen mit 30 ml PBS auffüllen
Zentrifugation: 10 min., 600 x g, ohne Bremse
Überstand abgiessen
Röhrchen für einige Zeit umgedreht auf Papiertuch lagern
Zellpellet mit 500 µl PBS resuspendieren
Zellkonzentration im Celltac <sup>®</sup> bestimmen
Zellkonzentration (mit PBS) auf 2 Millionen Zellen/ml einstellen

### 3.3.4.3.4 *Bestimmung der Zellvitalität im FACS<sup>®</sup>*

Jeweils 100 µl der Zellsuspensionen wurden mit 200 µl Sheath und 20 µl des Farbstoffs Syto 13 (in der Verdünnung 1:1000) versetzt. Nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben im FACS gemessen. Die Einstellungen des FACS<sup>®</sup> wurden nach KÖß (2004) gewählt.

### 3.3.4.4 *Reagenzien verschiedener Unternehmen*

Für den Reagenzienvergleich wurden 359 VGH (50 ml) von 92 Tieren (davon waren 9 Tiere Dreistriche) der Betriebe Meldau und Ruthe gewonnen. Zuvor wurde im Vorgemelk jeden Viertels die elektrische Leitfähigkeit via Mastitron<sup>®</sup> bestimmt. Unter Laborbedingungen wurde jedes VGH mit 5 verschiedenen CMT-Reagenzien der Unternehmen Cox (Surrey, England), DeLaval (Poland), Jorgensen Laboratories (Colorado, USA), Shoof (Cambridge, New Zealand) und Westfalia Surge (Herdecke)

geschalmt, indem jeweils 1,5 ml VGH mit jeweils 1,5 ml der verschiedenen CMT-Reagenzien versetzt, geschwenkt und das Ergebnis anhand des CMT-Scores beurteilt wurde.

### 3.3.5 Feldversuche

#### 3.3.5.1 Eutergesundheit von Auktionstieren

Im Rahmen dieses Versuches wurden 143 Erstkalbinnen (568 Viertel) aus dem Zuchtgebiet der Osnabrücker Herdbuchgesellschaft beprobt. Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Verteilung der Tiere auf die Auktionstermine und die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Höfen:

Tab. 3-4 Termine

Auktion	Termin	Tierzahl
1	14.09.2004	10
2	12.10.2004	13
3	09.11.2004	9
4	07.12.2004	16
5	04.01.2005	11
6	01.02.2005	10
7	01.03.2005	15
8	29.03.2005	12
9	26.04.2005	16
10	31.05.2005	17
11	05.07.2005	14
$\Sigma$		<b>143</b>

Tab. 3-5 Verteilung der Tiere jedes Betriebes auf die Auktionstermine

Betrieb	Tierzahl (Termin 1 – Termin 11)											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	Σ
1	3	4		1	3	4	5	2	2	5	3	32
2	2						2		2			6
3	3		1	2			1	1				8
4	2				1		2	1	1			7
5		3										3
6		2							1	1	2	6
7		2		2		3				1	2	10
8		1									2	3
9		1		3	1					1	1	7
10			3									3
11			2	1	1	1		1	2			8
12			2						2	1		5
13			1									1
14				1							1	2
15				6								6
16					2							2
17					3	2		1		2	2	10
18							1		2			3
19							1	2	2	2		7
20							2					2
21							1					1
22								1				1
23								2	1	1	1	5
24								1				1
25										2		2
26									1	1		2

Jedes Tier wurde dreimal beprobt. Zur besseren Übersicht wurde Probenahme 1 „Probenahme Betrieb“ (PB), Probenahme 2 „Probenahme Auktion 1“ (PA1) und Probenahme 3 „Probenahme Auktion 2“ (PA2) benannt. Die erste Probennahme (PB) fand jeweils am Tag vor der Auktion auf dem Ursprungsbetrieb statt.

Probennahme zwei (PA1) und drei (PA2) fanden beide am Tag der Auktion, morgens im Rahmen der Eingangsuntersuchung durch den Auktionstierarzt (ca. 8.00 – 10.00 Uhr) und jeweils nach dem Vorstellen und eventuellem Verkauf der Tiere im Ring (ab 10.00 bis ca. 16.00 Uhr) vor der ersten Melkung statt. Folgende Proben wurden entnommen:

1. Einige Strahlen des Vorgemelks jeden Viertels zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit im Mastitron<sup>®</sup>
2. Ca. 1,5 ml Viertelanfängsgemelk jeden Viertels zur sofortigen Durchführung des CMT (Profilac Reagent, Westfalia Surge, Herdecke)
3. Ca. 10 ml Viertelanfängsgemelk jeden Viertels, steril entnommen, zur kulturellen Untersuchung. Außerdem wurden aus dieser Fraktion die NAGase-Aktivität und der Gehalt an somatischen Zellen in der Fossomatic<sup>®</sup> bestimmt.

#### 3.3.5.2 Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des Automatischen Melkens (VMS<sup>®</sup>)

Die komplette VMS-Herde des Lehr- und Forschungsgutes Ruthe wurde dreimal im Abstand von je drei Wochen über 24 Stunden beprobt (VMS-Versuch). Als Referenzgruppe diente die KON-Herde, die dreimal in wöchentlichem Abstand zur Morgenmelkzeit beprobt wurde (KON-Versuch).

Im Anschluss an den Hauptversuch wurde ein weiterer Versuch am Melkroboter durchgeführt. Hier wurden der CMT und die Messung im DCC<sup>®</sup> allerdings direkt im Melkstand durchgeführt („Cow-side-Versuch“), während im Hauptversuch beides im Labor durchgeführt wurde. Die folgenden Tabellen 3-6 und 3-7 zeigen die Viertel, bzw. Tierzahl in den Versuchen, die Probenahmetermine, die genommenen Proben und deren Verarbeitung:

Tab. 3-6 Probennahmeterminale und beprobte Tiere bzw. Viertel

	Termin 1			Termin 2			Termin 3		
	Datum	Tiere (n)	Viertel (n)	Datum	Tiere (n)	Viertel (n)	Datum	Tiere (n)	Viertel (n)
<b>KON</b>	08.08.05	44	170	15.08.05	42	163	22.08.05	39	150
<b>VMS</b>	27.07.05	93	366	17.08.05	71	279	08.09.05	101	395
<b>Cowside</b>	12.10.05	30	115	19.10.05	37	141	26.10.05	33	127

Tab. 3-7 Proben und deren Verarbeitung

Gemelksfraktion	Parameter	Probengefäß und Volumen im Stall	Volumen
<b>VVG</b>	EL	Mastitron <sup>®</sup> , 2 ml	2 ml
<b>VAG 1*</b>	Bakteriologie	Steriles Reagenzglas mit Silikonstopfen 10 ml	10 µl
	NAGase		1 ml
	DCC <sup>®</sup>		60 µl
	SCC Fossomatic <sup>®</sup>		8 ml
<b>VAG 2*</b>	CMT	Steriles Reagenzglas mit Silikonstopfen 10 ml	1,5 ml
	SCC Fossomatic <sup>®</sup>		8 ml

\*Um das benötigte Volumen sicherzustellen, wurden zwei VAG-Röhrchen ermolken.

### 3.4 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel<sup>®</sup> Version 2003 und SAS Version 8e 2002, SAS Institute Inc., Cary NY durchgeführt.

Folgende Prozeduren wurden zur Auswertung herangezogen:

Tab. 3–8 Prozeduren SAS

Versuch	Ziel der Berechnung	Verwendeter Test	PROC STEP in SAS
Versuch 4.1.1 Einfluss von Ultraschallbehandlung auf das Ergebnis des CMT	Vergleich der CMT- Ergebnisse vor und nach der ersten bzw. zweiten Ultraschall-Behandlung	1-faktorielle Varianzanalyse	PROC GLM
	Vergleich der SCC- Ergebnisse vor und nach der Ultraschallbehandlung	T-Test für gepaarte Beobachtungen	PROC MEANS
Versuch 4.1.2 Vergleich der Reaktion von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten mit dem CMT- Reagenz	Bestimmung von $\bar{X}$ und std		PROC UNIVARIATE
	Vergleich der CMT- Ergebnisse von LYM und PMN	t-Test für gepaarte Beobachtungen	PROC UNIVARIATE
Versuch 4.1.3 Zellvitalität	Bestimmung von $\bar{X}$ und std		PROC MEANS
	Vergleich des Verhältnisses tote/vitale PMN in jedem CMT-Score und jeder Zellgehaltsgruppe	1-fakt.-Varianzanalyse	PROC GLM
Versuch 4.1.4 Reagenzien verschiedener Hersteller	Bestimmung von $\bar{X}$ und std		PROC UNIVARIATE
	Berechnung der Korrelationen der CMT- Ergebnisse der verschiedenen Reagenzien mit SCC	Korrelationskoeffizient nach Spearman	PROC CORR
	Vergleich der diagnostischen Sicherheit der verschiedenen CMT- Tests mit SCC		PROC FREQ
	Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen der verschiedenen Reagenzien		PROC GLM

Versuch	Ziel der Berechnung	Verwendeter Test	PROC STEP in SAS
Versuch 4.2.1 Eutergesundheit von Auktionstieren	Bestimmung von $\bar{X}$ und std		PROC UNIVARIATE
	Entwicklung der Parameter im Laufe der drei Probenahmen	1-faktorielle Varianzanalyse	PROC GLM
	Vergleich der diagnostischen Sicherheit der einzelnen Parameter mit SCC		PROC FREQ
	Korrelationen von SCC mit den übrigen Parametern	Korrelationskoeffizient nach Spearman	PROC CORR
	Vergleich der MI-Gruppen in den ZMZ	1-faktorielle Varianzanalyse	PROC GLM
	Vergleich der ZMZ mit wechselndem MI	1-faktorielle Varianzanalyse	PROC GLM
	Vergleich der ZMZ mit gleichbleibendem MI	1-faktorielle Varianzanalyse	PROC GLM
Versuch 4.2.2 Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des CMT und weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse	Bestimmung von $\bar{X}$ und std		PROC UNIVARIATE
	Korrelationen von SCC mit den übrigen Parametern	Korrelationskoeffizient nach Spearman	PROC CORR
	Vergleich der diagnostischen Sicherheit der einzelnen Parameter mit SCC		PROC FREQ
	Vergleich der Ergebnisse für $LOG_{SCC}$ und CMT zwischen den MI-Gruppen für VMS und Cowside	1-faktorielle Varianzanalyse	PROC GLM

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte optisch unter Annahme einer grenzwertigen Schiefe von  $\pm 2,0$ . Parameter, die keine Normalverteilung aufwiesen, wurden mit dem Logarithmus zur Basis 10 transformiert und erneut geprüft (SACHS 1993).

## **4 Ergebnisse**

Folgende Fragestellungen zu Wirkungsmechanismus, möglichen Einflussfaktoren und Aussagefähigkeit, vor allem im Einsatz auf Auktionen, wurden bearbeitet:

In den Laborversuchen wurden die Einflussfaktoren Zellvitalität (Versuch 4.1.3), Zellfraktion (Versuch 4.1.2), Wahl des Test-Reagenzes (Versuch 4.1.4) und Zustand der Probe, bzw. Zustand der somatischen Zellen in der Probe (Versuch 4.1.1), untersucht.

Im Rahmen des Feldversuches 4.2.1 erfolgten anschließend der Einsatz und die Beurteilung des CMT unter Auktionsbedingungen.

Zum Vergleich des CMT mit anderen Parametern zum Entzündungsnachweis bzw. zur Erfassung der Anwendbarkeit bei konventionell bzw. automatisch gemolkenen Tieren schloss sich Feldversuch 4.2.2 an.

### **4.1 Laborversuche**

#### **4.1.1 Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT**

Die 20 Milchproben wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 3-3 (Material und Methoden) behandelt. Zum besseren Verständnis werden in der nachfolgenden Tabelle 4-1 die aus der Behandlung der Proben resultierenden Bezeichnungen erklärt.

Tab. 4-1 Vergabe der Bezeichnungen

CMT	CMT-Score der unbehandelten Proben
CMT_US1	CMT-Score der Proben nach einmaliger Ultraschallbehandlung
CMT_US2	CMT-Score der Proben nach zweimaliger Ultraschallbehandlung
SCC	Somatische Zellen (x 1000) pro ml (Fossomatic)
LOG <sub>SCC</sub>	Somatische Zellen LOG 10
SCC_US2	Somatische Zellen (x 1000) pro ml in den Proben nach zweimaliger Ultraschallbehandlung
LOG <sub>SCC_US2</sub>	Logarithmus zur Basis 10 der SCC_US2
CMTDIFF1	CMT – CMT_US1
CMTDIFF2	CMT – CMT_US2
CMTDIFF3	CMT_US1 – CMT_US2

Die Abbildungen 4-1 und 4-2 geben den mittleren CMT-Score bzw. Zellgehalt der Proben vor und nach den Behandlungen wieder.

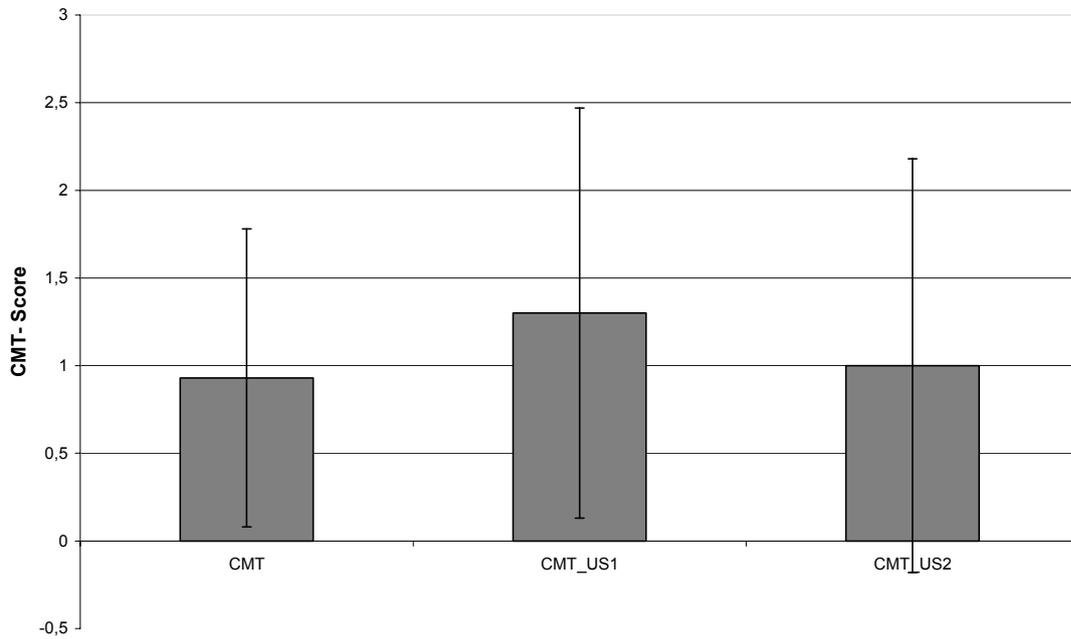


Abb. 4-1 Mittelwerte  $\pm$  std der CMT-Ergebnisse von CMT, CMT\_US1 und CMT\_US2 (n = 20)

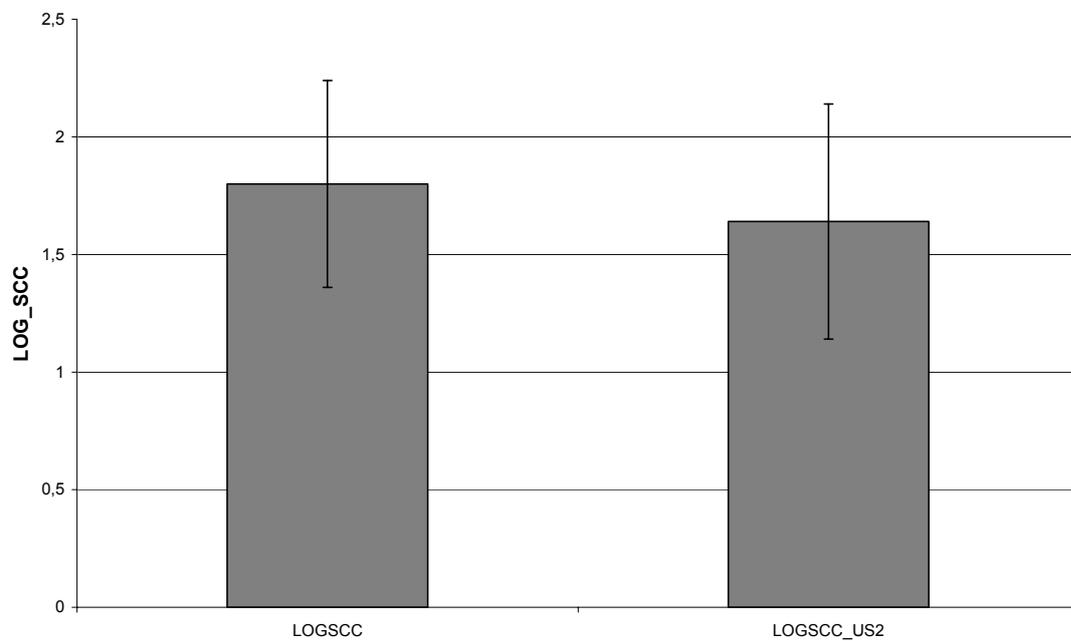


Abb. 4-2 Mittelwerte  $\pm$  std der logarithmierten Zellzahlergebnisse (LOG<sub>SCC</sub> und LOG<sub>SCC\_US2</sub>) (n = 20)

Um die in den Abbildungen 4-1 und 4-2 angedeuteten Unterschiede in CMT-Score bzw. SCC statistisch zu überprüfen, erfolgte der Datenvergleich über 1-faktorielle Varianzanalyse (PROC GLM) bzw. T-Test (PROC MEANS, verbundene Stichproben). Die nachfolgende Tabelle 4-2 gibt die Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen wieder.

Tab. 4-2 Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen (n = 20) vor und nach den Behandlungen mit Ultraschall

Differenzen	Signifikanz
<b>CMTDIFF 1 (CMT – CMT_US1)</b>	**
<b>CMTDIFF 2 (CMT – CMT_US2)</b>	ns
<b>CMTDIFF 3 (CMT_US1 – CMT_US2)</b>	**

ns = nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ), \*\* =  $p < 0,01$

Die Signifikanzen zwischen den SCC-Ergebnissen (SCC und  $\text{LOG}_{\text{SCC}}$ ) sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst (berechnet als gepaarte Stichprobe mittels T-Test (Proc means)):

Tab. 4-3 Signifikanzen zwischen den SCC-Ergebnissen (n = 20)

Differenzen	Signifikanz
<b>SCCDIFF (SCC – SCC_US2)</b>	***
<b><math>\text{LOG}_{\text{SCC}}</math>DIFF (<math>\text{LOG}_{\text{SCC}}</math> – <math>\text{LOG}_{\text{SCC\_US2}}</math>)</b>	***

\*\*\* =  $p < 0,001$

#### 4.1.2 Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten mit dem CMT- Reagenz

Um abzuklären, ob die CMT-Reaktion an eine bestimmte Zellart gebunden ist oder mit einer bestimmten Zellfraktion stärker reagiert, sollte in diesem Versuch die CMT-Reaktion von neutrophilen Granulozyten (PMN) mit der von Lymphozyten (LYM) in jeweils gleicher Zellkonzentration pro ml verglichen werden.

Hierzu wurden Blutproben von sechs verschiedenen Rindern gewonnen, ein Teil des Blutes jedes Rindes in heparinisierten Röhrchen zur Lymphozytengewinnung, der andere Teil in mit EDTA versetzten Röhrchen zur Gewinnung von PMN. Anschließend wurden aus dem Blut der sechs Tiere die Lymphozyten bzw. PMN extrahiert. Die gewonnenen Zellsuspensionen dienten der Herstellung von Verdünnungsreihen (Tabelle 4-4), wobei die Konzentrationsstufen so gewählt wurden, dass sie das gesamte Spektrum des CMT von CMT-Score „0“ bis CMT-Score „5“ abdeckten.

Tab. 4-4 Konzentrationsstufen

Stufe	Konzentration LYM bzw. PMN (Zellen/ml)
0	10.000
0,5	20.000
1	60.000
2	180.000
3	400.000
4	960.000
5	3.000.000

Abbildung 4-3 gibt Mittelwerte und Standardabweichungen der CMT-Ergebnisse von PMN und LYM jeder Stufe wieder.

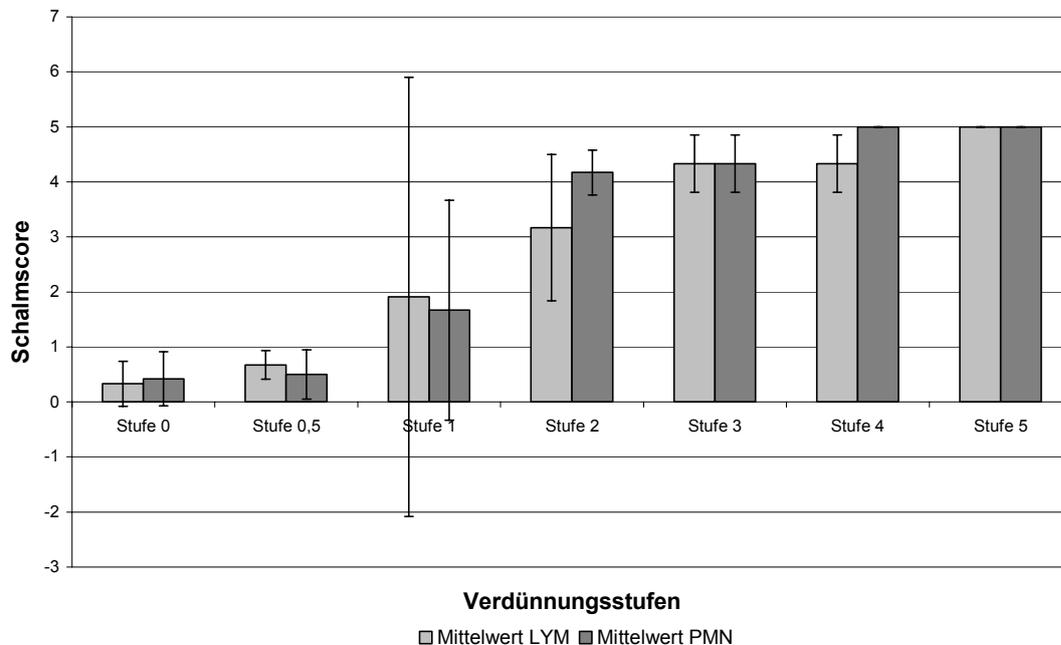


Abb. 4-3 Vergleiche der gemittelten CMT-Ergebnisse von LYM und PMN der verschiedenen Stufen

Zur statistischen Absicherung wurden die Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen von LYM und PMN jeder Stufe mittels T-Test berechnet und in Tabelle 4-5 aufgeführt.

In keiner Stufe war demnach ein signifikanter Unterschied zwischen dem CMT-Ergebnis von LYM und PMN erkennbar.

Tab. 4-5 Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz der Mittelwerte der CMT-Ergebnisse

Verdünnungs- Stufen	CMT-Ergebnisse (n = 6)		Signifikanzen zwischen $\bar{X}$ LYM und $\bar{X}$ PMN
	LYM $\bar{X} \pm \text{std}$	PMN $\bar{X} \pm \text{std}$	
<b>0</b>	<b>0,33</b> $\pm$ 0,41	<b>0,42</b> $\pm$ 0,49	ns
<b>0,5</b>	<b>0,67</b> $\pm$ 0,26	<b>0,5</b> $\pm$ 0,45	ns
<b>1</b>	<b>1,91</b> $\pm$ 3,99	<b>1,67</b> $\pm$ 2,00	ns
<b>2</b>	<b>3,17</b> $\pm$ 1,33	<b>4,17</b> $\pm$ 0,41	ns
<b>3</b>	<b>4,33</b> $\pm$ 0,52	<b>4,33</b> $\pm$ 0,52	ns
<b>4</b>	<b>4,33</b> $\pm$ 0,52	<b>5,00</b> $\pm$ 0,00	ns
<b>5</b>	<b>5,00</b> $\pm$ 0,00	<b>5,00</b> $\pm$ 0,00	ns

$\bar{X}$  = Mittelwert, std = Standardabweichung, ns = nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ )

#### 4.1.3 Zellvitalität

Es wurden 191 Viertel beprobt (48 Tiere, davon ein Dreistrich). Nach Feststellung der elektrischen Leitfähigkeit aus dem Viertelvorgemelk erfolgte die Gewinnung einer sterilen Viertelanfängsgemelksprobe für die zyto-bakteriologische Untersuchung. Anschließend wurde aus jedem Viertel ein Viertelhandgemelk von ca. 50 ml gezogen. Aus dem Viertelhandgemelk wurden die Zellen zur Vitalitätsmessung im FACS gewonnen. Tabelle 4-6 enthält Mittelwerte und Standardabweichungen der zyto-biochemischen Parameter.

Tab. 4-6 Mittelwerte und Standardabweichungen der zyto-biochemischen Parameter

Parameter (n = 191 Viertel)	$\bar{X}$	std
EL (mS/cm)	6,66	1,17
LOG <sub>EL</sub> (mS/cm)	0,79	0,07
CMT	1,77	1,84
SCC (*10 <sup>3</sup> /ml)	427,08	1012,92
LOG <sub>SCC</sub>	4,90	0,88

Eine Zuordnung der Score-Werte auf einen mittleren Zellgehalt ist Tabelle 4-7 zu entnehmen.

Tab. 4-7 CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt im Versuch Zellvitalität

CMT-Score	0	0,5	1	2	3	4	5
n = 191	52	44	18	5	21	30	21
$\bar{X}$ SCC *10 <sup>3</sup> /ml	15,75	43,55	411,44	196,40	305,38	630,23	2558,33
std	20,86	75,31	1133,56	159,68	297,08	886,30	2413,99

Zunächst wurden die Proben anhand ihres Zellgehalts/ml in drei Gruppen aufgeteilt (Tabelle 4-8).

Tab. 4-8 Zellgehalts-Gruppen im Rahmen der Zellvitalitätsbestimmung

Gruppen	Zellgehalt/ml	n
Gruppe 1	< 25.000	66
Gruppe 2	≥ 25.000 und < 200.000	62
Gruppe 3	≥ 200.000	63

Nach der Ermittlung des Verhältnisses vitaler zu toter PMN (Mittelwerte) für jeden CMT-Score wurden innerhalb der drei Gruppen, mittels PROC GLM (Varianzanalyse), die Mittelwerte vitaler bzw. toter PMN jedes CMT-Scores verglichen. Hierbei konnten in keiner der drei Zellgehalts-Gruppen signifikante Unterschiede der Zellvitalität zwischen den einzelnen CMT-Scores gefunden werden. Tabelle 4-9 gibt den mittleren Anteil vitaler PMN in jeder Zellgehaltsgruppe und für jeden CMT-Score wieder. Die REGWQ-Gruppierung zeigt anhand gleicher Buchstaben, dass keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Tab. 4-9 Relative Anteile vitaler PMN in den Zellgehalts-Gruppen, aufgeteilt nach CMT-Score

SCC-Gruppe	CMT	n	Mittelwerte Anteil vitaler PMN	REGWQ Gruppierung
<b>1</b> <b>&lt; 25.000</b>	0	42	20,15	A
	0,5	22	34,76	A
	1	1	3,59	A
<b>2</b> <b>≥ 25.000</b> <b>und &lt; 200.000</b>	0	9	20,13	A
	0,5	21	33,63	A
	1	13	40,52	A
	2	3	37,01	A
	3	9	35,37	A
	4	7	39,16	A
<b>3</b> <b>≥ 200.000</b>	0,5	1	61,17	A
	1	4	56,75	A
	2	2	24,46	A
	3	12	43,45	A
	4	23	45,46	A
	5	21	48,18	A

#### 4.1.4 Reagenzien verschiedener Hersteller

Es wurden 359 VGH jeweils mit fünf verschiedenen CMT-Reagenzien geschalmt und die Ergebnisse verglichen.

Zum Vergleich wurden fünf Zellgehaltsgruppen gebildet (Tabelle 4-10):

Tab. 4-10 Zellgehaltsgruppen der VGH (n = 359 Proben)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
<b>SCC *10<sup>3</sup>/ml</b>	1 – 50	51 – 100	101 – 200	201 – 400	> 400
<b>n (Anzahl der Proben)</b>	200	38	41	41	39

Tabelle 4-11 gibt Mittelwerte und Standardabweichungen der elektrischen Leitfähigkeit (EL), der logarithmierten elektrischen Leitfähigkeit, der CMT-Ergebnisse (Reagenz A, B, C, D, E) der Zellgehaltsbestimmung (SCC) und des logarithmierten Zellgehalts (LOG<sub>SCC</sub>) wieder:

Tab. 4-11 Mittelwert und Standardabweichung für elektrische Leitfähigkeit, CMT- und Zellgehaltsbefunden

CMT-Reagenzien	SCC-Gruppe: SCC *10 <sup>3</sup> /ml	SCC-Gruppe 1: 1-50 (n = 200)	SCC-Gruppe 2: 51 – 100 (n = 38)	SCC-Gruppe 3: 101 – 200 (n = 41)	SCC-Gruppe 4: 201 – 400 (n = 41)	SCC-Gruppe 5: >400 (n = 39)	Gesamt (n = 359)
	$\bar{X} \pm \text{std}$						
<b>A</b>		<b>0,64 ± 0,77</b>	<b>1,97 ± 1,42</b>	<b>3,32 ± 1,12</b>	<b>3,74 ± 1,1</b>	<b>4,55 ± 1,07</b>	<b>1,87 ± 1,79</b>
<b>B</b>		<b>0,58 ± 0,75</b>	<b>1,75 ± 1,36</b>	<b>2,58 ± 1,44</b>	<b>3,15 ± 1,31</b>	<b>4,28 ± 0,92</b>	<b>1,63 ± 1,66</b>
<b>C</b>		<b>0,57 ± 0,69</b>	<b>1,80 ± 1,35</b>	<b>2,59 ± 1,32</b>	<b>3,07 ± 1,45</b>	<b>4,53 ± 1,00</b>	<b>1,65 ± 1,69</b>
<b>D</b>		<b>0,35 ± 0,58</b>	<b>0,79 ± 0,79</b>	<b>1,16 ± 1,4</b>	<b>1,82 ± 1,67</b>	<b>3,19 ± 1,73</b>	<b>0,96 ± 1,39</b>
<b>E</b>		<b>0,78 ± 0,98</b>	<b>2,64 ± 1,38</b>	<b>3,66 ± 1,04</b>	<b>4,51 ± 0,64</b>	<b>4,85 ± 0,54</b>	<b>2,17 ± 1,92</b>
<b>SCC (*10<sup>3</sup>/ml)</b>		<b>14,78 ± 11,30</b>	<b>75,55 ± 13,6</b>	<b>144,15 ± 29,14</b>	<b>296,95 ± 61,7</b>	<b>1577,44 ± 1471,53</b>	<b>237,97 ± 676,71</b>
<b>LOG<sub>SCC</sub></b>		<b>4,04 ± 0,36</b>	<b>4,87 ± 0,08</b>	<b>5,15 ± 0,09</b>	<b>5,46 ± 0,09</b>	<b>6,04 ± 0,36</b>	<b>4,63 ± 0,79</b>
<b>EL (mS/cm)</b>		<b>5,97 ± 0,47</b>	<b>6,48 ± 0,94</b>	<b>6,62 ± 0,87</b>	<b>6,61 ± 0,66</b>	<b>7,45 ± 1,5</b>	<b>6,33 ± 0,9</b>
<b>LOG<sub>EL</sub> (mS/cm)</b>		<b>0,77 ± 0,03</b>	<b>0,81 ± 0,06</b>	<b>0,82 ± 0,05</b>	<b>0,82 ± 0,04</b>	<b>0,86 ± 0,08</b>	<b>0,80 ± 0,06</b>

A, B, C, D, E = CMT-Reagenzien

Mit Zunahme des Zellgehalts je Zellgehaltsgruppe ergeben auch die CMT-Scores der verschiedenen Reagenzien einen höheren Wert. Zur statistischen Absicherung möglicher Reagenzienunterschiede wurden die Reagenzienscores in Tabelle 4-12 miteinander verglichen.

Tab. 4-12 Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen der verschiedenen Reagenzien unter Berücksichtigung des Zellgehalt-niveaus

Differenzen der Reagenzien	SCC-Gruppe 1: 1-50 *10 <sup>3</sup> /ml (n = 200)	SCC-Gruppe 2: 51 – 100 *10 <sup>3</sup> /ml (n = 38)	SCC-Gruppe 3: 101 – 200 *10 <sup>3</sup> /ml (n = 41)	SCC-Gruppe 4: 201 – 400 *10 <sup>3</sup> /ml (n = 41)	SCC-Gruppe 5: >400 *10 <sup>3</sup> /ml (n = 39)	Gesamt (n = 359)
A – B	ns	ns	**	***	*	***
A – C	ns	ns	**	***	ns	***
A – D	***	***	***	***	***	***
A – E	*	***	ns	***	*	***
B – C	ns	ns	ns	ns	*	ns
B – D	***	***	***	***	***	***
B – E	**	***	***	***	***	***
C – D	***	***	***	***	***	***
C – E	***	***	**	***	**	***
D – E	***	***	***	***	***	***

Ns = nicht signifikant, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001; A, B, C, D, E = CMT-Reagenzien

Zur Vereinfachung der Einordnung der CMT-Score-Mittelwerte der verschiedenen Produkte, wird im Folgenden je Produkt eine Zuordnung der Scorewerte auf den mittleren Zellgehaltswert durchgeführt (Tabellen 4-13 bis 4-17).

Tab. 4-13 CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz A

CMT-Score	0	0,5	1	2	3	4	5	6
n = 359	65	81	62	23	32	51	42	2
$\bar{X}$ SCC *10 <sup>3</sup> /ml	14,03	26,73	51,37	84,61	165,69	333,2	1123,38	3866,5
std	17,78	64,91	126,07	73,63	104,53	367,28	1428,62	77,5

Tab. 4-14 CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz B

CMT-Score	0	0,5	1	2	3	4	5	6
n = 359	63	109	56	18	35	51	25	1
$\bar{X}$ SCC *10 <sup>3</sup> /ml	15,17	25,9	70,23	219,89	315,74	433,31	1472,32	3789
std	21,28	49,77	66,48	234,29	656,67	509,7	1691,74	0

Tab. 4-15 CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz C

CMT-Score	0	0,5	1	2	3	4	5	6
n = 359	56	113	64	17	33	38	36	1
$\bar{X}$ SCC *10 <sup>3</sup> /ml	12,25	31,94	71	95,82	252,12	333,47	1393,64	3789
std	13,08	71,65	73,61	85,05	185,45	439,02	1523,47	0

Tab. 4-16 CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz D

CMT-Score	0	0,5	1	2	3	4	5	6
n = 359	141	88	64	12	12	26	13	1
$\bar{X}$ SCC *10 <sup>3</sup> /ml	43,98	136,35	143,84	451,83	717,39	622,89	1788,46	3789
std	81,76	424,27	272,51	493,16	1156,26	863,85	1852,89	0

Tab. 4-17 CMT-Score und korrespondierender Zellgehalt für Reagenz E

CMT-Score	0	0,5	1	2	3	4	5	6
n = 359	54	84	49	15	37	48	70	1
$\bar{X}$ SCC *10 <sup>3</sup> /ml	11,72	12,72	30,63	62,5	122,27	237,08	879,81	3789
std	13,76	12,32	27,24	44,61	106,81	382,14	1223,79	0

Die folgenden Abbildungen 4-4 bis 4-8 zeigen die absolute Häufigkeit der ermittelten CMT-Scores in den einzelnen Zellgehaltsgruppen – getrennt nach Reagenzien. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der Zellgehaltsgruppe 1 unabhängig von der Y-Achse mit ihrem tatsächlichen Wert beschriftet und „verkürzt“ dargestellt.

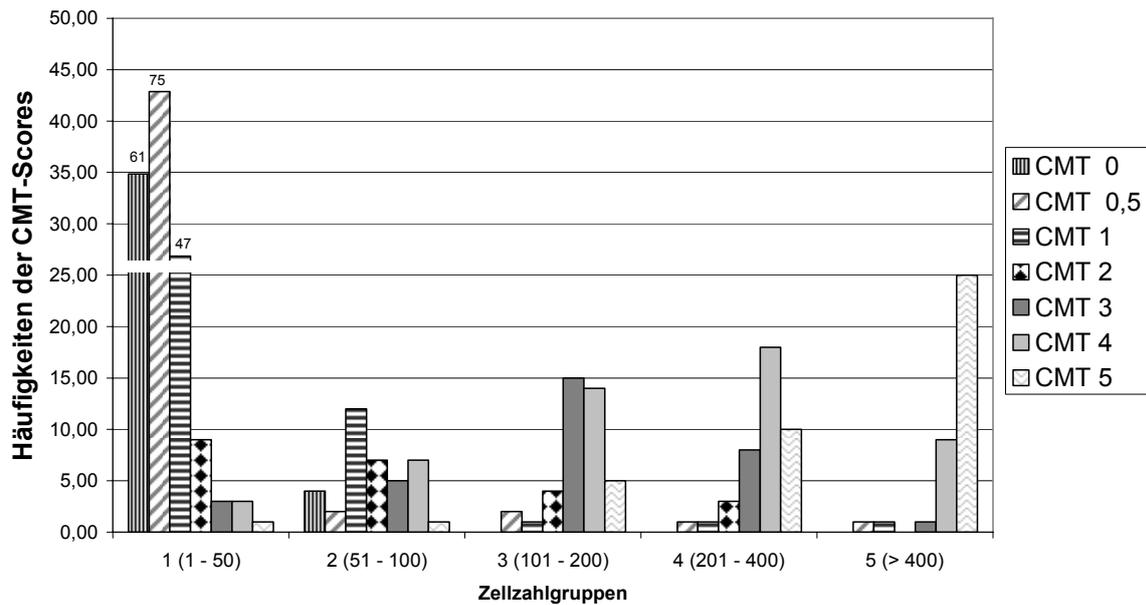


Abb. 4-4 Häufigkeitsverteilungen ermittelter CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz A (n = 359 Proben)

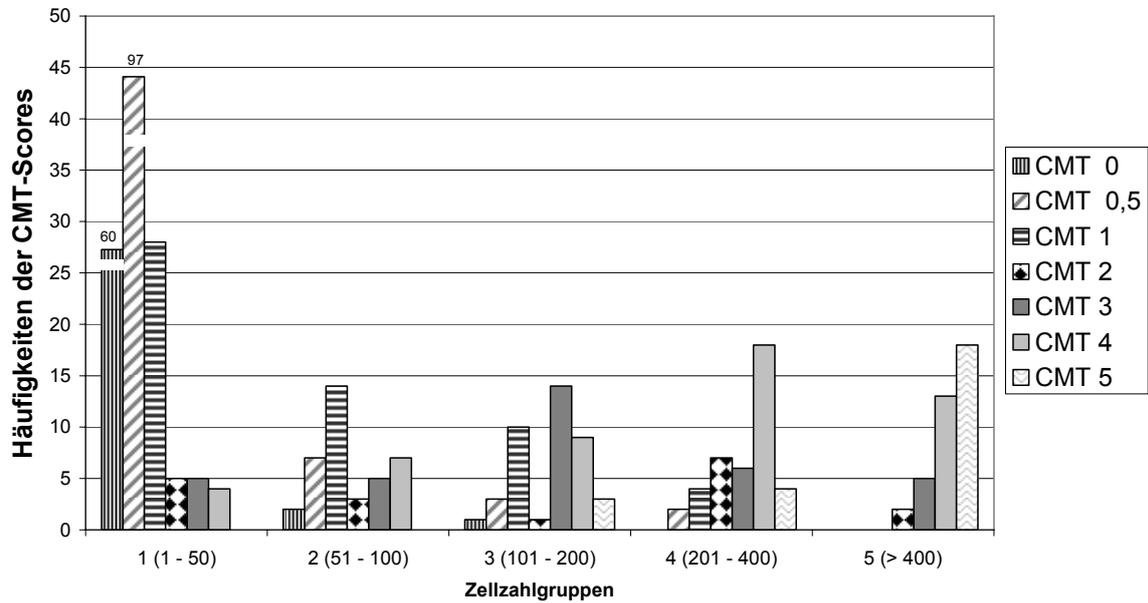


Abb. 4-5 Häufigkeitsverteilungen ermittelter CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz B (n = 359 Proben)

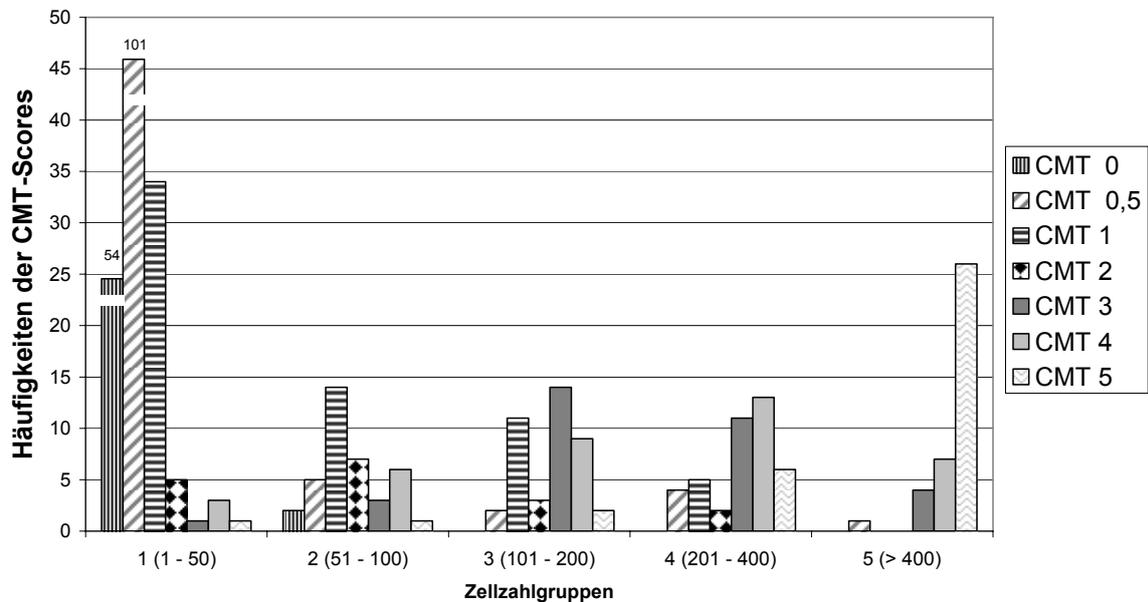


Abb. 4-6 Häufigkeitsverteilungen ermittelter CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz C (n = 359 Proben)

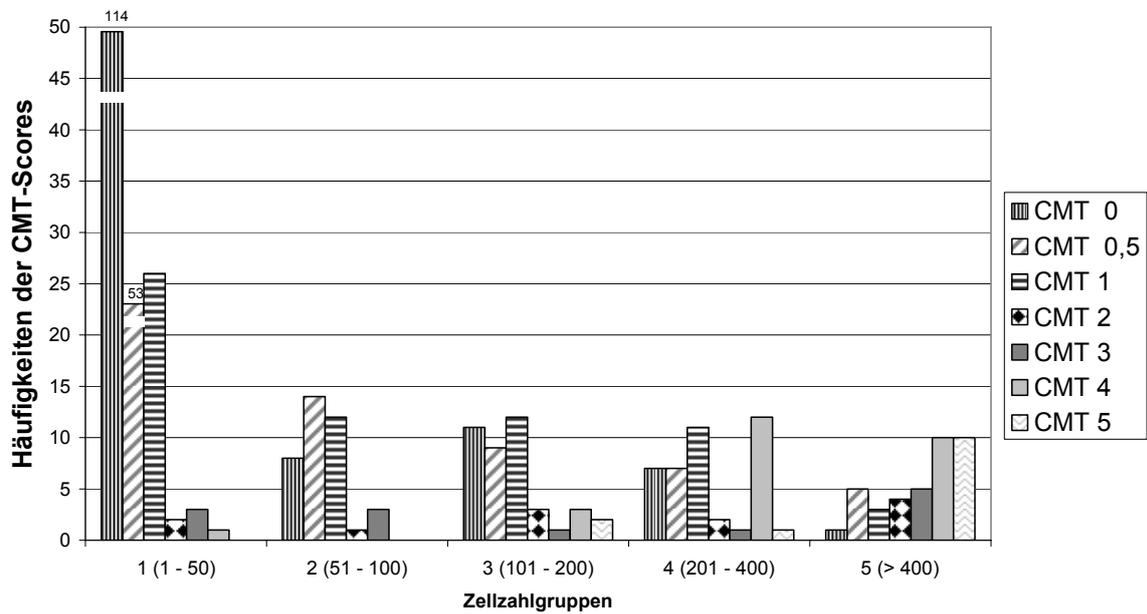


Abb. 4-7 Häufigkeitsverteilungen ermittelter CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz D (n = 359 Proben)

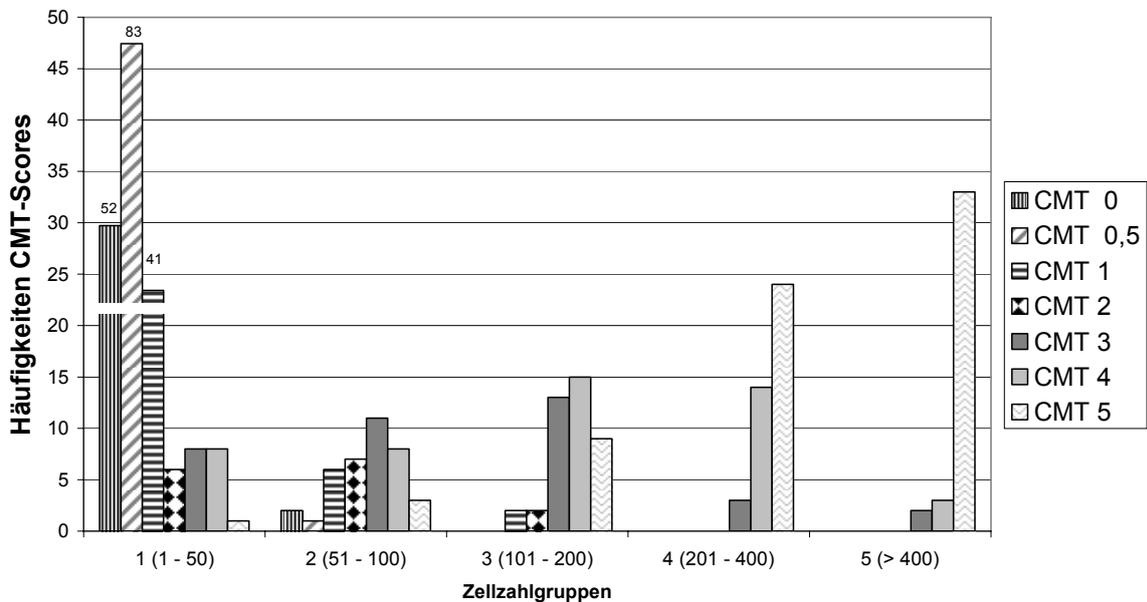


Abb. 4-8 Häufigkeitsverteilungen ermittelter CMT-Scores je Zellgehaltsgruppe, Reagenz E (n = 359 Proben)

Abbildung 4-9 zeigt die CMT-Ergebnisse (Mittelwerte) der Reagenzien A-E für alle Zellzahlgruppen, in Abbildung 4-10 sind die CMT-Ergebnisse nach Zellzahlgruppen und unter gleichzeitiger Angabe des mittleren Zellgehalts je Gruppe aufgeteilt dargestellt.

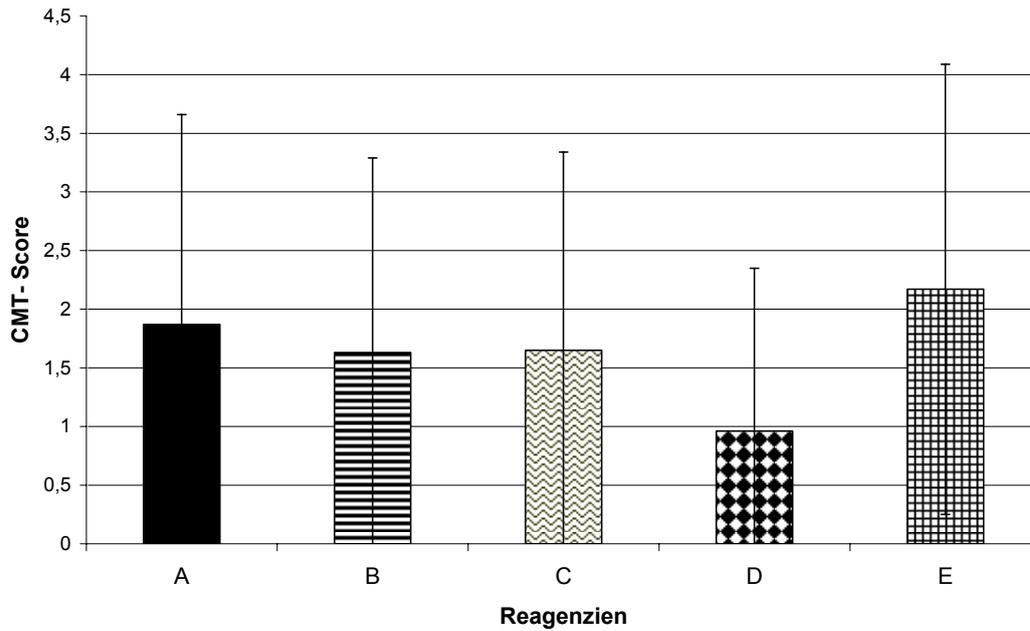


Abb. 4-9 CMT-Ergebnisse (Mittelwerte  $\pm$  std) der Reagenzien (alle Zellzahlgruppen) n= 359

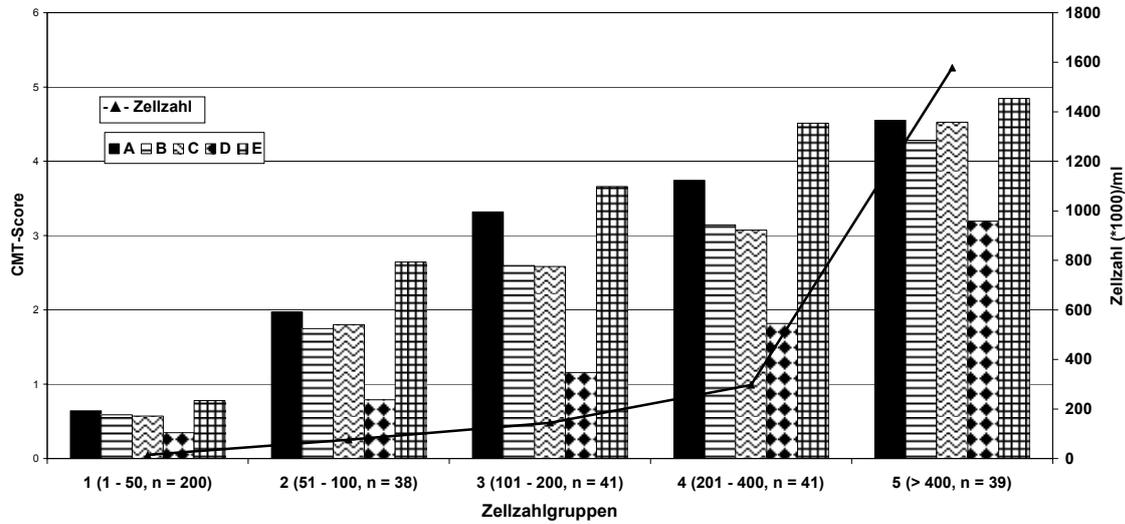


Abb. 4-10 Mittelwerte der Reagenzien in den verschiedenen Zellzahlgruppen bei gleichzeitiger Darstellung des mittleren Zellgehalts (n = 359 Proben)

Um darzustellen, welche CMT-Ergebnisse der verschiedenen Reagenzien am stärksten mit dem Zellgehalt korrelieren, wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Tabelle 4-18 enthält die Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Reagenzien sowohl für alle Proben, als auch aufgeteilt in die Zellgehaltsgruppen:

Tab. 4-18 Korrelationskoeffizienten (Spearman) der CMT-Ergebnisse mit dem Zellgehalt (SCC) (n = 359 Proben)

Produkt	Gesamt	SCC-Gruppe 1: 1 – 50 *10 <sup>3</sup> /ml	SCC-Gruppe 2: 51 – 100 *10 <sup>3</sup> /ml	SCC-Gruppe 3: 101 – 200 *10 <sup>3</sup> /ml	SCC-Gruppe 4: 201 – 400 *10 <sup>3</sup> /ml	SCC-Gruppe 5: >400 *10 <sup>3</sup> /ml
Reagenz A	0,82 p < 0,0001	0,45 p < 0,0001	0,34 p = 0,0388	<b>0,49</b> p = 0,0012	0,14 p = 0,3777	0,31 p = 0,0578
Reagenz B	0,79 p < 0,0001	0,4 p < 0,0001	0,14 p = 0,4105	0,29 p = 0,0643	0,14 p = 0,3818	0,17 p = 0,2984
Reagenz C	0,8 p < 0,0001	0,41 p < 0,0001	<b>0,37</b> p = 0,0214	0,34 p = 0,0276	0,19 p = 0,2457	<b>0,40</b> p = 0,0125
Reagenz D	0,6 p < 0,0001	0,29 p < 0,0001	0,28 p = 0,0916	0,02 p = 0,8863	0,11 p = 0,4741	0,25 p = 0,1267
Reagenz E	<b>0,86</b> p < 0,0001	<b>0,51</b> p < 0,0001	0,29 p = 0,0803	0,24 p = 0,1279	<b>0,23</b> p = 0,1473	0,21 p = 0,2099

Die höchsten Korrelationen je Zellgehaltsgruppe sind jeweils fettgedruckt und grau unterlegt.

Zur Darstellung der diagnostischen Sicherheit (Sensitivität, Spezifität und Youden-Index) des CMT in Abhängigkeit der verschiedenen Reagenzien, wurde eine Vierfelder-Tafel, nach dem Schema aus Tabelle 4-19, mittels PROC FREQ erstellt.

Tab. 4-19 Auswertungsschema zur Berechnung der „Vier-Felder-Korrelation“ (Vierfeldertafel)

Vierfeldertafel		SCC	
		SCC < 100.00/ml	SCC ≥ 100.000/ml
CMT	CMT ≤ 0,5	„Richtig negativ“	„Falsch negativ“
	CMT > 0,5	„Falsch positiv“	„Richtig positiv“

Tab. 4-20 Vierfeldertafel für die verschiedenen Reagenzien

Diagnose\Produkt	Reagenz A	Reagenz B	Reagenz C	Reagenz D	Reagenz E
„richtig positiv“ (n = 121)	117 (96,69%)	115 (95,04%)	114 (94,21%)	81 (66,94%)	121 (100%)
„falsch positiv“	95 (39,92%)	71 (29,83%)	75 (31,51%)	48 (20,17%)	99 (41,6%)
„richtig negativ“ (n = 238)	143 (60,08%)	167 (70,17%)	163 (68,49%)	190 (79,83%)	139 (58,4%)
„falsch negativ“	4 (3,31%)	6 (4,96%)	7 (5,79%)	40 (33,06%)	0 (0%)
<b>Sensitivität (%)</b>	96,69	95,04	94,21	66,94	100
<b>Spezifität (%)</b>	60,08	70,17	68,49	79,83	58,4
<b>Youden-Index (%)</b>	56,77	65,21	62,7	46,77	58,4

## **4.2 Feldversuche**

### **4.2.1 Eutergesundheit von Auktionstieren**

Insgesamt wurden 568 Viertel an verschiedenen Terminen (s. Material und Methoden) dreimalig beprobt. Da auf den Auktionen der Osnabrücker Herdbuchgesellschaft zur Prüfung auf Eutergesundheit der CMT genutzt wird, sollte in diesem Versuch untersucht werden, mit welcher Sensitivität und Spezifität der CMT Viertel mit erhöhtem Zellgehalt ( $>100.000/\text{ml}$ ) anzeigt. Als Referenz diente in diesem Versuch die Zellzahl/ml gemessen in der Fossomatic<sup>®</sup>. Weitere gemessene Parameter waren elektrische Leitfähigkeit und NAGase-Aktivität. Zur Unterscheidung der Werte aus den drei verschiedenen Probenahmen wurde jeweils an den Namen des Parameters das Kürzel der Probenahme angehängt (\_PB, \_PA1 oder \_PA2), während die einzelnen Probenahmen als PB (Probenahme Betrieb), PA1 (Probenahme Auktion 1) und PA2 (Probenahme Auktion 2) bezeichnet wurden. Tabelle 4-21 enthält Mittelwerte und Standardabweichungen der zyto-biochemischen Parameter für jede Probenahme.

Tab. 4-21 Mittelwert und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter für jede Probenahme (PB, PA1, PA2)

Parameter\Probenahme n = 568	PB	PA1	PA2	Tendenz
<b>Elektrische Leitfähigkeit [mS/cm]</b>	<b>EL_PB</b>	<b>EL_PA1</b>	<b>EL_PA2</b>	
$\bar{X} \pm \text{std}$	5,67 ± 0,52	5,76 ± 0,46	5,97 ± 0,53	↑
<b>LOG<sub>EL</sub> [mS/cm]</b>	<b>LOG<sub>EL</sub>_PB</b>	<b>LOG<sub>EL</sub>_PA1</b>	<b>LOG<sub>EL</sub>_PA2</b>	
$\bar{X} \pm \text{std}$	0,75 ± 0,04	0,76 ± 0,03	0,77 ± 0,04	↑
<b>CMT-Score</b>	<b>CMT_PB</b>	<b>CMT_PA1</b>	<b>CMT_PA2</b>	
$\bar{X} \pm \text{std}$	0,77 ± 1,32	0,48 ± 0,97	0,62 ± 1,13	↕
<b>NAGase [mmol*ml<sup>-1</sup>*min<sup>-1</sup>]</b>	<b>NAG_PB</b>	<b>NAG_PA1</b>	<b>NAG_PA2</b>	
$\bar{X} \pm \text{std}$	2,09 ± 1,95	1,81 ± 1,46	1,75 ± 1,31	↓
<b>LOG<sub>NAGase</sub></b>	<b>LOG<sub>NAG</sub>_PB</b>	<b>LOG<sub>NAG</sub>_PA1</b>	<b>LOG<sub>NAG</sub>_PA2</b>	
$\bar{X} \pm \text{std}$	0,20 ± 0,33	0,15 ± 0,31	0,16 ± 0,28	↕
<b>SCC * 10<sup>3</sup>/ml</b>	<b>SCC_PB</b>	<b>SCC_PA1</b>	<b>SCC_PA2</b>	
$\bar{X} \pm \text{std}$	69,3 ± 287,06	50,47 ± 316,34	55,7 ± 339,43	↕
<b>LOGSCC</b>	<b>LOGSCC_PB</b>	<b>LOGSCC_PA1</b>	<b>LOGSCC_PA2</b>	
$\bar{X} \pm \text{std}$	4,13 ± 0,62	3,81 ± 0,72	3,92 ± 0,69	↕

Die Mittelwerte der zyto-biochemischen Parameter sind in den folgenden Abbildungen 4-11 bis 4-14 aufgetrennt nach Probenahmen dargestellt.

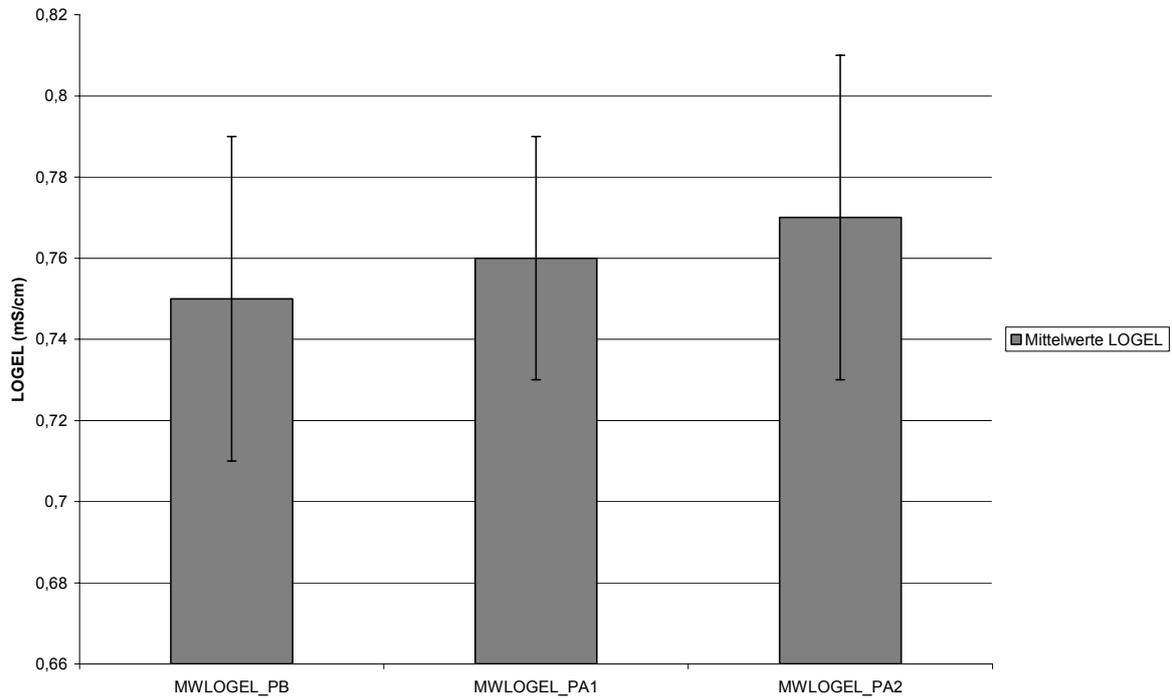


Abb.4-11 Mittelwerte der elektrischen Leitfähigkeit (logarithmiert) (n = 568 Proben)

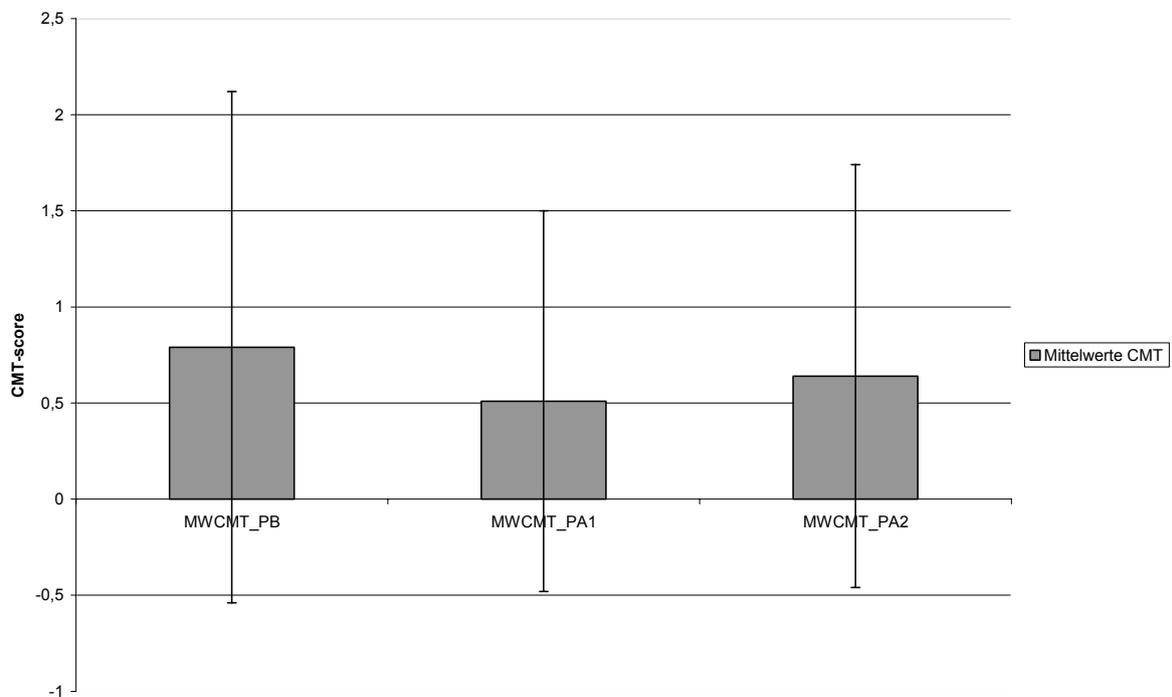


Abb.4-12 Mittelwerte der CMT-Ergebnisse (n = 568 Proben)

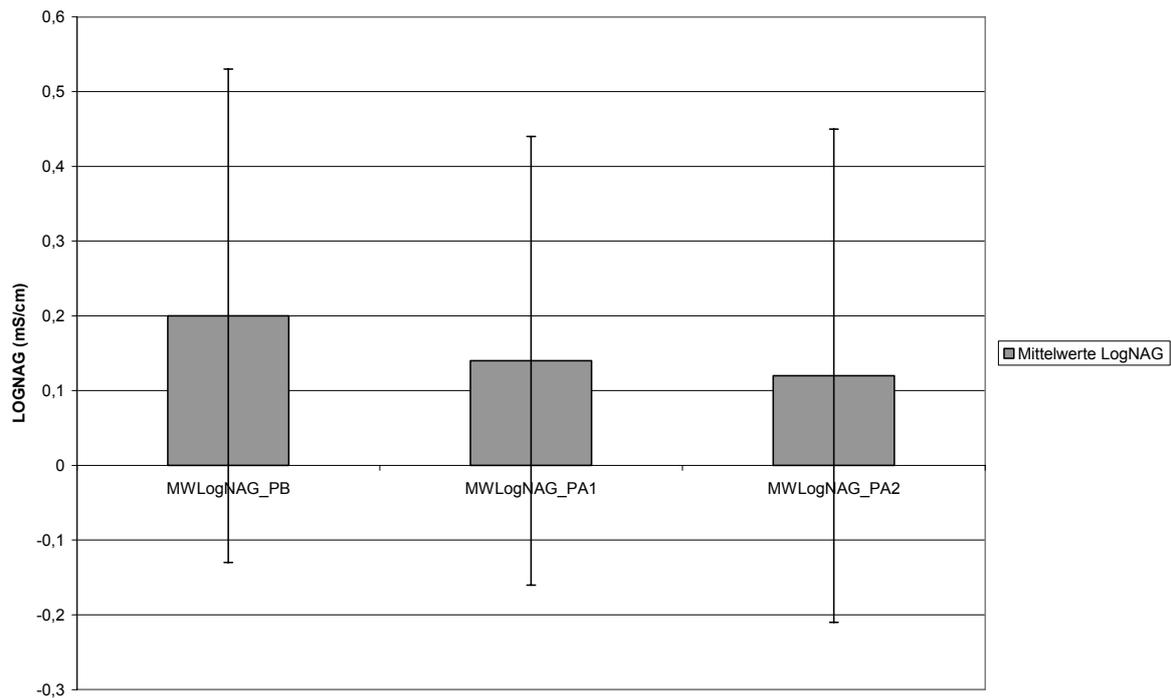


Abb.4-13 Mittelwerte der NAGase-Aktivitäten (logarithmiert) (n = 568 Proben)

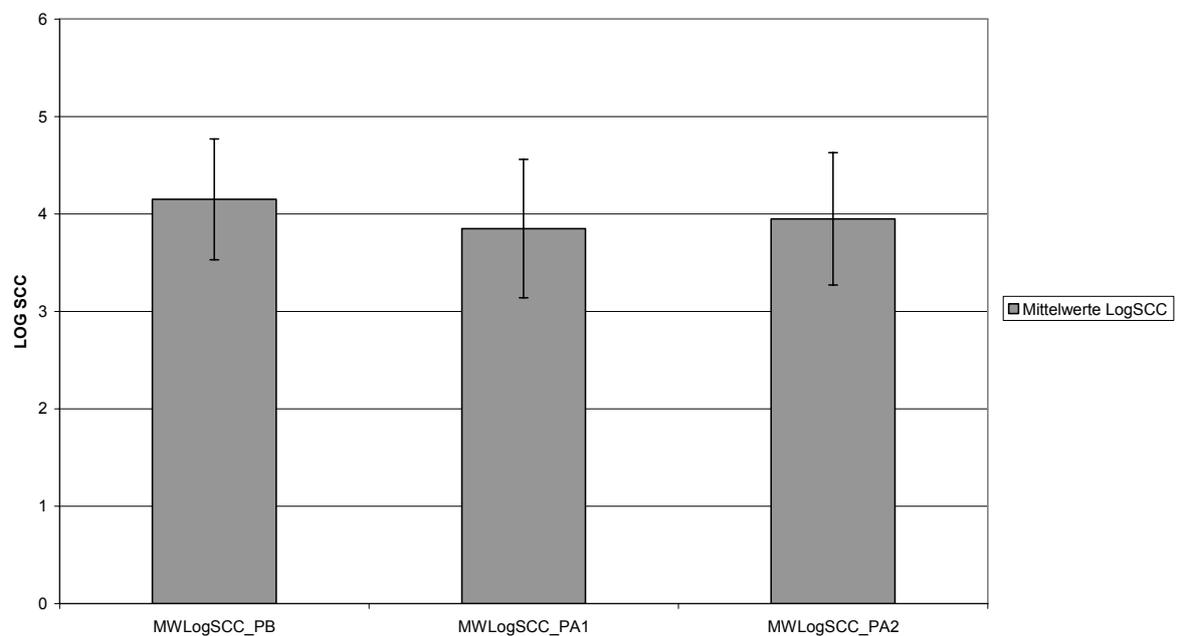


Abb.4-14 Mittelwerte der Zellgehalte/ml (logarithmiert) (n = 568 Proben)

Da die sich aus Tabelle 4-21 ergebenden Tendenzen keine eindeutige Beurteilung ermöglichen, sind in Tabelle 4-22 die in einer 1-faktoriellen Varianzanalyse ermittelten Signifikanzen zwischen den Ergebnissen der drei Probenahmen dargestellt.

Tab. 4-22 Signifikanzen zwischen den Parameterdifferenzen

Parameter	Signifikanzen
EL_PB – EL_PA1	***
EL_PB – EL_PA2	***
EL_PA1 – EL_PA2	***
LOGEL_PB – LOGEL_PA1	***
LOGEL_PB – LOGEL_PA2	***
LOGEL_PA1 – LOGEL_PA2	***
CMT_PB – CMT_PA1	***
CMT_PB – CMT_PA2	**
CMT_PA1 – CMT_PA2	**
NAG_PB – NAG_PA1	***
NAG_PB – NAG_PA2	***
NAG_PA1 – NAG_PA2	ns
LOG <sub>NAG</sub> _PB – LOG <sub>NAG</sub> _PA1	***
LOG <sub>NAG</sub> _PB – LOG <sub>NAG</sub> _PA2	**
LOG <sub>NAG</sub> _PA1 – LOG <sub>NAG</sub> _PA2	ns
SCC_PB – SCC_PA1	ns
SCC_PB – SCC_PA2	ns
SCC_PA1 – SCC_PA2	ns
LOG <sub>SCC</sub> _PB – LOG <sub>SCC</sub> _PA1	***
LOG <sub>SCC</sub> _PB – LOG <sub>SCC</sub> _PA2	***
LOG <sub>SCC</sub> _PA1 – LOG <sub>SCC</sub> _PA2	***

ns = nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ), \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$

Zur besseren Einordnung der CMT Befunde, gibt die folgende Tabelle 4-23 die den CMT-Scores (Reagenz A) entsprechenden Gehalte somatischer Zellen wieder.

Tab. 4-23 Die CMT-Scores und ihr korrespondierender SCC für alle drei Probenahmen (PB, PA1 und PA2) zusammengefasst (n = 1704)

CMT	0	0,5	1	2	3	4	5
n = 1704	940	433	118	54	48	79	32
Mittelwert SCC *10 <sup>3</sup> /ml	8,36	12,40	61,14	69,40	123,13	525,28	874,63
std	13,04	17,37	85,01	57,11	118,44	930,98	1327,77

Da auch im Routinebetrieb der Auktion der CMT als diagnostisches Werkzeug verwendet wird, stellte sich die Frage, welche diagnostische Sicherheit dem CMT retrospektiv bei Kenntnis der Ergebnisse der zytologischen Untersuchung zugeschrieben werden kann. Zur Untersuchung der Genauigkeit des CMT – die positiven Viertel (positiv = Zellzahl/ml > 100.000) von den negativen Vierteln (negativ = Zellzahl/ml < 100.000) zu unterscheiden – wurde mittels PROC FREQ eine Vierfeldertafel (Schema siehe Tabelle 4-19) erstellt.

Tab. 4-24 Vierfeldertafeln der drei Probenahmen

Vierfeldertafel		PB		PA1		PA2	
		SCC > 100.000 Positiv (n = 57)	SCC < 100.000 Negativ (n = 511)	SCC > 100.000 Positiv (n = 37)	SCC < 100.000 Negativ (n = 531)	SCC > 100.000 Positiv (n = 42)	SCC < 100.000 Negativ (n = 526)
CMT	positiv CMT < 0,5	54 (94,74%)	77 (15,07%)	36 (97,3%)	42 (7,91%)	40 (95,24%)	82 (15,59%)
	negativ CMT ≥ 0,5	3 (5,26%)	434 (84,93%)	1 (2,7%)	489 (92,09%)	2 (4,76%)	444 (84,41%)

Tabelle 4-25 beschreibt das Auswertungsschema, welches der Berechnung von Sensitivität, Spezifität und Youden-Index der elektrischen Leitfähigkeit und der NAGase zugrunde liegt. Die Referenzwerte wurden nach HAMANN und ZECCONI 1998 (elektrische Leitfähigkeit) bzw. SCHÜTTEL 1999 (NAGase) gewählt.

Tab. 4-25 Auswertungsschema (Vierfeldertafel) für elektrische Leitfähigkeit bzw. NAGase-Aktivität auf Basis der Ergebnisse zum Gehalt somatischer Zellen in Milch

		SCC	
		SCC < 100.00	SCC ≥ 100.000
<b>EL</b>	EL = 4,8 – 6,2 mS/cm	„Richtig negativ“	„Falsch negativ“
	EL < 4,8 oder > 6,2 mS/cm	„Falsch positiv“	„Richtig positiv“
<b>NAGase</b>	NAG = 1,1 – 2,8 nmol x ml <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup>	„Richtig negativ“	„Falsch negativ“
	NAG < 1,1 oder > 2,8 nmol x ml <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup>	„Falsch positiv“	„Richtig positiv“

Aus den Angaben in den Vier-Felder-Tafeln der elektrischen Leitfähigkeit, der NAGase und des CMT ergeben sich folgende Werte für Sensitivität, Spezifität und Youden-Index der Parameter:

Tab. 4-26 Sensitivität, Spezifität und Youden-Index für CMT, elektrische Leitfähigkeit (EL) und NAGase (PB, PA1, PA2 jeweils n = 568)

Parameter	CMT			
Probenahme	PB	PA1	PA2	Gesamt
Sensitivität [%]	94,74	97,30	95,24	95,76
Spezifität [%]	84,93	92,09	84,41	87,14
Youden-Index [%]	79,67	89,39	79,65	82,90
Parameter	Elektrische Leitfähigkeit			
Probenahme	PB	PA1	PA2	Gesamt
Sensitivität [%]	49,12	45,95	61,90	52,32
Spezifität [%]	92,76	90,21	78,90	87,29
Youden-Index [%]	41,88	36,16	40,80	39,31
Parameter	NAGase			
Probenahme	PB	PA1	PA2	Gesamt
Sensitivität [%]	66,67	62,16	61,90	63,58
Spezifität [%]	59,69	57,06	62,55	59,77
Youden-Index [%]	26,36	19,22	24,45	23,34

In der folgenden Tabelle 4-27 sind die Korrelationen (Korrelationskoeffizient nach Spearman) der einzelnen Parameter mit der Zellzahl (SCC)/ml für jede Probenahme dargestellt.

Tab. 4-27 Korrelationen der Parameter mit dem Zellgehalt/ml

	Probe- nahmen	$\bar{X}$ Zellgehalt (*10 <sup>3</sup> /ml)	EL	NAG	CMT
Korrelations- koeffizient (Spearman)	<b>PB</b> (n = 568)	69,30	0,27 p < 0,0001	0,38 p < 0,0001	0,60 p < 0,0001
	<b>PA1</b> (n = 568)	50,47	0,24 p < 0,0001	0,38 p < 0,0001	0,47 p < 0,0001
	<b>PA2</b> (n = 568)	55,57	0,34 p < 0,0001	0,27 p < 0,0001	0,57 p < 0,0001
	<b>Gesamt</b> (n = 1704)	58,45	0,28 p < 0,0001	0,34 p < 0,0001	0,54 p < 0,0001

Um den Status und die Entwicklung der Viertel zu beschreiben, wurde folgendes Diagnoseschema (Tabelle 4-28) verwendet:

Tab. 4-28 Diagnoseschema (nach HAMANN u. FEHLINGS 2002, in Anlehnung an IDF 1967)

Diagnose	Zellen/ml	Bakteriologie
<b>1 = normale Sekretion</b>	< 100.000	negativ
<b>2 = latente Infektion</b>	< 100.000	positiv
<b>3 = unspezifische Mastitis</b>	≥ 100.000	negativ
<b>4 = Mastitis</b>	≥ 100.000	positiv

Tabellen 4-29 – 4-31 zeigen die Verteilung der Viertel auf die vier Diagnosen der einzelnen Probenahmen. Es wurden jeweils n (Viertel) und n (Tiere) angegeben. Die Tier-Diagnose basiert auf der identischen Diagnose aller vier Viertel.

Tab. 4-29 Eutergesundheit der Tiere zur ersten Probenahme (PB)

<b>PB (142 Tiere = 100%, 561 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 7)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 44 (30,99%) Viertel: 367 (65,41%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 5 (3,52%) Viertel: 137 (24,42%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 21 (3,74%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 36 (6,42%)

Tab. 4-30 Eutergesundheit der Tiere zur zweiten Probenahme (PA1)

<b>PA1 (142 Tiere = 100%, 560 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 8)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 50 (35,21%) Viertel: 398 (71,07%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 5 (3,52%) Viertel: 125 (22,32%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 14 (2,50%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 23 (4,11%)

Tab. 4-31 Eutergesundheit der Tiere zur dritten Probenahme (PA2)

<b>PA2 (142 Tiere = 100%, 566 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 2)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 54 (38,03%) Viertel: 395 (69,79%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 3 (2,11%) Viertel: 129 (22,79%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 13 (2,30%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 29 (5,12%)

Eine Übersicht über die Entwicklung der Eutergesundheit im Verlauf der drei Probenahmen (PB, PA 1 und PA 2) zeigt Tabelle 4-32. In der letzten Spalte ist jeweils der Prozentsatz der Viertel aus der jeweiligen PB-Diagnose angegeben, in dem die benannten Einzel-Diagnosen-Kombinationen vorgekommen sind

Tab. 4-32 Entwicklung der Eutergesundheit im Verlauf der Probenahmen (PB, PA 1, PA 2)

PB n (% von PB)	PA1 n (% von PA1)	PA2 n (% von PA2)	(% von Diagnose PB)
norm. S. : 357 (65,27)	norm. S.: 313 (57,22)	norm. S.: 289 (52,83)	(80,95)
		lat. Inf.: 24 (4,39)	(6,72)
	lat. Inf.: 32 (5,85)	norm. S.: 20 (3,66)	(5,60)
		lat. Inf.: 11 (2,01)	(3,08)
		unspez. M. : 1 (0,18)	(0,28)
	unspez. M.: 3 (0,55)	unspez. M.: 3 (0,55)	(0,84)
	Mastitis 2 (0,37)	norm. S.: 1 (0,18)	(0,28)
		lat. Inf.: 1 (0,18)	(0,28)
lat. Inf.: 133 (24,31)	norm. S. 61 (11,15)	norm. S.: 40 (7,31)	(30,08)
		lat. Inf.: 18 (3,29)	(13,53)
		unspez. M. : 2 (0,37)	(1,50)
	lat. Inf. 67 (12,25)	norm. S.: 11 (2,01)	(8,27)
		lat. Inf.: 50 (9,14)	(37,59)
		Mastitis: 5 (0,91)	(3,76)
	unspez. M. 1 (0,18)	norm. S.: 1 (0,18)	(0,75)
	Mastitis 4(0,73)	lat. Inf.: 2 (0,37)	(1,50)
Mastitis: 2 (0,37)		(1,50)	

Tab. 4-32 Fortsetzung

<b>PB</b> n (% von PB)	<b>PA1</b> n (% von PA1)	<b>PA2</b> n (% von PA2)	<b>(% von</b> <b>Diagnose PB)</b>
unspez. M. 21 (3,84)	norm. S. 9 (1,65)	norm. S.: 7 (1,28)	(33,33)
		lat. Inf.: 2 (0,37)	(9,52)
	lat. Inf. 3 (0,55)	norm. S.: 1 (0,18)	(4,76)
		lat. Inf.: 2 (0,37)	(9,52)
	unspez. M. 7 (1,28)	norm. S.: 3 (0,55)	(14,29)
		unspez. M.: 3 (0,55)	(14,29)
		Mastitis: 1 (0,18)	(4,76)
	Mastitis 1 (0,18)	Mastitis 1 (0,18)	(4,76)
Mastitis 36 (6,58)	norm. S. 3 (0,55)	norm. S.: 1 (0,18)	(2,78)
		lat. Inf.: 1 (0,18)	(2,78)
		Mastitis: 1 (0,18)	(2,78)
	lat. Inf. 15 (2,74)	lat. Inf.: 9 (1,65)	(25,00)
		Mastitis: 6 (1,10)	(16,67)
	unspez. M. 3 (0,55)	unspez. M. : 2 (0,37)	(5,56)
		Mastitis: 1 (0,18)	(2,78)
	Mastitis 15 (2,74)	lat. Inf.: 4 (0,73)	(11,11)
		Mastitis: 11 (2,01)	(30,56)
	547 (100)	547(100)	547(100)

Die Verteilung der CMT-Scores auf die verschiedenen Diagnosen ist der folgenden Tabelle 4-33 zu entnehmen.

Tab. 4-33 Verteilung der CMT-Ergebnisse auf die Kategorien der Eutergesundheit

n = 568		SCC								kontaminiert	
		< 100.000				> 100.000					
		Euterpathogene Mikroorganismen									
		nachgewiesen		nicht nachgewiesen		nachgewiesen		nicht nachgewiesen			
Diagnose laut zytobakteriologischer Untersuchung (Anzahl Viertel n/%)		1 = normale Sekretion		2 = latente Infektion		3 = unspezif. Mastitis		4 = Mastitis		n	%
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
PB	CMT 0	218	38,38	65	11,44	2	0,35	0	0,00	2	0,35
	CMT 0,5	112	19,72	33	5,81	0	0,00	1	0,18	4	0,70
	CMT 1	21	3,70	11	1,94	4	0,70	6	1,06	1	0,18
	CMT 2	7	1,23	8	1,41	1	0,18	3	0,53	0	0,00
	CMT 3	4	0,70	9	1,58	1	0,18	1	0,18	0	0,00
	CMT 4	2	0,35	9	1,58	8	1,41	16	2,82	0	0,00
	CMT 5	3	0,53	2	0,35	5	0,88	9	1,58	0	0,00
	<b>n Gesamt</b>	<b>367</b>	<b>64,61</b>	<b>137</b>	<b>24,12</b>	<b>21</b>	<b>3,70</b>	<b>36</b>	<b>6,34</b>	<b>7</b>	<b>1,23</b>
PA1	CMT 0	261	45,95	66	11,62	0	0,00	1	0,18	6	1,06
	CMT 0,5	123	21,65	31	5,46	0	0,00	0	0,00	2	0,35
	CMT 1	7	1,23	15	2,64	3	0,53	3	0,53	0	0,00
	CMT 2	2	0,35	8	1,41	1	0,18	3	0,53	0	0,00
	CMT 3	4	0,70	2	0,35	1	0,18	5	0,88	0	0,00
	CMT 4	0	0,00	2	0,35	7	1,23	9	1,58	0	0,00
	CMT 5	1	0,18	1	0,18	2	0,35	2	0,35	0	0,00
	<b>n Gesamt</b>	<b>398</b>	<b>70,07</b>	<b>125</b>	<b>22,01</b>	<b>14</b>	<b>2,46</b>	<b>23</b>	<b>4,05</b>	<b>8</b>	<b>1,41</b>
PA2	CMT 0	259	45,60	57	10,04	0	0,00	1	0,18	2	0,35
	CMT 0,5	94	16,55	32	5,63	1	0,18	0	0,00	0	0,00
	CMT 1	24	4,23	21	3,70	2	0,35	0	0,00	0	0,00
	CMT 2	7	1,23	11	1,94	1	0,18	2	0,35	0	0,00
	CMT 3	4	0,70	4	0,70	6	1,06	7	1,23	0	0,00
	CMT 4	4	0,70	3	0,53	2	0,35	17	2,99	0	0,00
	CMT 5	3	0,53	1	0,18	1	0,18	2	0,35	0	0,00
	<b>n Gesamt</b>	<b>395</b>	<b>69,54</b>	<b>129</b>	<b>22,71</b>	<b>13</b>	<b>2,29</b>	<b>29</b>	<b>5,11</b>	<b>2</b>	<b>0,35</b>

Setzt man die Anzahl Viertel je Diagnose auf 100% und berechnet nun, welcher Anteil der Ergebnisse mit CMT-Scores 0, 0,5, 1, 2 die Ergebnisse „normale Sekretion“ und „latente Infektion“ abdecken, bzw. welcher Anteil „unspezifischer Mastitiden“ und „Mastitiden“ von den CMT Scores 3 – 5 erfasst wird, ergeben sich die in Tabelle 4 – 34 dargestellten Werte.

Tab. 4-34 Zusammenfassende Darstellung der Verteilung der CMT-Ergebnisse auf die Eutergesundheitskategorien

Parameter		SCC			
Zellgehalt		< 100 000		> 100 000	
Diagnose ( $\Sigma$ Prozentangabe/Diagnose)		1 = normale Sekretion	2 = latente Infektion	3 = unspezif. Mastitis	4 = Mastitis
PB	CMT 0 – 2	97,55	85,40	33,33	27,78
	CMT 3 – 5	2,45	14,60	66,67	72,22
PA1	CMT 0 – 2	98,74	96,00	28,57	27,78
	CMT 3 – 5	1,26	4,00	71,43	69,57
PA2	CMT 0 – 2	97,22	93,80	30,77	10,34
	CMT 3 – 5	2,78	6,20	69,23	89,66
Mittelwert PB, PA1, PA2	CMT 0 – 2	<b>97,84</b>	<b>91,73</b>	30,89	22,85
	CMT 3 – 5	2,16	8,27	<b>69,11</b>	<b>77,15</b>

Tabelle 4-35 zeigt die Auswertung der bakteriologischen Befunde. Bei keiner der Probenahmen wurden *Sc. agalactiae* oder *Sc. dysgalactiae* nachgewiesen. Bezüglich der mastitisrelevanten Keime beschränkte sich der Nachweis auf koagulasenegative Staphylokokken, *S. aureus* und *Sc. uberis*. Coliforme Keime traten nur vereinzelt auf und konnten daher für die Übersichtsbetrachtung außer Acht gelassen werden.

Tab. 4-35 Nachgewiesene Mastitiserreger anlässlich der drei Probenahmen

Probenahme	PB				PA1				PA2			
	Latente Infektion (n = 137)		Mastitis (n = 36)		Latente Infektion (n = 125)		Mastitis (n = 23)		Latente Infektion (n = 129)		Mastitis (n = 29)	
Diagnose	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>KNS</b>	84	61,31	26	72,22	80	64,00	15	65,22	85	65,89	23	79,31
<i>S. aureus</i>	5	3,65	4	11,11	4	3,20	5	21,74	5	3,88	4	13,79
<i>Sc. uberis</i>	0	0,00	1	2,78	0	0,00	0	0,00	3	2,33	0	0,00
<b>Sonstige</b>	48	35,04	5	13,89	41	32,80	3	13,04	36	27,91	2	6,90

Zur Analyse des Einflusses der Probenahmeintervalle auf den Zellgehalt und die CMT-Reaktion wurden zunächst Melkintervallgruppen definiert (Tabelle 4-36). Die Gruppen wurden so gewählt, dass sie für beide Feldversuche (4.2.1 und 4.2.2) angewandt werden konnten.

Tab. 4-36 Probenahmeintervalle für Feldversuch 4.2.1 und Melkintervalle für 4.2.2

Melkintervallgruppen	Stunden
Melkintervallgruppe 1 (MI 1)	≤ 6
Melkintervallgruppe 2 (MI 2)	7 – 10
Melkintervallgruppe 3 (MI 3)	11 – 14
Melkintervallgruppe 4 (MI 4)	15 – 20
Melkintervallgruppe 5 (MI 5)	> 20

Für Probenahmeintervalle und Melkintervalle werden im Folgenden synonym ZMZ bzw. MI verwendet.

Für den Auktions-Versuch wurden insgesamt drei Zwischenmelkzeiten definiert:  
 ZMZ 1 = Morgenmelkzeit im jeweiligen Betrieb bis zur Probenahme Betrieb (PB)  
 ZMZ 2 = Probenahme Betrieb (PB) bis zur ersten Probenahme auf der Auktion (PA1)  
 ZMZ 3 = Probenahme Betrieb (PB) bis zur zweiten Probenahme auf der Auktion (PA2)

Zunächst wurden für die in der jeweiligen ZMZ vorkommenden Melkintervallgruppen (ZMZ 1: MI 2 und MI 3; ZMZ 2: MI 3 und MI 4; ZMZ 3: MI 4 und MI 5) T-Tests für ungepaarte Stichproben berechnet (Tabelle 4-37).

Tab. 4-37 Signifikanzen zwischen den Ergebnissen für LOG<sub>SCC</sub> und CMT der Melkintervallgruppen

ZMZ	MI-Vergleich ( $\bar{X}$ der MI in h)	Signifikanzen der LOG <sub>SCC</sub> -Ergebnisse	Signifikanzen der CMT-Ergebnisse
ZMZ 1	MI 2 (9,53 h) – MI 3 (11,74 h)	*	ns
ZMZ 2	MI 3 (13,35 h) – MI 4 (15,67 h)	*	ns
ZMZ 3	MI 4 (18,75 h) – MI 5 (22,06 h)	ns	ns

Nach Berechnung der Signifikanzen innerhalb einer ZMZ wurde nun untersucht, inwiefern sich ein ansteigendes Melkintervall von Probenahme zu Probenahme auf den Zellgehalt und die CMT-Reaktion auswirkt.

Tab. 4-38 Signifikanzen zwischen den Ergebnissen von Zellgehalt bzw. CMT-Befunden anlässlich PB, PA1 und PA2 unter Berücksichtigung der jeweiligen Melkintervalle

Probezeitpunkt	PB	PA1	PA2	n	Signifikanzen der LOG <sub>SCC</sub>	Signifikanzen der CMT
MI ( $\bar{X}$ h)	2 (10,00 h)	3 (14,00 h)	4 (20,00 h)	12	*** p < 0,0001	*** p < 0,0001
	2 (9,36 h)	4 (16,19 h)	5 (22,22 h)	144	*** p < 0,0001	* p = 0,0120
	3 (11,20 h)	4 (15,00 h)	5 (21,80 h)	40	*** p < 0,0001	** p = 0,0002

\* = p < 0,05, \*\*\* = p < 0,001

Schließlich wurden mittels T-Test ebenfalls der Zellgehalt und der CMT der Proben von Tieren mit gleichbleibendem Melkintervall innerhalb zweier ZMZ verglichen. Die ZMZ die jeweils miteinander verglichen wurden, sind in der folgenden Tabelle grau unterlegt.

Tab. 4-39 Signifikanzen der Differenzen (LOG<sub>SCC</sub>; CMT) zwischen zwei gleichen MI zu den unterschiedlichen Probezeitpunkten

Probezeitpunkt	PB	PA1	PA2	n	Signifikanzen der LOG <sub>SCC</sub>	Signifikanzen der CMT
MI ( $\bar{X}$ h)	2 (9,72 h)	4 (15,52 h)	4 (19,36 h)	100	ns p = 0,4024	ns p = 0,9382
	3 (12,04 h)	3 (13,24 h)	4 (18,20 h)	196	ns p = 0,4024	ns p = 0,9382
	3 (11,07 h)	4 (15,07 h)	4 (19,29 h)	56	ns p = 0,4024	ns p = 0,9382
	3 (11,60 h)	3 (14,00 h)	5 (21,40 h)	20	ns p = 0,4024	ns p = 0,9382

ns = nicht signifikant

#### **4.2.2 Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des automatischen Melkens**

In diesem Versuch wurden verschiedene Parameter parallel analysiert, um ihre Anwendbarkeit zur Feststellung einer Entzündung der Milchdrüse zu untersuchen. Als Referenz diente die somatische Zellzahl pro ml, welche mittels Fossomatic<sup>®</sup> ermittelt wurde. Beprobte wurde die konventionelle Herde („KON“) und die im Melkroboter gemolkene Herde („VMS“) auf dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe (jeweils dreimalig = Probenahme 1, 2 und 3 über 24 h). Im Anschluss an den Hauptversuch („KON“ und „VMS“) wurde die im Roboter gemolkene Herde erneut dreimalig beprobt (jeweils über 8 h), mit dem Unterschied, dass der CMT und die Messung im DCC<sup>®</sup> unmittelbar neben der Kuh durchgeführt wurden („Cowside“), während dies im Hauptversuch unter Laborbedingungen erfolgte.

Die folgenden Tabellen 4-40 bis 4-42 zeigen Mittelwert und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter.

Tab. 4-40 Mittelwerte und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter in „KON“

Parameter	Gesamt (n = 483)		Probenahme 1 (n = 170)		Probenahme 2 (n = 163)		Probenahme 3 (n = 150)	
	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std
EL	<b>6,25</b>	± 0,76	<b>6,26</b>	± 0,65	<b>6,32</b>	± 0,82	<b>6,16</b>	± 0,80
LOG <sub>EL</sub>	<b>0,79</b>	± 0,05	<b>0,79</b>	± 0,04	<b>0,80</b>	± 0,05	<b>0,79</b>	± 0,05
NAG	<b>1,76</b>	± 2,56	<b>2,1</b>	± 3,10	<b>1,74</b>	± 2,29	<b>1,38</b>	± 2,00
LOG <sub>NAG</sub>	<b>-0,02</b>	± 0,51	<b>0,05</b>	± 0,51	<b>0,001</b>	± 0,53	<b>-0,13</b>	± 0,48
CMT	<b>1,32</b>	± 1,80	<b>1,19</b>	± 1,57	<b>1,22</b>	± 1,84	<b>1,58</b>	± 1,96
DCC *10 <sup>3</sup> /ml	<b>140,52</b>	± 389,26	<b>170,54</b>	± 506,67	<b>110,64</b>	± 234,16	<b>138,95</b>	± 370,64
LOG <sub>DCC</sub>	<b>4,59</b>	± 0,67	<b>4,66</b>	± 0,65	<b>4,55</b>	± 0,67	<b>4,54</b>	± 0,70
SCC *10 <sup>3</sup> /ml	<b>138,85</b>	± 490,75	<b>184,65</b>	± 691,08	<b>90,89</b>	± 240,03	<b>139,09</b>	± 412,09
LOG <sub>SCC</sub>	<b>4,80</b>	± 0,73	<b>4,44</b>	± 0,77	<b>4,33</b>	± 0,70	<b>4,42</b>	± 0,71

Tab. 4-41 Mittelwerte und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter in „VMS“

Parameter	Gesamt (n = 1040)		Probenahme 1 (n = 366)		Probenahme 2 (n = 279)		Probenahme 3 (n = 395)	
	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std
EL	<b>6,16</b>	± 0,78	<b>6,18</b>	± 0,82	<b>6,16</b>	± 0,67	<b>6,15</b>	± 0,82
LOG <sub>EL</sub>	<b>0,78</b>	± 0,05	<b>0,79</b>	± 0,05	<b>0,79</b>	± 0,04	<b>0,79</b>	± 0,05
NAG	<b>1,84</b>	± 2,45	<b>1,68</b>	± 2,27	<b>1,86</b>	± 1,71	<b>1,98</b>	± 3,00
LOG <sub>NAG</sub>	<b>0,05</b>	± 0,45	<b>-0,04</b>	± 0,51	<b>0,17</b>	± 0,27	<b>0,05</b>	± 0,46
CMT	<b>0,86</b>	± 1,53	<b>0,95</b>	± 1,54	<b>0,80</b>	± 1,47	<b>0,82</b>	± 1,56
DCC *10 <sup>3</sup> /ml	<b>205,28</b>	± 612,45	<b>212,84</b>	± 619,11	<b>155,36</b>	± 486,87	<b>233,53</b>	± 681,33
LOG <sub>DCC</sub>	<b>4,60</b>	± 0,67	<b>4,56</b>	± 0,70	<b>4,55</b>	± 0,64	<b>4,68</b>	± 0,66
SCC *10 <sup>3</sup> /ml	<b>181,37</b>	± 662,39	<b>210,73</b>	± 742,49	<b>128,89</b>	± 373,03	<b>191,22</b>	± 738,44
LOG <sub>SCC</sub>	<b>4,42</b>	± 0,69	<b>4,37</b>	± 0,74	<b>4,44</b>	± 0,67	<b>4,46</b>	± 0,67

Tab. 4-42 Mittelwerte und Standardabweichung der zyto-biochemischen Parameter in „Cowside“

Parameter	Gesamt (n = 383)		Probenahme 1 (n = 115)		Probenahme 2 (n = 141)		Probenahme 3 (n = 127)	
	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std	$\bar{X}$	std
EL	<b>6,34</b>	± 0,92	<b>6,32</b>	± 0,84	<b>6,51</b>	± 0,91	<b>6,19</b>	± 0,98
LOG <sub>EL</sub>	<b>0,80</b>	± 0,05	<b>0,80</b>	± 0,05	<b>0,81</b>	± 0,05	<b>0,79</b>	± 0,06
NAG	<b>2,11</b>	± 3,50	<b>1,70</b>	± 2,12	<b>2,51</b>	± 4,66	<b>2,04</b>	± 2,93
LOG <sub>NAG</sub>	<b>0,07</b>	± 0,42	<b>0,05</b>	± 0,36	<b>0,12</b>	± 0,43	<b>0,05</b>	± 0,45
CMT	<b>1,49</b>	± 1,83	<b>1,84</b>	± 1,95	<b>1,38</b>	± 1,87	<b>1,30</b>	± 1,64
DCC *10 <sup>3</sup> /ml	<b>193,79</b>	± 643,17	<b>139,05</b>	± 473,12	<b>256,21</b>	± 795,55	<b>174,05</b>	± 583,87
LOG <sub>DCC</sub>	<b>4,49</b>	± 0,71	<b>4,39</b>	± 0,66	<b>4,53</b>	± 0,74	<b>4,52</b>	± 0,71
SCC *10 <sup>3</sup> /ml	<b>140,51</b>	± 497,82	<b>130,88</b>	± 459,10	<b>188,69</b>	± 639,75	<b>96,16</b>	± 320,17
LOG <sub>SCC</sub>	<b>4,28</b>	± 0,76	<b>4,27</b>	± 0,70	<b>4,29</b>	± 0,83	<b>4,28</b>	± 0,74

Zur Vereinfachung der Einordnung der CMT-Score Mittelwerte wurde in Tabelle 4-43 jeder Score-Stufe der für jeden Versuch entsprechende Zellgehalt/ml gegenübergestellt. Bis zu einem Zellzahlmittelwert (ohne Berücksichtigung der Standardabweichung) bis 100.000 Zellen/ml sind CMT-Scores bis 2 feststellbar. Darüber hinausgehende Befunde zeigen Zellzahlmittelwerte größer 100.000 Zellen/ml.

Tab. 4-43 CMT-Scores und ihr korrespondierender SCC für „KON“, „VMS“ und „Cowside“

Versuch CMT-Score	KON		VMS		Cowside	
	n 483	Mittelwert SCC *10 <sup>3</sup> /ml	n 1041	Mittelwert SCC *10 <sup>3</sup> /ml	n 383	Mittelwert SCC *10 <sup>3</sup> /ml
0	216	11,77 ± 14,84	543	27,88 ± 75,35	142	8,50 ± 8,12
0,5	85	26,50 ± 45,60	265	50,84 ± 168,57	66	17,64 ± 23,33
1	38	52,28 ± 61,80	61	38,98 ± 38,05	53	23,19 ± 17,76
2	24	99,35 ± 62,58	17	89,71 ± 49,76	11	45,91 ± 28,74
3	24	133,36 ± 114,04	37	217,51 ± 455,71	35	105,37 ± 282,42
4	41	225,30 ± 423,83	28	675,56 ± 977,63	21	120,48 ± 176,11
5	55	826,63 ± 1193,62	89	1451,03 ± 1661,21	55	788,98 ± 1084,83

Um einen ersten Eindruck über die Anwendbarkeit der übrigen Parameter wie elektrische Leitfähigkeit, CMT, NAGase und DCC als Mittel zum Nachweis einer Euterentzündung zu erhalten, wurden die Korrelationen der Parameter mit der Zellzahl/ml berechnet.

Die folgende Tabelle 4-44 beinhaltet die Korrelationskoeffizienten (Spearman) der Parameter mit der somatischen Zellzahl pro ml.

Tab. 4-44 Korrelationskoeffizienten mit SCC der „KON“- Herde (n = 483), der „VMS“- Herde (n = 1041) und des „Cowside“- Versuchs (n = 383)

Probenahmen	Parameter	Korrelationskoeffizienten		
		KON	VMS	Cowside
Gesamt	EL	0,46 p < 0,0001	0,41 p < 0,0001	0,55 p < 0,0001
	NAG	0,60 p < 0,0001	0,45 p < 0,0001	0,51 p < 0,0001
	CMT	0,78 p < 0,0001	0,51 p < 0,0001	0,78 p < 0,0001
	DCC	0,85 p < 0,0001	0,73 p < 0,0001	0,84 p < 0,0001
Probenahme 1	EL	0,51 p < 0,0001	0,34 p < 0,0001	0,65 p < 0,0001
	NAG	0,63 p < 0,0001	0,44 p < 0,0001	0,49 p < 0,0001
	CMT	0,77 p < 0,0001	0,43 p < 0,0001	0,80 p < 0,0001
	DCC	0,85 p < 0,0001	0,73 p < 0,0001	0,76 p < 0,0001
Probenahme 2	EL	0,46 p < 0,0001	0,39 p < 0,0001	0,53 p < 0,0001
	NAG	0,59 p < 0,0001	0,44 p < 0,0001	0,48 p < 0,0001
	CMT	0,80 p < 0,0001	0,47 p < 0,0001	0,81 p < 0,0001
	DCC	0,88 p < 0,0001	0,73 p < 0,0001	0,84 p < 0,0001
Probenahme 3	EL	0,45 p < 0,0001	0,50 p < 0,0001	0,57 p < 0,0001
	NAG	0,71 p < 0,0001	0,47 p < 0,0001	0,58 p < 0,0001
	CMT	0,79 p < 0,0001	0,67 p < 0,0001	0,78 p < 0,0001
	DCC	0,83 p < 0,0001	0,73 p < 0,0001	0,89 p < 0,0001

Mittels Berechnung einer Vier-Felder-Tafel nach dem Schema aus Tabelle 4-19 bzw. Tabelle 4-25 kann dargestellt werden, wie sicher die verschiedenen Entzündungsnachweis-Methoden die „gesunden“ und „kranken“, bzw. die Viertel mit einem Gehalt somatischer Zellen unter 100.000/ml respektive über 100.000/ml herausfinden.

In den folgenden Tabellen 4-45 bis 4-47 sind die Verteilungen der Ergebnisse von CMT, DCC®, NAGase und elektrischer Leitfähigkeit dargestellt.

Tab. 4-45 Vergleichende Darstellung der Präzision von Befunden unterschiedlicher Parameter (Referenz: SCC) für „KON“

KON		„Richtig positiv“	„Falsch positiv“	„Richtig negativ“	„Falsch negativ“
Gesamt (n = 438)	CMT	97 (95,1%)	85 (22,31%)	296 (77,69%)	5 (4,9%)
	DCC	96 (94,12%)	30 (7,87%)	351 (92,13%)	6 (5,88%)
	EL	59 (57,84%)	114 (29,92%)	267 (70,08%)	43 (42,16%)
	NAG	67 (65,69%)	283 (74,28%)	98 (25,72%)	35 (34,31%)
Probe- nahme 1 (n = 170)	CMT	38 (92,68%)	31 (24,03%)	98 (75,97%)	3 (7,32%)
	DCC	37 (90,24%)	10 (7,75%)	119 (92,25%)	4 (9,76%)
	EL	28 (68,29%)	37 (28,68%)	92 (71,32%)	13 (31,71%)
	NAG	28 (68,29%)	94 (72,87%)	35 (27,13%)	13 (31,71%)
Probe- nahme 2 (n = 163)	CMT	29 (96,67%)	23 (17,79%)	110 (82,71%)	1 (3,33%)
	DCC	30 (100%)	15 (11,28%)	118 (88,72%)	0 (0%)
	EL	18 (60%)	49 (36,84%)	84 (63,16%)	12 (40%)
	NAG	19 (63,33%)	89 (66,92%)	44 (33,08%)	11 (36,67%)
Probe- nahme 3 (n = 150)	CMT	30 (96,77%)	31 (26,05%)	88 (73,95%)	1 (3,23%)
	DCC	29 (93,55%)	5 (4,2%)	114 (95,8%)	2 (6,45%)
	EL	18 (58,06%)	28 (23,53%)	91 (76,47%)	18 (58,06%)
	NAG	20 (64,52%)	100 (84,03%)	19 (15,97%)	11 (35,48%)

Tab. 4-46 Vergleichende Darstellung der Präzision von Befunden unterschiedlicher Parameter (Referenz: SCC) für „VMS“

VMS		„Richtig positiv“	„Falsch positiv“	„Richtig negativ“	„Falsch negativ“
Gesamt (n = 1040)	CMT	130 (79,27%)	102 (11,64%)	774 (88,36%)	34 (20,73%)
	DCC	153 (93,29%)	51 (5,82%)	825 (94,18%)	11 (6,71%)
	EL	119 (72,56%)	194 (22,15%)	682 (77,85%)	45 (17,44%)
	NAG	116 (70,73%)	516 (58,90%)	360 (41,10%)	48 (29,27%)
Probe- nahme 1 (n = 366)	CMT	48 (85,71%)	32 (10,32%)	278 (89,68%)	8 (14,29%)
	DCC	56 (100%)	12 (3,87%)	298 (96,13%)	0 (0%)
	EL	40 (71,43%)	78 (25,16%)	232 (74,84%)	16 (28,57%)
	NAG	43 (76,79%)	219 (70,65%)	91 (29,35%)	13 (23,21%)
Probe- nahme 2 (n = 279)	CMT	29 (63,04%)	36 (15,45%)	197 (84,55%)	17 (36,96%)
	DCC	40 (86,96%)	8 (3,43%)	225 (96,57%)	6 (13,04%)
	EL	30 (65,22%)	54 (23,18%)	179 (76,82%)	16 (34,78%)
	NAG	27 (58,70%)	95 (40,77%)	138 (59,23%)	19 (41,30%)
Probe- nahme 3 (n = 395)	CMT	53 (85,48%)	34 (10,21%)	299 (89,79%)	9 (14,52%)
	DCC	57 (91,94%)	31 (9,31%)	302 (90,69%)	5 (8,06%)
	EL	49 (79,03%)	62 (18,62%)	271 (81,38%)	13 (20,97%)
	NAG	46 (74,19%)	202 (60,66%)	131 (39,34%)	16 (25,81%)

Tab. 4-47 Vergleichende Darstellung der Präzision von Befunden unterschiedlicher Parameter (Referenz: SCC) für „Cowside“

Cowside		„Richtig positiv“	„Falsch positiv“	„Richtig negativ“	„Falsch negativ“
Gesamt (n = 383)	CMT	53 (98,15%)	122 (37,08%)	207 (62,92%)	1 (1,85%)
	DCC	52 (96,3%)	10 (3,04%)	319 (96,96%)	2 (3,7%)
	EL	43 (79,63%)	109 (33,13%)	220 (66,87%)	11 (20,37%)
	NAG	43 (79,63%)	233 (70,82%)	96 (29,18%)	11 (20,37%)
Probe- nahme 1 (n = 115)	CMT	14 (100%)	49 (48,51%)	52 (51,49%)	0 (0%)
	DCC	13 (92,86%)	1 (0,99%)	100 (99,01%)	1 (7,14%)
	EL	12 (85,71%)	33 (32,67%)	68 (67,33%)	2 (14,29%)
	NAG	10 (71,43%)	68 (67,33%)	33 (32,67%)	4 (28,57%)
Probe- nahme 2 (n = 141)	CMT	20 (100%)	39 (32,23%)	82 (67,77%)	0 (0%)
	DCC	20 (100%)	2 (1,65%)	119 (98,35%)	0 (0%)
	EL	19 (95,00%)	51 (42,15%)	70 (57,85%)	1 (5,00%)
	NAG	18 (90,00%)	76 (62,81%)	45 (37,19)	2 (10,00%)
Probe- nahme 3 (n = 127)	CMT	19 (95%)	34 (31,78%)	73 (68,22%)	1 (5%)
	DCC	19 (95%)	7 (6,54%)	100 (93,46%)	1 (5%)
	EL	12 (60,00%)	25 (23,36%)	82 (76,64%)	8 (40,00%)
	NAG	15 (75,00%)	89 (83,18%)	18 (16,82%)	5 (25,00%)

Aus der Berechnung der Vier-Felder-Korrelationen lassen sich die Sensitivität [%], Spezifität [%] und der Youden-Index [%] bestimmen, welche in den Tabellen 4-48 bis 4-50 aufgeführt sind.

Tab. 4-48 Sensitivität [%], Spezifität [%] und Youden-Index [%] der Parameter CMT, elektrische Leitfähigkeit, NAGase und DCC für „KON“

Parameter	Probenahme	Sensitivität %	Spezifität %	Youden-Index %
<b>CMT</b>	<b>Gesamt</b>	95,10	77,69	72,79
	<b>1</b>	92,68	75,97	68,65
	<b>2</b>	96,67	82,71	79,38
	<b>3</b>	96,77	73,95	70,72
<b>EL</b>	<b>Gesamt</b>	57,84	70,08	27,92
	<b>1</b>	68,29	71,32	39,61
	<b>2</b>	60,00	63,16	23,16
	<b>3</b>	41,94	76,47	18,41
<b>NAGase</b>	<b>Gesamt</b>	65,69	25,72	- 8,59
	<b>1</b>	68,29	27,13	- 4,58
	<b>2</b>	63,33	33,08	- 3,59
	<b>3</b>	64,52	15,97	- 19,51
<b>DCC</b>	<b>Gesamt</b>	94,12	92,13	86,25
	<b>1</b>	90,24	92,25	82,49
	<b>2</b>	100,00	88,72	88,72
	<b>3</b>	93,55	95,80	89,35

Tab. 4-49 Sensitivität [%], Spezifität [%] und Youden-Index [%] der Parameter CMT, elektrische Leitfähigkeit, NAGase und DCC für „VMS“

Parameter	Probenahme	Sensitivität %	Spezifität %	Youden-Index %
<b>CMT</b>	<b>Gesamt</b>	79,27	88,36	67,63
	<b>1</b>	85,71	89,68	75,39
	<b>2</b>	63,04	84,55	47,59
	<b>3</b>	85,48	89,79	75,27
<b>EL</b>	<b>Gesamt</b>	72,56	77,85	50,41
	<b>1</b>	71,43	74,84	46,27
	<b>2</b>	65,22	76,82	42,04
	<b>3</b>	79,03	81,38	60,41
<b>NAGase</b>	<b>Gesamt</b>	70,73	41,10	11,83
	<b>1</b>	76,79	29,35	6,14
	<b>2</b>	58,70	59,23	17,93
	<b>3</b>	74,19	39,34	13,53
<b>DCC</b>	<b>Gesamt</b>	93,29	94,18	87,47
	<b>1</b>	100	96,13	96,13
	<b>2</b>	86,96	96,57	83,53
	<b>3</b>	91,94	90,69	82,63

Tab. 4-50 Sensitivität [%], Spezifität [%] und Youden-Index [%] der Parameter CMT, elektrische Leitfähigkeit, NAGase und DCC für „Cowside“

Parameter	Probenahme	Sensitivität %	Spezifität %	Youden-Index %
<b>CMT</b>	<b>Gesamt</b>	98,15	62,92	61,07
	<b>1</b>	100,00	51,49	51,49
	<b>2</b>	100,00	67,77	67,77
	<b>3</b>	95,00	68,22	63,22
<b>EL</b>	<b>Gesamt</b>	79,63	66,87	46,50
	<b>1</b>	85,71	67,33	53,04
	<b>2</b>	95,00	57,85	52,85
	<b>3</b>	60,00	76,64	36,64
<b>NAGase</b>	<b>Gesamt</b>	79,63	29,18	8,81
	<b>1</b>	71,43	32,67	4,10
	<b>2</b>	90,00	37,19	27,19
	<b>3</b>	75,00	16,82	- 8,18
<b>DCC</b>	<b>Gesamt</b>	96,30	96,96	93,26
	<b>1</b>	92,86	99,01	91,87
	<b>2</b>	100,00	98,35	98,35
	<b>3</b>	95,00	93,46	88,46

Eine Übersicht zur Besetzung der Eutergesundheitskategorien der Versuchsgruppen: „KON“, „VMS“ und „Cowside“ geht aus den Tabellen 4-51 bis 4-59 hervor. Es werden jeweils n (Viertel) und n (Tiere, die die jeweilige Diagnose auf allen vier Vierteln aufwiesen) angegeben.

Tab. 4-51 Eutergesundheit der „KON“-Herde zur Probenahme 1

<b>Probenahme 1 (44 Tiere = 100%, 161 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 9)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 9 (20,45%) Viertel: 88 (54,66%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 1 (2,27%) Viertel: 35 (21,74%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 16 (9,94%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 22 (13,66%)

Tab. 4-52 Eutergesundheit der „KON“-Herde zur Probenahme 2

<b>Probenahme 2 (42 Tiere = 100%, 158 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 5)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 6 (14,29%) Viertel: 84 (53,16%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 1 (2,27%) Viertel: 43 (27,22%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 15 (9,49%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 16 (10,13%)

Tab. 4-53 Eutergesundheit der „KON“-Herde zur Probenahme 3

<b>Probenahme 3 (39 Tiere = 100%, 147 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 3)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 11 (28,21%) Viertel: 79 (53,74%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 2 (5,13%) Viertel: 38 (25,85%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 10 (6,80%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 1 (2,56%) Viertel: 20 (13,61%)

Tab. 4-54 Eutergesundheit der „VMS“-Herde zur Probenahme 1

<b>Probenahme 1 (93 Tiere = 100%, 349 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 17)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 16 (17,20%) Viertel: 223 (63,90%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 1 (1,08%) Viertel: 73 (20,92%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 24 (6,88%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 29 (8,31%)

Tab. 4-55 Eutergesundheit der „VMS“-Herde zur Probenahme 2

<b>Probenahme 2 (71 Tiere = 100%, 276 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 3)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 23 (32,39%) Viertel: 179 (64,86%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 0 Viertel: 52 (18,84%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 22 (7,97%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 23 (8,33%)

Tab. 4-56 Eutergesundheit der „VMS“-Herde zur Probenahme 3

<b>Probenahme 3 (101 Tiere = 100%, 387 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 8)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 23 (32,39%) Viertel: 244 (63,05%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 0 Viertel: 83 (21,45%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 24 (6,20%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 36 (9,30%)

Tab. 4-57 Eutergesundheit im „Cowside“-Versuch zur Probenahme 1

<b>Probenahme 1 (30 Tiere = 100%, 107 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 8)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 2 (6,67%) Viertel: 61 (57,01%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 0 Viertel: 33 (30,84%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 5 (4,67%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 8 (7,48%)

Tab. 4-58 Eutergesundheit im „Cowside“-Versuch zur Probenahme 2

<b>Probenahme 2 (37 Tiere = 100%, 139 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 2)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 10 (27,03%) Viertel: 84 (60,43%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 0 Viertel: 36 (25,90%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 6 (4,32%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 13 (9,35%)

Tab. 4-59 Eutergesundheit im „Cowside-Versuch“ zur Probenahme 3

<b>Probenahme 3 (33 Tiere = 100%, 126 Viertel = 100%, kontaminierte Proben: 1)</b>		
<b>Zellgehalt pro ml Viertelanfangsgemelk</b>	<b>Euterpathogene Mikroorganismen</b>	
	<b>nicht nachgewiesen</b>	<b>nachgewiesen</b>
<b>&lt; 100.000</b>	<b>normale Sekretion</b> Tiere: 8 (24,24%) Viertel: 73 (57,94%)	<b>latente Infektion</b> Tiere: 0 Viertel: 33 (26,19%)
<b>&gt; 100.000</b>	<b>unspezifische Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 15 (11,90%)	<b>Mastitis</b> Tiere: 0 Viertel: 5 (3,97%)

Daraus ergibt sich unter Einbeziehung der Daten aus Tabelle 4-43 folgende Verteilung der Diagnosen auf die CMT-Scores. Für „KON“, „VMS“ und „Cowside“ wurden die Daten in die Gruppen CMT-Score 0 – 2 und 3 – 5 eingeteilt. Die CMT-Scores 0 - 2 erfassen die Proben mit einem Zellgehalt unter 100.000 Zellen/ml Milch und die CMT-Scores 3 – 5 die Proben mit einem Zellgehalt > 100.000 Zellen/ml Milch.

Tab. 4-60 Verteilung der CMT-Scores auf die Diagnosen in „KON“

Parameter		SCC			
Zellgehalt		< 100 000		> 100 000	
Diagnose (∑Prozentangabe/Diagnose)		1 = normale Sekretion	2 = latente Infektion	3 = unspezif. Mastitis	4 = Mastitis
	<b>CMT 0 – 2</b>	93,23	84,48	21,95	17,24
	<b>CMT 3 – 5</b>	6,77	15,52	78,08	82,76

Tab. 4-61 Verteilung der CMT-Scores auf die Diagnosen in „VMS“

Parameter		SCC			
Zellgehalt		< 100 000		> 100 000	
Diagnose (∑Prozentangabe/Diagnose)		1 = normale Sekretion	2 = latente Infektion	3 = unspezif. Mastitis	4 = Mastitis
	<b>CMT 0 – 2</b>	97,06	94,71	27,14	22,73
	<b>CMT 3 – 5</b>	2,94	5,29	72,86	77,27

Tab. 4-62 Verteilung der CMT-Scores auf die Diagnosen in „Cowside“

Parameter		SCC			
Zellgehalt		< 100 000		> 100 000	
Diagnose (∑Prozentangabe/Diagnose)		1 = normale Sekretion	2 = latente Infektion	3 = unspezif. Mastitis	4 = Mastitis
	<b>CMT 0 – 2</b>	83,19	78,72	3,70	0,00
	<b>CMT 3 – 5</b>	16,81	21,28	96,30	100,00

Unter Heranziehung der schon in Tabelle 4-36 vorgenommenen Einteilung in Melkintervalle (Melkintervallgruppen) wurden Berechnungen zur Untersuchung des Einflusses der ZMZ auf den Zellgehalt und die CMT-Reaktion der Proben durchgeführt.

Zunächst wurde innerhalb der Versuche „VMS“ und „Cowside“ eine Interaktion der ZMZ auf den Zellgehalt und den CMT geprüft.

Die Berechnung einer 1-faktoriellen Varianzanalyse für „VMS“ ergab keine signifikanten Unterschiede für die Ergebnisse von SCC und CMT-Reaktion zwischen den verschiedenen Melkintervallen.

Tab. 4-63 Signifikanzen zwischen den Ergebnissen von SCC und CMT-Reaktion der verschiedenen Melkintervalle im Versuch „VMS“

Melkintervalle	n	LOG <sub>SCC</sub> $\bar{X}$	CMT $\bar{X}$
MI 1 ( $\bar{X} = 4,87$ h)	146	4,47	0,75
MI 2 ( $\bar{X} = 7,91$ h)	405	4,44	0,82
MI 3 ( $\bar{X} = 11,68$ h)	404	4,41	0,94
MI 4 ( $\bar{X} = 15,25$ h)	74	4,29	0,76
MI 5 ( $\bar{X} = 20,93$ h)	11	4,77	1,86

Die 1-faktorielle Varianzanalyse für den Versuch „Cowside“ erbrachte wie schon im Versuch „VMS“ keine signifikanten Unterschiede für die Ergebnisse von SCC und CMT.

Tab. 4-64 Signifikanzen zwischen den Ergebnisse von SCC und CMT-Reaktion zu verschiedenen Melkintervallen im Versuch „Cowside“

Melkintervalle	n	LOG <sub>SCC</sub> $\bar{X}$	CMT $\bar{X}$
MI 1 ( $\bar{X}$ = 5,08 h)	69	4,32	2,11
MI 2 ( $\bar{X}$ = 7,99 h)	147	4,24	1,10
MI 3 ( $\bar{X}$ = 11,58 h)	159	4,29	1,52
MI 4 ( $\bar{X}$ = 15,20 h)	7	4,55	3,14

## 5 Diskussion

Der California-Mastitis-Test (CMT) ist momentan die am häufigsten angewandte Methode, um direkt am Tier – ohne Technik und großen personellen und zeitlichen Aufwand – den somatischen Zellgehalt und damit den Gesundheitszustand einzelner Euterviertel zu beurteilen (WIEDEMANN 2004).

Ziel der Untersuchung war es deshalb, die Aussagekraft des California Mastitis Tests als diagnostisches Werkzeug zur Abschätzung des Zellgehaltes im Viertelanfangsgemelk zu evaluieren. Zu diesem Zweck erfolgte unter anderem eine retrospektive Einteilung der Proben in einzelne Zellgehaltsgruppen, sowie eine Erfassung der CMT-Befunde unter Erweiterung der fünf von SCHALM 1960 definierten CMT-Scores auf sieben verschiedene CMT-Scores (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5).

Ferner wurden Untersuchungen zur Natur der CMT-Reaktion gemacht. Dabei wurde abgeklärt, welche Rolle kernhaltige Zellen bei der CMT-Reaktion haben, sowie die Fragestellung der Auswirkung unterschiedlicher Zellfraktionen bearbeitet.

Auch die Beprobung von Auktionstieren diente der Beurteilung der Sensitivität und Spezifität des CMT als diagnostisches Werkzeug zur Erkennung von Eutergesundheitsstörungen, gleichzeitig wurden Fragen zum Bereich möglicher Variationen der Eutergesundheit bei der Beprobung der Tiere auf dem Herkunftsbetrieb und während des Auktionsgeschehens analysiert.

Zusätzlich erfolgte der vergleichende Einsatz des CMT bei einem konventionellen und einem automatischen Melksystem unter Heranziehung weiterer Parameter zum Entzündungsnachweis wie elektrische Leitfähigkeit, NAGase-Aktivität, Zellgehalt (ermittelt via Fossomatic®) und Zellgehalt (ermittelt via DCC®).

## **5.1 Einfluss einer Ultraschallbehandlung der Proben auf das Ergebnis des CMT**

Mit der Anwendung einer Ultraschallbehandlung sollte geklärt werden, ob und wie sich die CMT-Reaktion nach Zerstörung der Zellen in der Milch und letztlich auch der Zerstörung der DNA in den Zellkernen verändert, bzw. welche Struktur der Zellen mit dem CMT-Reagenz reagiert.

Zwölf Milchproben (VAG) wurden in unbehandeltem Zustand, nach 10 sekündiger Ultraschallbehandlung und erneuter 10 sekündiger Ultraschallbehandlung geschalmt. Zehn ml jeder Probe vor den Ultraschallbehandlungen und 10 ml jeder Probe nach zweimaliger Ultraschallbehandlung dienten der Ermittlung des Gehaltes somatischer Zellen/ml Milch mittel Fossomatic®. Die Signifikanzen zwischen den CMT-Ergebnissen (Mittelwerte) und zwischen den via Fossomatic® ermittelten SCC-Ergebnissen (Mittelwerte, logarithmiert) wurden mittels T-Test für verbundene Stichproben bzw. 1-faktorieller Varianzanalyse berechnet. Hieraus ergaben sich folgende Beobachtungen:

1. Zwischen den Ergebnissen des CMT der unbehandelten Proben und des CMT nach einmaligem Ultraschall besteht ein signifikanter Unterschied (\*\*).
2. Zwischen den Ergebnissen des CMT der unbehandelten Proben und des CMT nach zweimaligem Ultraschall besteht kein signifikanter Unterschied (ns).
3. Zwischen den Ergebnissen des CMT nach einmaligem Ultraschall und des CMT nach zweimaligem Ultraschall besteht ein signifikanter Unterschied (\*\*).
4. Zwischen den Ergebnissen aus der Fossomatic® der noch nicht mit Ultraschall behandelten Proben und der Zellgehaltsbestimmung via Fossomatic® nach zweimaligem Ultraschall besteht ein signifikanter Unterschied (\*\*\*).

Die CMT-Scores nach einmaligem Ultraschall liegen signifikant höher als die Ergebnisse der unbehandelten Proben. Eine Erklärung hierfür ist die Zerstörung der Zellmembran der Milchzellen durch die Ultraschallbehandlung. Infolgedessen kann das CMT-Reagenz schneller und leichter Bindungen mit der DNA in den Zellkernen eingehen, als dies in der unbehandelten Milch der Fall ist.

Die CMT-Ergebnisse nach zweimaliger Ultraschallbehandlung unterscheiden sich signifikant von denen nach einmaliger Behandlung, aber nicht von den Ergebnissen der unbehandelten Proben. Hierzu lässt sich vermuten, dass die zweite Ultraschallbehandlung nicht nur die Zellmembranen der Milchzellen, sondern auch schon einen Teil der DNA der Milchzellen zerstörte, was die CMT-Reaktion schwächer als nach der ersten Ultraschallanwendung ausfallen lässt. Zerstörte, das heißt in kleinere Stücke zerlegte DNA, kann mit dem CMT-Reagenz kein Netz formen. In früheren Arbeiten konnte schon beobachtet werden, dass nur intakte DNA-Histon-Komplexe mit dem CMT-Reagenz ein Netz bilden, welches sich als positive CMT-Reaktion darstellt (WHYTE et al. 2005; NAGASWARARAO u. DERBYSHIRE 1969).

Das Ergebnis der Fossomatic<sup>®</sup> nach zweimaliger Ultraschallbehandlung fällt signifikant niedriger aus als der korrespondierende Wert von Milchproben ohne Ultraschall-Anwendung. Wenn man auch hier davon ausgeht, dass die zweite Ultraschallbehandlung schon einen Teil der DNA der Milchzellen zerstört hat, kann auch diese Beobachtung erklärt werden. Die Fossomatic<sup>®</sup> arbeitet nach fluoreszenzoptischem Prinzip, Ethidiumbromid färbt die DNA der Zellkerne an und fluoresziert unter UV- oder Laseranregung. DNA-Fragmente werden also zwar angefärbt, fluoreszieren aber wahrscheinlich ähnlich wie Bakterien oder Fettpartikel mit anderer Amplitude und werden daher nicht gezählt.

## **5.2 Vergleich der Reaktion von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten mit dem CMT-Reagenz**

Zur Durchführung dieses Versuches wurden aus sechs Blutproben von sechs verschiedenen Rindern PMN und Lymphozyten gewonnen. Aus den PMN- und Lymphozyten-Zellsuspensionen wurde jeweils eine Verdünnungsreihe hergestellt mit den gleichen Stufen für PMN und Lymphozyten. Nachdem jede Stufe der Verdünnungsreihe geschalmt wurde, konnte festgestellt werden, dass es in keiner Stufe signifikante Unterschiede im Mittelwert der CMT-Ergebnisse von PMN und Lymphozyten gibt. Diese Beobachtung ist vereinbar mit Angaben aus der Literatur, dass der CMT mit jeder kernhaltigen Zelle reagiert (CAROLL u. SCHALM 1962). Kernlose Zellen, wie zum Beispiel caprine cytoplasmatische Körperchen reagieren nicht mit dem CMT-Reagenz, hingegen wurde beobachtet, dass kernhaltige Erythrozyten von Vögeln mit dem CMT-Reagenz zu einer Gelbildung führten (CARROL u. SCHALM 1962; JAARTSVELD 1963).

SCHALM und NOORLANDER (1957) erklärten die CMT-Reaktion mit der Zerstörung der Zellmembranen der Zellen durch das Detergens, dem Aufbrechen der Bindungen des freigesetzten korpuskulären Proteins mit anschließender Verbindung von Protein und Reagenz. WHITTLESTONE und De LANGEN (1965) postulierten, dass der CMT mit dem DNA-Gehalt der Milch korreliert. Daraus kann gefolgert werden, dass der CMT mit PMN und Lymphozyten in gleicher Weise reagiert, da beide, mit in diesem Falle zu vernachlässigenden Ausnahmen, den gleichen DNA-Gehalt aufweisen.

Der hier durchgeführte Vergleich der CMT-Reaktion mit Lymphozyten bzw. PMN befindet sich im Einklang mit diesen Aussagen, dass als Reaktionspartner des CMT-Reagenz die DNA der Zelle, unabhängig von der kernhaltigen Zellart, dient.

### 5.3 Zellvitalität

Es wurde der Fragestellung nachgegangen, ob die Intensität der CMT-Reaktion von der Vitalität der Milchzellen abhängt. In vorangegangenen Versuchen wurde bereits nachgewiesen, dass die CMT-Reaktion an Zellen mit intakter DNA geknüpft ist, und dass es keine Rolle spielt, welche Zellfraktion den Zellgehaltsanstieg der Milch ausmacht (PMN oder Lymphozyten). Mit den Ergebnissen des Zellfraktionsvergleichs (Versuch 4.1.2) im Hintergrund, konnte bei der Untersuchung der Zellvitalität beispielhaft für weitere Abwehrzellen eine Fokussierung auf PMN erfolgen, welche zudem auch die größte Zellfraktion im Rahmen der Immunabwehr des bovinen Euters ausmachen (BURVENICH et al. 1994). Ihre Vitalität wurde in diesem Versuch via Durchflusszytometrie (FACS®) untersucht.

Würden signifikante Abweichungen im CMT-Ergebnis vorliegen – je nachdem ob ein hoher Anteil vitaler oder toter Zellen in der Probe enthalten ist, so wäre eine Erweiterung des CMT-Einsatzes denkbar: Eine Ermittlung des Zellgehalts durch eine direkte Methode und der CMT könnten kombiniert werden, um eine Aussage über das Stadium der Entzündung zu erhalten – so ist bekannt, dass ein hoher Anteil vitaler Granulozyten auf eine beginnende Entzündung hinweist (BURVENICH et al. 1994).

In den eigenen Untersuchungen wurde der Farbstoff SYTO® 13 eingesetzt, welcher sowohl vitale als auch tote eukaryotische Zellen über die Bindung an DNA anfärbt (MOLECULAR PROBES 2003). Im Durchflusszytometer unterscheiden sich die so gefärbten Zellen (PMN) indem der Laserstrahl Variationen in seiner Ablenkung zeigt – je nachdem, ob tote oder vitale PMN vorliegen (KÖß 2004). Auf diese Weise konnte ermittelt werden, zu welchem Anteil vitale bzw. tote PMN in den jeweiligen Milchproben vorhanden waren. Trotz unterschiedlicher Fraktionsverteilung ergab sich keine statistisch absicherbare Auswirkung der Vitalität der Zellen auf das CMT-Ergebnis. Die Einteilung in Zellgehaltsgruppen gibt zu erkennen, dass auch das Zellgehaltsniveau keine signifikanten Auswirkungen hinsichtlich Vitalität von PMN und Lymphozyten ausübt bzw. deren korrespondierenden CMT-Reaktionen zeigt.

Demnach ist ein Einsatz des CMT zur Bewertung des Entzündungsstadiums, unter Berücksichtigung der Interaktion spezieller Zellfraktionen (z.B. PMN, Lymphozyten), nicht umsetzbar.

Da die Zellvitalität keine Auswirkungen auf das CMT-Ergebnis hat, lässt sich damit erklären, dass im Zuge des Zelluntergangs – ob Apoptose oder Nekrose – erst im finalen Stadium die DNA in kleine Stücke zerfällt (KÖß 2004). Ist dieses Stadium erreicht, werden die Zellen im Durchflusszytometer nicht mehr als PMN erkannt.

Wie bereits nachgewiesen wurde, reagiert der CMT mit den Zellen in der Milch nur dann, wenn diese intakte DNA enthalten. Da letztere sowohl in vitalen als auch in toten Zellen (bis zur Karyorrhesis) vorhanden ist, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im CMT-Ergebnis. Erst die Fragmentierung der DNA im Stadium des Zelluntergangs beeinflusst die CMT-Reaktion derart, dass das CMT-Reagenz mit den sich dann frei beweglichen DNA-Fragmenten kein Gel mehr ausbilden kann. Damit wird deutlich, dass die im Durchflusszytometer erkannte Fraktion toter Zellen via CMT nicht von vitalen Zellen unterschieden werden kann, da die DNA trotz Zelluntergangs zu einem hohen Prozentsatz noch intakt ist.

#### **5.4 Reagenzien verschiedener Hersteller**

Es wurden fünf verschiedene CMT-Reagenzien verglichen, um Unterschiede der zellzahlniveauabhängigen Reaktion zu überprüfen. Es sollte festgestellt werden, ob die Wahl des Reagenzes einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis des CMT hat. Um einen differenzierteren Vergleich durchführen zu können, wurden die Proben zunächst anhand ihrer Zellzahl/ml in Gruppen eingeteilt.

Schon bei der Betrachtung der Mittelwerte in den einzelnen Zellzahlgruppen (1 – 5) und über alle Zellzahlgruppen hinweg, fällt auf, dass sich die Reagenzien in der CMT-Reaktion unterscheiden, was sich statistisch sichern ließ. Dieses Ergebnis widerspricht Angaben aus der Literatur, in denen der Einfluss des Reagenzes auf das CMT-Ergebnis als nicht signifikant bezeichnet wurde (HAMANN et al. 2005).

Eine Ausnahme bilden Reagenzien B und C, die sich außer in Zellzahlgruppe 5 in ihren Ergebnissen nie signifikant unterscheiden. Des Weiteren lassen sich durchweg niedrige CMT-Scores bei Reagenz D erkennen, während Reagenz E immer das höchste CMT-Ergebnis stellt. Reagenzien A, B und C liegen in jeder Zellzahlgruppe und über alle Zellzahlgruppen hinweg, relativ gleichmäßig zwischen den beiden Extremen D und E (Abb. 4-7). Der retrospektive Vergleich der CMT-Ergebnisse mit den mittleren Zellgehalten/ml zeigt, dass trotz einheitlichem CMT-Scores für jedes Produkt, die Grenze unter/über 100.000 Zellen/ml variiert: Für die Reagenzien A, C und E liegt sie zwischen CMT-Score 2 und 3, für Reagenz D zwischen 0 und 0,5 bzw. Reagenz B schließlich zwischen 1 und 2.

In Tabelle 5-1 sind die in den jeweiligen Zellzahlgruppen vorgekommenen CMT-Scores der verwendeten Reagenzien aufgeführt.

Tab. 5-1 Häufigkeitsverteilungen der CMT-Scores in den Zellzahlgruppen

Zellzahlgruppen	CMT-Score	CMT-Score	CMT-Score
Zellzahlgruppe 1 (1 – 50 Zellen *10 <sup>3</sup> /ml)	0,5 ( 80%)	0 (20%)	-
Zellzahlgruppe 2 (51 – 100 Zellen *10 <sup>3</sup> /ml)	1 (60%)	0,5 (20%)	3 (20%)
Zellzahlgruppe 3 (101 – 200 Zellen *10 <sup>3</sup> /ml)	3 (60%)	1 (20%)	4 (20%)
Zellzahlgruppe 4 (200 – 400 Zellen *10 <sup>3</sup> /ml)	4 (80%)	5 (20%)	-
Zellzahlgruppe 5 (> 400 Zellen *10 <sup>3</sup> /ml)	5 (80%)	4 (20%)	-

Trotz Unterschiede der Reagenzien, lässt sich demnach feststellen, dass mit steigendem Zellgehalt/ml auch der Ausfall der CMT-Reaktion stärker wird und damit auch der CMT-Score zunimmt (Abbildung 4-10) (SCHALM 1960 und RASSMUSSEN 2002).

Die Korrelationen der einzelnen Reagenzien mit dem Zellgehalt/ml über alle Zellgehaltsgruppen hinweg, liegen zwischen 0,6 (Reagenz D) und 0,86 (Reagenz E). Diese zu den in den einzelnen Zellzahlgruppen vergleichsweise hohen Korrelationskoeffizienten kommen durch die in der Gesamttendenz gleichmäßig ansteigenden Datenwolken zustande. Ausreißer beeinträchtigen den Korrelationskoeffizienten innerhalb der einzelnen Gruppen stärker und führen dort somit zu niedrigeren Ergebnissen für die einzelnen Gruppen als für die Gesamtpopulation. In der Zellzahlgruppe 2 (50.000 – 100.000/ml) hat Reagenz C den höchsten Korrelationskoeffizienten (0,37), in Zellzahlgruppe 3 (100.000 – 200.000/ml) stellt Reagenz A den höchsten Wert (0,49).

Zuletzt wurde für jedes Reagenz eine Vier-Felder-Korrelation berechnet. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aller Reagenzien wurde als Grenze für den CMT  $CMT < 0,5$  als CMT negativ und  $CMT \geq 0,5$  als CMT positiv gewählt. Daraus lassen sich die Sensitivität, Spezifität und der Youden-Index berechnen. Im Mittel liegt die Sensitivität aller Reagenzien bei 90,58%, wobei hier die Sensitivität von Reagenz D (66,94%) das Mittel stark erniedrigt. Lässt man Reagenz D aus der Mittelwertsberechnung für die Sensitivität heraus, so erhält man eine mittlere Sensitivität von 96,49%. Die Spezifität ist bei Reagenz D am größten, was schon bei Betrachtung der Sensitivität zu erwarten war. Die Spezifität aller Reagenzien im Mittel ist 67,39%, ohne Reagenz D 64,29%. Aus Sensitivität und Spezifität lässt sich der Youden-Index berechnen, dieser ist bei Reagenz B am höchsten und bei Reagenz D am niedrigsten. Der Youden-Index vereinbart die Aussage von Sensitivität und Spezifität in einem Wert, optimal wäre ein Ergebnis von 100%. Die angegebenen Werte für Sensitivität, Spezifität und Youden-Index bewegen sich auf dem Niveau veröffentlichter Ergebnisse (REDETZKY et al. 2005, 2006; HAMANN et al. 2005).

Nach Auswertung dieses Versuches lässt sich feststellen, dass für jedes CMT-Reagenz bei Anwendung von Tierärzten in der Praxis, eine Score-Einteilung möglich ist. Der Umfang dieser Einteilung von negativ (0), zweifelhaft (0,5), schwach positiv (1), positiv (2) und stark positiv (SCHALM 1960) oder mehr Stufen: negativ (0) – Gallerte (5) bzw. Flocken (6) (eigene Untersuchungen), sollte unter Praxisbedingungen jedoch auf CMT negativ (0) und CMT positiv (+) beschränkt werden, da für den Praktiker nur die Überschreitung des Grenzwertes bei 100.000 Zellen/ml Milch von Bedeutung ist und eine differenziertere Einteilung keinen praktischen Nutzen besitzt. Erwähnenswert ist jedoch, dass es unter Verwendung des CMT-Scores von 0 – 5 (6) möglich war, Zellgehalte von ca. 12.000 Zellen/ml mittels CMT festzustellen. Dies widerlegt Angaben aus der Literatur und sogar Beschriftungen von Verpackungen der Reagenzien, in denen als unterste erfassbare Grenze 200.000 bzw. 500.000 Zellen/ml (SCHALM 1960; MARSHALL et al. 1993; NMC 1999; JENSEN 1957) angegeben werden. Diese Angaben werden verbreitet, um eine Irritation des Tierhalters weitgehend zu vermeiden, der bei positivem Reaktionsausfall von niedrigzelligen Proben (< 100.000) keine Interpretation vorzunehmen vermag. Es ist somit zu empfehlen, grundsätzlich das gleiche Reagenz zu benutzen und sich zu „eichen“, d.h. zu testen, ab welchem CMT-Ergebnis auch der Zellgehalt/ml über 100.000 liegt, indem man die mittels CMT erfassten Daten mit Daten aus der direkten Zellzählung (z.B. Fossomatic®) vergleicht. Derartige Studien werden überwiegend landwirtschaftlichen Beratern und Tierärzten vorbehalten bleiben. Die Wahl des Reagenzes ist von subjektiven Empfindungen beeinflusst, es sollte jedoch bedacht werden, dass einige Reagenzien auf dem Markt infolge deutlicherer Viskositätsänderung besser geeignet sind als andere. Auch hängt die Wahl des Reagenzes von der Erwartung an den CMT ab. Will der Praktiker zum Beispiel ein Herden-Screening mittels CMT durchführen und alle CMT-positiven Viertel danach noch zytobakteriologisch untersuchen lassen, so wäre Reagenz E geeignet, da es 100% Sensitivität besitzt, alle Viertel mit erhöhtem Zellgehalt herausfindet und der Nachteil der niedrigeren Spezifität durch die zytologisch-mikrobiologische Nachuntersuchung ausgeglichen würde, also alle fälschlich als positiv geschalteten Viertel durch die Zytobakteriologie erkannt würden. Für die von

weiteren Diagnostikmethoden isolierte Nutzung, wäre ein CMT mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität, ausgedrückt durch den Youden-Index, die beste Wahl – in den eigenen Untersuchungen also Reagenz B.

## **5.5 Eutergesundheit von Auktionstieren**

Es wurde die Sensitivität und Spezifität des CMT als alleinigem diagnostischem Kriterium zur Erkennung von Eutergesundheitsstörungen von Auktionstieren geprüft. Der bisherige Einsatz des CMT im Rahmen der tierärztlichen Untersuchung auf Auktionen, steht in der Kritik der Landwirte. So wurde häufig angenommen, dass ein Tier auf dem Herkunftsbetrieb noch gesund war, während der Auktion vom Tierarzt hingegen als euterkrank eingestuft wurde. Um diesen Sachverhalt zu analysieren, wurden neben dem CMT in den eigenen Untersuchungen die elektrische Leitfähigkeit, NAGase-Aktivität und der Zellgehalt/ml (Fossomatic®) als weitere Parameter untersucht. Der Zellgehalt/ml diente in diesem Versuch als Referenz für die übrigen Parameter.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der verschiedenen Probenahmen zeigte der Zellgehalt pro ml Milch die Tendenz, nach der Probenahme auf dem Betrieb (PB) abzusinken und in PA2 wieder anzusteigen, ohne den Wert von PB zu erreichen. Diesem Trend folgen die Ergebnisse des CMT und der NAGase. Die elektrische Leitfähigkeit stieg von Probenahme zu Probenahme an.

Wie auch schon in einem der Laborversuche, wurden auch in diesem Versuch retrospektiv die Gehalte somatischer Zellen für die CMT-Scores berechnet. Die Grenze unter bzw. über 100.000 Zellen/ml liegt zwischen CMT-Score 2 und 3. Im Folgenden wurde zur Berechnung der Vier-Felder-Korrelation allerdings die Grenze bei CMT-Score 0,5 gesetzt. Erst im Zusammenhang mit den bakteriologischen Befunden wurde die Grenze, die sich aus der retrospektiven Berechnung der Zellgehalte für die CMT-Scores ergab (d.h.  $\leq 2$ : CMT negativ,  $> 3$ : CMT positiv) verwendet.

Aus der Berechnung der Vier-Felder-Korrelation ergibt sich im Mittel über alle drei Probenahmen für die Sensitivität ein Wert von 95,76% für die Spezifität ein Wert von 87,14%. Diese Werte sind im Vergleich zu Angaben aus der Literatur, vor allem für die Spezifität deutlich höher (REDETZKY et al. 2005). Für den Youden-Index ergibt sich ein Wert von 82,90%, ebenfalls im Vergleich zu Werten aus der Literatur (63,60%) höher. Die Vier-Felder-Korrelation der übrigen Parameter zeigt, dass der Youden-Index der elektrischen Leitfähigkeit nur etwa halb so groß (39,61%) wie der des CMT ist, dieser Wert liegt auf dem gleichen Niveau, wie die Angaben von HAMANN et al. 2004 (39,20%). Der Youden-Index der NAGase beträgt sogar nur 23,34%.

Der Vorteil des CMT ergibt sich aus der indirekten Zellgehaltsbestimmung, die eine entsprechende Zellgehaltsveränderung besser wiederzugeben vermag, als die Entzündungsparameter elektrische Leitfähigkeit und NAGase.

Die Betrachtung der Korrelationen von SCC mit den Parametern elektrische Leitfähigkeit, NAGase und CMT, zeigt durchgehend die höchsten Korrelationen zwischen SCC und CMT. Dies bestätigt die Aussage von SCHALM und NOORLANDER (1957), dass die CMT-Reaktion mit steigendem Zellgehalt/ml Milch zunimmt. In PB und PA1 korreliert die NAGase stärker als die elektrische Leitfähigkeit, während in PA2 eine höhere Korrelation von EL und SCC als von NAGase und SCC zu beobachten ist.

Unter Einbeziehung der an den einzelnen Probenahmen erhobenen bakteriologischen Befunde wurden die Proben vier Diagnosen zugeordnet: normale Sekretion (1), latente Infektion (2), unspezifische Mastitis (3) und Mastitis (4). Danach ergibt sich folgende Verteilung der Viertel:

Tab. 5-2 Prozentuale Verteilung der Diagnosen

Diagnosen	PB	PA1	PA2	Tendenz
<b>Normale Sekretion (1)</b>	64,61%	70,07%	69,54%	↕
<b>Latente Infektion (2)</b>	24,12%	22,01%	22,71%	↕
<b>Unspezifische Mastitis (3)</b>	3,70%	2,46%	2,30%	↓
<b>Mastitis (4)</b>	6,34%	4,05%	5,11%	↕

Die deskriptive Bewertung der zytobakteriologischen Befunde in Tabelle 5-2 berücksichtigt nicht die Dynamik des Eutergesundheitsgeschehens zwischen den Probenahmen PB, PA1, PA2. In Abbildung 5-1 ist ausgehend von den zytobakteriologischen Befunden der PB die Verschiebung der Besetzung von Eutergesundheitskategorien über den Zeitraum PB – PA2 zu erkennen.

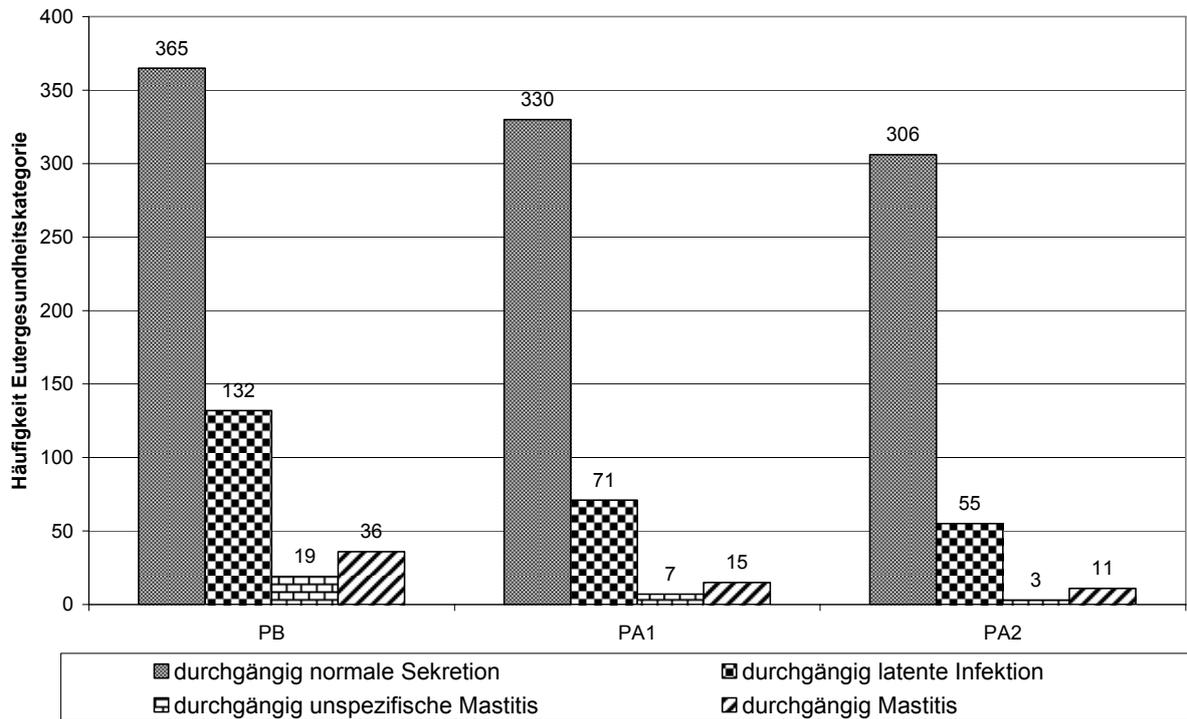


Abb.5-1 Verschiebung der Besetzung von Eutergesundheitskategorien über den Zeitraum PB – PA2

Die DVG empfiehlt für die Feststellung einer Mastitisiagnose eine mindestens dreimalige Probenentnahme von Viertelanfängsgemelken zur zytobakteriologischen Befunderhebung. Damit soll insbesondere erreicht werden, dass nur ein zweimaliger Nachweis eines identischen Erregers zur Diagnose Mastitis bzw. latente Infektion führt. Die in Abbildung 5-1 offensichtliche Änderung der Besetzung der Eutergesundheitskategorien macht deutlich, dass im Zeitverlauf weniger Stunden (26 h) eine erhebliche Variation des Eutergesundheitsstatus auftreten kann. Trotz dieser Einschränkungen kann mit Hilfe des CMT eine im Mittel über Sensitivität von 95,76%, und Spezifität von 87,14% liegende Präzision ausgedrückt in Youden-Index von 82,60% erreicht werden.

Wenngleich eine abschließende Interpretation hierzu kaum gegeben werden kann, ist vermutlich überwiegend der im Mittel ca. 70% betragende Anteil an Vierteln mit normaler Sekretion als auch das unter Berücksichtigung der Gesamtheit aller Proben niedrige zytologische Niveau ( $\bar{X} = 58,45 \times 1000/\text{ml}$ ) der Viertelanfangsgemelke von Färsen für die oben genannten Zusammenhänge verantwortlich zu machen.

Darüberhinaus muss auch an mögliche Interaktionen zwischen langen Melkzeitintervallen (da die Färsen zu PA1 und PA2 ungemolken waren) und Reaktionsmechanismus des CMT erinnert werden.

Unter Anwendung der Grenze zwischen CMT-Score 2 (CMT = negativ) und CMT-Score 3 (CMT = positiv) wurde schließlich die prozentuale Verteilung der Diagnosen betrachtet (Tabelle 4-34). Hierbei erkennt der CMT 97,77% der Viertel mit normaler Sekretion (Diagnose 1) als negativ. Viertel mit positivem bakteriologischem Befund aber Zellgehalt  $< 100.000$  erkennt der CMT zu 91,73% als negativ, da er durch den Zellgehalt, nicht aber durch Keime in der Milch beeinflusst wird. 69,11% aller Viertel mit unspezifischer Mastitis und 77,15% aller Viertel mit Mastitis erkennt der CMT als positiv. Aus der Verteilung der Diagnosen ist ersichtlich, dass die Erhöhung der Grenze CMT positiv/CMT negativ von 0,5 auf 2 zu einer Erhöhung der Spezifität, aber auch zu einer Erniedrigung der Sensitivität führt.

Desweiteren sollte untersucht werden, welche Erreger im Rahmen der Auktion bei den Erstkalbinnen nachgewiesen werden konnten. Hierbei ist festzustellen, dass bei 63,73% aller Viertel mit latenter Infektion und 72,25% aller Viertel mit Mastitis KNS als Erreger nachgewiesen wurden. Im Vergleich dazu wurden nur bei 3,58% aller Viertel mit latenter Infektion und 15,55% aller Viertel mit Mastitis *S. aureus* als Erreger nachgewiesen. Dies entspricht Angaben aus der Literatur, in denen KNS ebenfalls als häufigste nachgewiesene Erreger bei Mastitiden von Erstkalbinnen beschrieben wurden (OLIVER u. MITCHELL 1983; TRINIDAD et al. 1990; WILDMANN et al. 1990; PANKEY et al. 1991; COOK u. FIEZ 1992; NICKERSON et al. 1995).

Von 365 Vierteln in PB der Kategorie „normale Sekretion“ zeigten nur 35 Viertel eine Veränderung im Hinblick auf „latente Infektion“ (32 Viertel) oder „unspezifische Mastitis“ (3 Viertel). Dies widerlegt die Befürchtung von Landwirten, dass eutergesunde Tiere plötzlich während der Auktion krankhafte Befunde aufweisen. Zudem hätten von den 37 Vierteln, bei denen dieses Phänomen auftrat, nur 5 durch den CMT erkannt werden können, da Viertel, die in der zweiten Probenahme eine latente Infektion aufwiesen, durch den CMT nicht erfasst werden. Diese Ergebnisse lassen sich mit Beschreibungen von HAMANN und REICHMUTH (1992) untermauern, dass nur vorgeschädigte Viertel unter Stress krankhafte Befunde aufweisen, gesunde Viertel hingegen gesund bleiben. Das Auftreten krankhafter Viertelbefunde im Rahmen der Auktion, ist demnach Ausdruck einer schon bestandenen Schädigung, die aber durch die Landwirte, vor der Untersuchung im Rahmen der Auktion, nicht erkannt worden war.

Ferner konnte während des Versuches nicht beobachtet werden, dass der Zellgehalt/ml oder der CMT morgens auf der Auktion im Mittel höhere Werte aufwies als am Abend zuvor im Herkunftsbetrieb (siehe Tabelle 4-19).

Zuletzt wurde der Einfluss der ZMZ auf den Zellgehalt und den CMT-Score der Proben untersucht. Von den in Tabelle 4-34 definierten MI-Gruppen waren innerhalb dieses Versuches nur MI 2 – MI 5 vertreten, wobei in ZMZ 1 nur MI 2 und MI 3, in ZMZ 2 MI 3 und MI 4 und in ZMZ 3 MI 4 und MI 5 vorkamen. Die Berechnung der Signifikanzen für SCC bzw.  $\text{LOG}_{\text{SCC}}$  und CMT ergab voneinander abweichende Ergebnisse: Für den CMT konnten in keiner ZMZ Signifikanzen zwischen den Ergebnissen der MI-Gruppen festgestellt werden, es kann also nicht beantwortet werden, inwiefern die ZMZ Einfluss auf CMT-Ergebnisse hat. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die  $\text{LOG}_{\text{SCC}}$ -Ergebnisse von MI 2 und MI 3 in ZMZ 1 sowie MI 3 und MI 4 in ZMZ 2 jeweils signifikant voneinander. Nur zwischen den Ergebnissen von  $\text{LOG}_{\text{SCC}}$  zwischen MI 4 und MI 5 konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Dies bedeutet also für den Zellgehalt auf dem hier vorliegenden Niveau ( $\bar{X} = 58,45 \times 100.000$  Zellen/ml), dass es von einem MI von 15 Stunden (MI 4) keinen Unterschied zu noch längeren Melkintervallen gibt.

Die Berechnung der Signifikanzen zwischen den SCC- und CMT-Ergebnissen von Tieren mit ansteigendem Melkintervall von ZMZ zu ZMZ (siehe Tabelle 4-36) ergab für den Zellgehalt und den CMT jeweils signifikante Unterschiede zwischen den Melkintervallen. Da durch diese Berechnung aber nicht beurteilt werden konnte, ob die signifikanten Unterschiede der Ergebnisse durch die Länge der Melkintervalle oder durch die unterschiedlichen Bedingungen der verschiedenen Probenahmen (PB, PA1 und PA2) verursacht wurden, sollten zuletzt ZMZ mit gleichen Melkintervallen mittels T-Test auf signifikante Unterschiede untersucht werden. Hier konnten weder für  $\text{LOG}_{\text{SCC}}$  noch für den CMT signifikante Unterschiede festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die im Vergleich der Tiere mit ansteigendem Melkintervall von ZMZ zu ZMZ beobachteten Unterschiede zumindest zum Teil auch durch die ZMZ hervorgerufen wurden, da bei gleich bleibendem Melkintervall keine Unterschiede festzustellen waren.

Die Hauptfragestellung dieses Versuches, ob der CMT als „TÜV“ für die Eutergesundheit von Auktionstieren dienen kann, kann positiv beantwortet werden. Ein idealer diagnostischer Test hätte eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Mit einer Sensitivität von 95,76%, einer Spezifität von 87,14% und einem Youden-Index von 82,60% erreicht der CMT bereits vergleichsweise hohe Werte. Für die Auswahl des Testverfahrens ist eine hohe Sensitivität von größter Bedeutung, da unentdeckte, mit kontagiösen Erregern infizierte Viertel, das Risiko von Neuinfektionen erhöhen (REDETZKY et al. 2005).

BERCHTHOLD et al. empfahlen bereits 1973 den CMT als Mittel zur Diagnostik von Störungen der Eutergesundheit beim Handel mit laktierenden Kühen in der Schweiz. Sie wiesen allerdings auf die Notwendigkeit einer anschließenden bakteriologischen Untersuchung der CMT-positiven Viertel hin, um eine genaue Diagnose für jedes Viertel zu erhalten. Bis zum Erhalt der bakteriologischen Vierteldiagnosen sollte die „Währschaftsfrist“ verlängert werden. Das heißt der Käufer hat das Recht ein Tier zurückzugeben, sollte es bei der bakteriologischen Untersuchung eines CMT-positiven Tieres zu ebenfalls positiven Befunden kommen. Ein ähnliches Vorgehen nach positiven CMT-Befunden könnte auch für den Einsatz des CMT im Rahmen der

Diagnostik der Eutergesundheit von Auktionstieren in Deutschland angedacht werden.

## **5.6 Vergleichende Prüfung der diagnostischen Aussagekraft des California Mastitis Tests mit weiteren Verfahren zur Messung von Entzündungskriterien der bovinen Milchdrüse unter Bedingungen des automatischen Melkens**

Es wurden verschiedene Parameter zum Entzündungsnachweis der bovinen Milchdrüse parallel angewandt. Besonderes Augenmerk soll dem CMT – als indirekte Methode zur Zellgehaltsbestimmung – und dem im DCC<sup>®</sup> gemessenen Zellgehalt/ml – als direkte Methode zur Zellgehaltsmessung – gelten.

Zunächst wurden, wie in den zuvor beschriebenen Versuchen, die den CMT-Scores entsprechenden Gehalte somatischer Zellen/ml zur besseren Einordnung des CMT berechnet. Somit liegt die Grenze des Zellgehalts größer bzw. kleiner 100.000/ml im „KON“- , „VMS“- und „Cowside“ -Versuch zwischen CMT-Score 2 und 3. Dies entspricht der Grenze im Feldversuch 4.2.1 und den Grenzen der Mehrzahl der Reagenzien im Versuch zum Reagenzienvergleich.

Im Folgenden werden jeweils Mittelwerte aus den Versuchen: „KON“, „VMS“ und „Cowside“ angegeben.

Die Berechnung der Korrelationen der Parameter mit dem Zellgehalt/ml (Fossomatic<sup>®</sup>) erbrachte den höchsten Wert für das DCC<sup>®</sup> (0,81), die nächst höhere Korrelation ist die des CMT (0,69), die Korrelationskoeffizienten der elektrischen Leitfähigkeit (0,47) und der NAGase (0,52) liegen deutlich niedriger.

Zum Vergleich von Sensitivität, Spezifität und Youden-Index der Parameter wurden Vier-Felder-Korrelationen berechnet.

Die höchsten Befunde erreichte das DCC<sup>®</sup> (Sensitivität 94,57%; Spezifität 94,42%; Youden-Index 88,99%). Auf gleichem Niveau befinden sich von HAMANN et al. (2004) und REDETZKY et al. (2006) beschriebenen Befunde.

Die Präzision des CMT folgt der des DCC<sup>®</sup> (Sensitivität 90,84%; Spezifität 76,32%; Youden-Index 67,16%). Auch hier beschreiben HAMANN et al. (2004; 2005) und REDETZKY et al. (2006) ähnliche Ergebnisse für Sensitivität, Spezifität und Youden-Index des CMT. Die „Schwäche“ des CMT im Vergleich zum DCC<sup>®</sup> liegt vor allem in seiner Spezifität. Durch die Wahl der Grenze positiv/negativ bei CMT-Score 0,5 wird zwar ein guter Prozentsatz der „richtig positiven“ Viertel erfasst, dies geht aber zu Lasten der Spezifität, da auch ein Teil der „negativen“ Viertel als positiv bewertet wird.

Die elektrische Leitfähigkeit erreicht mit einer Sensitivität von 70,01% und einer Spezifität von 71,60% einen deutlich niedrigeren Youden-Index (41,61%) als der CMT. Vergleichbare Angaben zu Sensitivität, Spezifität und Youden-Index der elektrischen Leitfähigkeit machen REDETZKY et al. (2006).

Mit einer geringfügig höheren Sensitivität (72,02%) als die elektrische Leitfähigkeit, aber einer sehr niedrigen Spezifität (32,00%) liegt der Youden-Index der NAGase nur bei 4,02%. In der Arbeit von SCHÜTTEL (1999) wird die Sensitivität mit einem Wert von – je nach Setzung des Grenzwertes (1,02 oder 1,04) – 78,2% bzw. 68,7% angegeben. Für die Spezifität wurden 64,4% bzw. 80% angegeben. In den eigenen Untersuchungen wurde ein Referenzbereich von 1,1 – 2,8 nmol x ml<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> für die Berechnung der Vier-Felder-Korrelation eingesetzt, was die von den Angaben in der Arbeit von SCHÜTTEL (1999) zum Teil abweichenden Ergebnisse von Sensitivität und Spezifität zum Teil erklärt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Nachweis erhöhter Zellgehalte, ob direkt (DCC<sup>®</sup>) oder indirekt (CMT), im Gegensatz zu anderen Entzündungsindikatoren wie der elektrischen Leitfähigkeit und der NAGase eine höhere diagnostische Sicherheit besitzt. Die Vorteile des DCC<sup>®</sup> - höhere Sensitivität und Spezifität und einfache, nicht subjektiv beeinflussbare Anwendung - wird zu einem nicht unerheblichen Teil in der Praxis durch den Vorteil des CMT - kostengünstige Anwendung - aufgehoben, da eine breitflächige Anwendung des DCC<sup>®</sup> mit einem Preis von ca. 1,50 Euro pro DCC<sup>®</sup>-Kassette an die Grenze eines Kosten-Nutzen-Verhältnisses stößt.

Zur Untersuchung der Interaktion von SCC- und CMT-Befunden mit Melkzeitintervallen wurden jeweils Varianzanalysen für die Versuche „VMS“ und „Cowside“ durchgeführt. Die Berechnung einer 1-faktoriellen Varianzanalyse ergab für SCC und CMT innerhalb beider Versuche keine signifikanten Unterschiede zwischen den Melkintervallgruppen. Betrachtet man die Mittelwerte für SCC und CMT beider Versuche, so fällt auf, dass das längste Melkintervall (MI 5 bzw. für Cowside MI 4) jeweils die höchsten Werte zeigt, gefolgt von denen des kleinsten Melkintervalls (MI 1) (außer  $\bar{X}$  des CMT im „VMS“-Versuch). Diese Beobachtung entspricht Angaben aus der Literatur (REINECKE 2002; HALM 2003; SCHRIDDE 2006), dass ein Melkintervall unter sechs Stunden zu erhöhten Zellzahlen führt. Einen noch stärkeren Effekt auf den Zellgehalt zeigt ein Melkintervall von über zwanzig („VMS“) bzw. über fünfzehn Stunden („Cowside“). Die Ergebnisse des CMT folgen allerdings nur zum Teil den Tendenzen des SCC, was zu erwarten war, da die Ergebnisse des CMT nicht vollständig mit denen des SCC korrelieren.

## 6 Zusammenfassung

Diane Kleinschmidt : Zu Wirkungsmechanismus und Aussagefähigkeit des California Mastitis Tests unter besonderen Berücksichtigung der Eutergesundheitsbeurteilung von Auktionstieren

Im Rahmen der Studie sollten Aussagen über den Wirkungsmechanismus der CMT-Reaktion (1. – 4.) und die Präzision des Tests unter Praxisbedingungen (5., 6.) erarbeitet werden.

Folgende Teilaspekte wurden untersucht:

1. Einfluss des Zustandes der DNA geschalteter Zellen auf die CMT-Reaktion
2. Einfluss der Zellfraktion (PMN/Lymphozyten) auf die CMT-Reaktion
3. Einfluss der Zellvitalität auf die CMT-Reaktion
4. Einfluss der Reagenzienwahl auf die CMT-Reaktion
5. Präzision des CMT als Screeningmethode zur Eutergesundheitsbeurteilung von Auktionstieren
6. Präzision des CMT unter Bedingungen konventionellen und automatischen Melkens unter Berücksichtigung weiterer Entzündungsparameter

1. **Zustand DNA:** Durch eine Ultraschallbehandlung wurden die Membranen der Milchzellen zerstört, wodurch es zu einem stärkeren Ausfall ( $p = 0,0026$ ) der CMT-Reaktion im Vergleich zur Reaktion der unbehandelten Proben kam. Eine zweite Behandlung führte zur teilweisen Fragmentierung der DNA, was wiederum eine abgeschwächte – mit der Ausgangsprobe vergleichbare ( $p = 0,51$ ) - CMT-Reaktion hervorrief. Daraus lässt sich folgern, dass nur intakte

DNA-Stränge mit dem CMT-Reagenz zu einer Netzbildung, d. h. zu einer sichtbaren Reaktion führen.

- 2. Zellfraktion:** Nach Gewinnung von PMN und Lymphozyten aus Rinder-Blut und Erstellung von Verdünnungsreihen, wurden die Zellfraktionen vergleichend geschalmt. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied in der Reaktion von Lymphozyten bzw. PMN mit dem CMT Reagenz festgestellt werden.
- 3. Zellvitalität:** Es wurden VGH geschalmt und die Vitalität der enthaltenen Zellen anschließend im Durchflusszytometer (FACS<sup>®</sup>) bestimmt. Ein Einfluss der Zellvitalität auf die verschiedenen CMT-Scores in den Zellgehaltsgruppen konnte nicht beobachtet werden.
- 4. Reagenzienvergleich:** Dreihundertneunundfünfzig VGH wurden mit fünf verschiedenen Reagenzien geschalmt und die CMT-Ergebnisse unter Verwendung einheitlicher Scores (8 Stufen von 0, 0,5, 1, 2 – 6) verglichen. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen den CMT-Ergebnissen der Reagenzien (Ausnahme Reagenz B und C) über alle Zellgehaltsgruppen hinweg erfasst werden.
- 5. Präzision und Eignung als Screeningmethode zur Eutergesundheitsbeurteilung im Rahmen von Auktionen:** Im Rahmen des Auktionsversuches wurden 568 Viertel (142 Tiere) jeweils dreimal beprobt: PB (am Tag vor der Auktion auf dem Herkunftsbetrieb – mit anschließendem Melken), PA1 (morgens auf der Auktion, im Rahmen der tierärztlichen Untersuchung) und PA2 (nach Verkauf der Tiere vor der ersten Melkung nach Verlassen des Herkunftsbetriebes). CMT, Gehalt somatischer Zellen (ermittelt in der Fossomatic<sup>®</sup>) elektrische Leitfähigkeit, NAGase-Aktivität sowie die mikrobiologischen Befunde wurden erfasst und mit folgenden Ergebnissen ausgewertet.

- a. Gesunde Tiere bleiben auch unter dem Einfluss von Stress gesund. Von 365 Vierteln mit normaler Sekretion änderten nur ca. 10% ihre Eutergesundheitskategorie-Besetzung über die Probenahmen hinweg.
- b. Die Tiere wurden je nach letzter Melkzeit auf dem Herkunftsbetrieb und Ablauf der Auktion bis zu 26 Stunden nicht gemolken. Es bestand ein Einfluss der ZMZ auf die Höhe des Zellgehalts/ml, für den CMT konnte dies nicht abschließend geklärt werden.
- c. Der CMT erreichte eine Sensitivität von 95,76%, eine Spezifität von 87,14% und einen Youden-Index von 82,90%. Weitere im Versuch verwendete Parameter zum Entzündungsnachweis zeigten im Vergleich zum CMT eine niedrigere Präzision (Elektrische Leitfähigkeit: Youden-Index 39,61%; NAGase: Youden-Index 23,34%).
- d. Der CMT eignet sich durch seine hohe Präzision als Screening-Methode zur Feststellung der Eutergesundheit auf Auktionen. Da die Gefahr von Neuerkrankungen durch Zukauf kranker Tiere in einer Herde sehr bedeutsam ist, kommt insbesondere einer hohen Sensitivität große Bedeutung zu.

**6. Präzision des CMT unter Bedingungen konventionellen und automatischen Melkens:** Die Parameter CMT, DCC<sup>®</sup>, elektrische Leitfähigkeit und NAGase wurden auf ihre Präzision zum Entzündungsnachweis im Vergleich zum Zellgehalt/ml (Fossomatic<sup>®</sup>) untersucht.

- a. Für das DCC<sup>®</sup> wurde ein Youden-Index von 88,99% ermittelt, gefolgt von dem CMT (Youden-Index 67,16%), der elektrischen Leitfähigkeit (Youden-Index 41,61%) und der NAGase (Youden-Index 4,02%).
- b. Trotz höherer Präzision des DCC<sup>®</sup>, ist dem CMT als Screening-Methode aufgrund seiner kostengünstigen Anwendung der Vorrang zu geben.

- c. Die Untersuchung der Interaktion von SCC- und CMT-Befunden mit Melkzeitintervallen ergab in einer 1-faktoriellen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse von  $\text{LOG}_{\text{SCC}}$  und CMT zwischen den Melkintervallen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass ein Melkzeitintervall von unter sechs Stunden bzw. von über 14 Stunden zu erhöhten Zellgehalten/ml führt.

## 7 Summary

Diane Kleinschmidt: Mechanism of action and informational value of the California Mastitis Test in special consideration of udder health evaluation of animals sold by auction

The objective of this study was to make a statement about mechanisms of action of the CMT (1. – 4.) and about accuracy of the test under field conditions (5., 6.).

The following aspects were investigated:

1. Influence of DNA condition of the tested cells on the CMT reaction
2. Influence of the cell fraction (PMN/lymphocytes) on the CMT reaction
3. Influence of cell vitality on the CMT reaction
4. Influence of the choice of test reagents on the CMT reaction
5. Informational value of the CMT as screening test for the evaluation of udder health of animals sold by auction
6. Accuracy of the CMT in special consideration of further inflammation parameters under the condition of conventional or automatic milking systems

1. **DNA condition:** Membranes of milk cells were destroyed by the use of ultrasound which led to a stronger outcome of the CMT reaction ( $p = 0.0026$ ) in comparison to the reaction of the untreated samples. A second treatment resulted in partial fragmentation of DNA which led to a weaker CMT-reaction, comparable to the untreated sample ( $p = 0.51$ ). The conclusion of this is that only intact DNA-strands are able to form a net, a visible reaction, with the CMT-reagent.
2. **Cell fraction:** After the extraction of PMN and lymphocytes from bovine blood and preparation of dilution series, the cell fractions were tested comparatively. No significant differences could be observed between the reaction of the CMT reagent with PMN and lymphocytes, respectively.
3. **Cell vitality:** Samples were tested (CMT) and then the vitality of contained cells was measured by using Flow cytometry. Influence of cell-vitality on the different CMT-scores in the cell count-groups could not be seen.
4. **Comparison of reagents:** Using five different CMT-reagents 359 samples were tested. The test results were compared by using standardised CMT scores (8 grades from 0, 0.5, 1, 2 – 6). No significant differences between the CMT-results (except reagent B and C) could be registered over all cell count-groups.
5. **Information value and suitability as screening test for udder health evaluation within the scope of auctions:** During the auction trial 568 quarters were tested three times: PB (the day before the auction, on the farm, with subsequent milking), PA1 (in the morning of the auction, during the veterinary examination of the animals) and PA2 (after the sale by auction, before the first milking after departing from the farm). CMT, somatic cell count (Fossomatic<sup>®</sup>), electrical conductivity, NAGase and microbiological findings were collected and evaluated with the following outcomes:

- a. Healthy animals remain healthy under the impact of stress. From 365 quarters with normal secretion only 10% changed their udder health category across the sample drawings.
- b. According to the last milking on the farm and the cycle of the auction, the animals were not milked over 26 hours. There was an impact on the level of somatic cell count/ml, for the CMT this could not be completely resolved.
- c. The CMT achieved a sensitivity of 95.76%, a specificity of 81.14% and a Youden-Index of 82.90%. Other inflammation parameters used in the trial showed lower precision (electrical conductivity: Youden-Index 39.61%; NAGase: Youden-Index 23.34%).
- d. Due to its high precision, the CMT is suitable as a screening test for detection of udder health at auctions. As the danger of new infections in a herd by purchase of diseased animals is severe, a high sensitivity is of high importance.

**6. Precision of the CMT under conditions of conventional and automatic milking:** The parameters CMT, DCC<sup>®</sup>, electrical conductivity and NAGase were investigated regarding their precision to detect inflammation in comparison to somatic cell count/ml (Fossomatic<sup>®</sup>):

- a. A Youden-Index of 88.99% was determined for the DCC<sup>®</sup>, followed by the CMT (Youden-Index 67.16%), the electrical conductivity (Youden-Index 41.61%) and the NAGase (Youden-Index 4.02%).
- b. Despite higher precision of the DCC<sup>®</sup>, the CMT should be prioritised as a screening test because of its inexpensive use.

- c. The investigation of interaction of somatic cell count and CMT findings with the milking interval showed no significant differences regarding the results of  $\text{LOG}_{\text{SCC}}$  and CMT between milking intervals. Furthermore, it could be noticed, that a milking interval lower than six hours and higher than 14 hours resulted in higher cell counts/ml.

## 8 Literaturverzeichnis

BERCHTHOLD, M., H. AMMANN u. R. HANSELMANN (1973):

Die Bedeutung des Schalm-Tests für die Viehwirtschaft.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 115, S. 16 – 20

BERNING, L.M., M.J. PAAPE, R.H. MILLER u. R.A. LeDANE (1987):

N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activities, milk somatic cell counts and blood leucocytes and erythrocyte counts in cows after heat-induced stress or after intravenous administration of adrenocorticotropic hormone.

Am. J. Vet. Res. 48, 1157 – 1161

BERNING, L.M., M.J. PAAPE, R.H. MILLER u. R.A. LeDANE (1987):

Variation in N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity and somatic cell count among various milk fractions.

J. Dairy Sci. 70, 1054 – 1060

BERRY, E.A. (1998):

Survey of clinical mastitis incidence.

In: Proceedings of the British Mastitis Conference, Stoneleigh, UK, 1998, S. 78 – 79

BOOTH, J.M. (1997):

Progress in mastitis control – An evolving problem.

In: Proceedings of the British Mastitis Conference, Stoneleigh, UK, 1998, S. 3 – 9

BRADLEY, A. J. u. M.J. GREEN (2002):

The changing epidemiology of E. coli.

In: M. Kaske, H. Scholz u. M. Höltershinken (Hrsg.): Recent developments and perspectives in bovine medicine.

22. World Buiatric Congress, Hannover, 2002, Ber. S. 4 – 11

BRAUND, D.G. u. H. SCHULTZ (1962):

Physiological and environmental factors affecting the California Mastitis Test under field conditions.

J. Dairy Sci. 46, 197-203

BRENTROP, H. (1998):

Euterinfektionen bei Erstkalbinnen – Vorkommen, Bedeutung, prophylaktische Maßnahmen.

Tierärztl. Umschau 53, 15 – 18

BURVENICH, C., A.J. GUIDRY u. M.J. PAAPE (1995):

Natural defence mechanisms of the lactating and dry mammary gland.

In: Proc. 3. IDF Int. Mastitis Seminar, Tel Aviv, Israel, S. 3 – 13

BURVENICH, C., M.J. PAAPE, A.W. HILL, A.J. GUIDRY, R.H. MILLER, R.

HEYNEMANN, W.D.J. KREMER u. A. BRAND (1994):

Role of neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced E. coli mastitis in cows immediately after calving.

Vet. Q. 16, 45 – 50

CARROLL, E.J. u. O.W. SCHALM (1962):

Effect of Deoxyribonuclease on the California Test for mastitis.

J. Dairy Sci. 45, 1094- 1097

CHRIST, W. (1961):

Über das Reaktionsvermögen von Proteinen mit synthetischen Netzmitteln als Grundlage zum Verständnis des California Mastitis Tests.

Deutsche Tierärztl. Wochenschrift 4, 108-110

COFFEY, E.M., W.E. VINSON u. R.E. PEARSON (1986):

Somatic cell counts and infection rates for cows of varying cell counts in initial test of first lactation.

J. Dairy Sci. 69, 552 – 555

COOK W.F. u. E.A. FIEZ (1992):

Mastitis in first lactation southwest Idaho dairy cows.

J. Dairy Sci. 75, Suppl. 1, 158 (Abst.)

De KRUIF, A., R. MANSFELD u. M. HOEDEMAKER (1998):

Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

DeLAVAL (2003):

Bedienungsanleitung DeLaval Zellzahlmessgerät DCC.

DeLaval, Tumba, Schweden

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft DVG (2000)

Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und

Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern.

Verlag DVG, Gießen

DOGGWEILER, R. u. E. HESS (1983):

Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter.

Milchwissensch. 38, 5 – 8

EASTERDAY, B. C., J. SIMON u. R. P. HANSON (1958):

The use of the Modified Whiteside Test as a screen test for bovine mastitis.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 133, 470- 473

EDINGER, D. (2001):

Peripartale Mastitiden bei Erstkalbinnen – Untersuchungen zu Ätiologie und Prophylaxe sowie Auswirkungen auf Gesundheit und Leistungsfähigkeit.

Berlin/D., Freie Universität., Diss.

EMANUELSON, U., T. OLSSON, O. HOLMBERG, M. HAGELTORN, T. MATTILA,  
L. NELSON u. G. ÅSTRÖM (1987):

Comparison of some screening tests for detecting mastitis.

J. Dairy Sci. 70, 880 – 887

FEHLINGS, K. (2001):

Praktische Erfahrungen zu Eutergesundheitsstörungen und Herdenmanagement.

In: 9. AFEMA Tagung, Wolfpassing, Kongr. Ber., S. 10 – 22

FERNANDO, R.S. u. S.L. SPHAR (1983):

Effects of milking interval on selected milk constituents from normal and infected quarters.

J. Dairy Sci. 66, 1155 – 1161

FOX, L.K., J.S. McDONALD, J.K. HILLERS u. L.B. CORBEIL (1988):  
Function of phagocytes obtained from lacteal secretions of lactating and nonlactating cows.  
Am. J. Vet. Res. 49, 678 – 681

GRABOWSKI, N.T. (2000):  
Körpergewichtsentwicklung, Milchinhaltstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender DSB- Kühe in Laufstallhaltung.  
Hannover/D., Tierärztl. Hochsch., Diss

GRAY, D.M. u. O.W. SCHALM (1960):  
California Mastitis Test results (on milk from individual mammary quarters, bucket milk and bulk herd milk).  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 136, 195 – 198

HALM, H. (2003):  
Zum Einfluss eines automatischen Melkverfahrens auf Milchmengenleistung und Milchinhaltstoffe hochleistender DH-Kühe unter Berücksichtigung von Laktationsstadium und Eutergesundheit.  
Hannover/D., Tierärztl. Hochsch., Diss.

HAMANN, J. (1989):  
Faktoren der Genese boviner subklinischer Mastitiden.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 102, 342 – 346

HAMANN, J. (1992):  
Zum Einfluss von Stresssituationen auf die Anzahl somatischer Zellen in der Milch.  
Prakt. Tierarzt, Sonderheft Colleg. Vet. XXIII, 38 – 41

HAMANN, J. (2002):

Milk quality and udder health in relation to modern milking technique

In: M. Kaske, H. Scholz u. M. Höltershinken (Hrsg.): Recent developments and perspectives in bovine medicine.

22. World Buiatric Congress, Hannover, 2002, Ber. S. 334 – 345

HAMANN, J. u. K. FEHLINGS (2002):

Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem.

Aufl. Verlag DVG, Gießen

HAMANN, J. u. K. FEHLINGS (2003):

Zur Ökonomie der Mastitistherapie.

In: Tagung des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ d. Dtsch. Veterinärmed. Ges., Kiel, 2003. Ber., S. 150 – 163

HAMANN, J., G. FRITON u. R. REDETZKY (2006):

Usefulness of N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase determination as Indicator for inflammation in colostrum of heifers.

XXIV. WBC, Nizza 2006, Poster

HAMANN, J. u. P. GYODI (1999):

Electrical conductivity in fraction- collected quarter milk samples with low somatic cell counts.

Milchwissensch. 54, 487 – 491

HAMANN, J. u. P. GYODI (2000):

Somatic cell count and electrical conductivity in relation to milking frequency.

Milchwissensch. 55, 303 – 307

HAMANN, J., V. KRÖMKER u. M. SCHÜTTEL (1999):

Zur Aussagefähigkeit von NAGase-Befunden in Milchproben mit Zellgehalten von unter 100.000 Zellen/ml.

In: 40. Arbeitstagung des Arbeitskreises „Lebensmittelhygiene“ d. Dtsch. Veterinärmed. Ges., Garmisch- Partenkirchen, 1999. Ber., S. 209 – 214

HAMANN, J., R. REDEZKY u. N.T. GRABOWSKI (2004):

Cow-side mastitis tests-possibilities and limitations.

43<sup>rd</sup> Annu. Meet., National Mastitis Council, Charlotte, North Carolina, 2004, Proc., S. 60 – 77

HAMANN, J., R. REDEZKY u. N.T. GRABOWSKI (2005):

Diagnostic potential of the California Mastitis Test to detect subclinical Mastitis. Mastitis Newsletter 26, 2005

HAMANN, J. u. J. REICHMUTH (1990):

Exogene Einflüsse auf den Zellgehalt der Milch unter Berücksichtigung des Gesundheitszustandes der Milchdrüse.

Milchwissensch. 45, 286 – 290

HAMANN, J., J. REICHMUTH u. W. HEESCHEN (1990):

Überschreitungen eines Zellzahlgrenzwertes von 400.000/ml in der Anlieferungsmilch sind vermeidbar.

Milchpraxis 28, 8 – 11

HAMANN, J. u. A. ZECCONI (1998):

Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator.

Bulletin of the Int. Dairy Federation 334, 5 – 22

HOLDAWAY, R.J., C.W. HOLMES u. I.J. STEFFERT (1996):

A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows.

Part 1: The effects of bacterial infection, stage of lactation and age of cow on eight parameters in foremilk from individual quarters, with an initial study of differences between milk fractions.

Austr. J. Dairy Techn. 51, 64 – 71

HOLT, C. (1985):

The milk salts: Their secretion, concentrations and physical chemistry.

In: P.F. Fox (Editor), Developments in Dairy Chemistry – 3. Elsevier Applied Science Publishers, London & New York, S. 143 – 181

HURLEY, W.L. (1989):

Mammary gland function during involution.

J. Dairy Sci. 72, 1637 – 1646

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION) (1967):

Mastitis diagnosis.

Annual Bulletin, part 3

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION) (1971):

A monograph on bovine mastitis.

Annual Bulletin, part 1

JAARTSVELD, F.H.J. (1963):

The development and application of the Brabant Mastitis Reaction (B.M.R.).

Int. Mastitis congress 1963 Proceedings, p. 43 - 46

JAIN, N.C. (1976):

Neutrophil leukocytes and inflammation of the bovine mammary gland.  
Theriogenology 6, 153 – 173

JANEWAY, CH.A. u. P. TRAVERS (1997):

Immunologie.

2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

JANZEN, J.J. (1968):

Evaluation of five screening tests used for estimating Leukocyte counts in bulk milk.

J. Dairy Sci. 52, 329-334

JENSEN, P.T. (1957):

Investigations into the Whiteside Test and the CMT for the detection of pathological secretions in herd milk samples.

Nord. Ved. Med. 9, 590-608

JONES, G.M., R.E. PEARSON, G.A. CLABAUGH u. C.W. HEALD (1984):

Relationship between somatic cell counts and milk production.

J. Dairy Sci. 67, 1823 – 1831

KEHRLI, M.E., B.J. NONNECKE u. J.A. ROTH (1989):

Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period.

Am. J. Vet. Res. 50, 207 – 214

KEIL, N.M., L. AUDIGÈ u. W. LANGHANS (2000) :

Factors associated with intersucking in Swiss dairy heifers.

Prev. Vet. Med. 45, 305 – 323

KIERMEIER, F. u. K. KEIS (1963):

Semi- quantitative modification of the Schalm test.

Milchwissensch. 19, 65-69

KÖß, C. (2004):

Durchflusszytometrische Differenzierung sowie phänotypische und funktionelle Eigenschaften boviner Milchzellen unter Berücksichtigung der Eutergesundheit.

Hannover/D., Tierärztl. Hochsch., Diss.

KOSSAIBATI, M. A., M. HOVI u. R.J. ESSELMONT (1998):

Incidence of clinical mastitis in dairy herds in England.

Vet. Res. 143, 649 – 653

KRÖMKER, V., N.T. GRABOWSKI, K. NOGAI u. J. HAMANN (1999):

Zur Bedeutung von L(+)-Lactat in Milch als Entzündungsindikator der Milchdrüse des Rindes.

In: Vorträge und Poster der 42. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes

„Lebensmittelhygiene“ der DVG, Garmisch- Partenkirchen 2001, Ber. 681 – 685

LABAOHM, R., E. GÖTZ, G. LUHOFER, G. HESS u. H. BOSTEDT (1998):

Factors influencing the somatic cell count in dairy cows 1. Influence of bacteriological findings, stage and number of lactation.

Milchwissensch. 53, 63 – 66

LAEVENS, H., H. DELUYKER, Y.H. SCHUKKEN, L. DE MEULEMEESTER, R. VANDERMEERSCH, E. DE MUËLENAERE u. A. DE KRUIF (1997):

Influence of parity and stage lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative cows.

J. Dairy Sci. 80, 3219 – 3226

LIND, O., O. SANDER, M. JONSSON u. T. FLENNERT (2005):

Fast and accurate on-site counting of somatic cells in milk using a DNA-specific fluorescent microscopic method.

4<sup>th</sup> IDF International Mastitis Conference, Maastricht, 2005, Proc., CD-Rom, S. 896

LINZELL, J.L. u. M. PEAKER (1972):

Day-to-day variations in milk composition in the goat and cow as a guide to the detection of subclinical mastitis.

Br. Vet. J. 128, 284

LINZELL, J.L. u. M. PEAKER (1975):

Efficacy of the measurement of the electrical conductivity of milk for the detection of subclinical mastitis in cows: detection of infected cows at a single visit.

Br. Vet. J. 131, 447 – 461

MARSCHKE, R.J., R. ROBERTS u. B.J. KITCHEN (1987):

The effect of sampling time on N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) levels in bovine milk and its relevance to mastitis diagnosis.

Aust. J. Dairy Technol. 42, 3 – 6, 10

MARSHALL, R.T., J.E. EDMONSON u. B. STEEVENS (1993):

Using the California Mastitis Test.

URL. : <http://muextension.missouri.edu/explore/agguides/dairy/g03653.htm>.

MIELKE, H. u. J. SCHULZ (1983):

Beziehungen der elektrischen Leitfähigkeit und anderer diagnostischer Kriterien der subklinischen Mastitis in Abhängigkeit vom Laktationsstadium der Kühe.

Arch. Exp. Veterinärmed. 37, 629 – 640

MILLER, R. H., M.J. PAAPE, L.A. FULTON u. M.M. SCHUTZ (1993):

The relationship of milk somatic cell count to milk yields for Holstein heifers after first calving.

J. Dairy Sci. 76, 728 – 733

MILNE, J.R. u. H. De Langen (1977):

Observations of the California mastitis test (CMT) reaction. The roles of Deoxyribonucleic acid (DNA) and milk protein in the reaction.

New Zealand Journal of Dairy Sci. a. Technol. 12, 44 – 47

MOLECULAR PROBES (2003):

SYTO<sup>®</sup> Green fluorescent nucleic acid stains.

Produktinformation, 2003

MYLLYS, V. u. H. RAUTALA (1995):

Characterization of clinical mastitis in primiparous heifers.

J. Dairy Sci. 78, 538 – 545

NAGASWARARAO, G. u. H.E. CALBERT (1969):

A comparison of screening tests to detect abnormal milk.

Journal of milk food technology 32, 365-368

NAGASWARARAO, G. u. B. DERBYSHIRE (1969):

Studies on the mechanism of gel formation in the California Mastitis Test reaction.

J. Dairy Res. 36, 359- 367

National Mastitis Council (1999):

Laboratory handbook on bovine mastitis.

National Mastitis Council inc., S. 222

NG-KWAI-HANG, K.F., J.F.HAYES, J.E. MOXLEY u. H.G. MONRADES (1984):

Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes in bovine milk.

J. Dairy Sci. 67, 361 – 366

NICHOLS, G.M. u. D.S.M. PHILLIPS ( 1972):

A rotary viscometer for leukocyte count determinations in milk.

Australian Journal of Dairy Technology 27, 134-136

NICKERSON S.C., W.E. OWENS u. R.L. BODDIE (1995):

Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control.

J. Dairy Sci. 78, 1607 – 1618

NOGAI, K., V. KRÖMKER, P. GYODI u. J. HAMANN (1996):

Zur fluoreszenzspektroskopischen und photometrischen Bestimmung von N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in Milch – Ein Methodenvergleich.

In: 37. Tagung d. Dtsch. Veterinärmed. Ges., Arbeitsgebiet  
"Lebensmittelhygiene",

Teil II Poster, Garmisch-Partekirchen, 1996, S. 299 – 306

ÖSTENSSON, K., M. HAGELTRON u. G. ÅSTRÖM (1988):

Differential cell counting in fraction- collected milk from dairy cows.

Acta vet. scand. 29, 493 – 500

OLIVER, S.P., M.J. GILLESPIE u. H.H. DOWLEN (1992):

Influence of prepartum antibiotic therapy on intramammary infections in primigravid heifers during early lactation.

J. Dairy Sci. 75, 406 – 414

OLIVER, S.P. u. B.A. MITCHELL (1983):

Intramammary infections in primigravid heifers near parturition.

J. Dairy Sci. 66, 1180 – 1183

OLIVER, S.P. u. L.M. SORDILLIO (1988):

Udder health in periparturient period.

J. Dairy Sci. 71, 2584 – 2606

OUTTERIDGE, P.M. u. C.S. LEE (1981):

Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages.

Adv. Exp. Med. Biol. 137, 513 – 534

PAAPE, M.J., K. SHAFER-WEAVER, A.V. CAPUCO, K. VAN OOSTVELDT u.  
C. BURVENICH (2000):

Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells.

Adv. Exp. Med. Biol. 480, 259 – 277

PAAPE, M.J., W.P. WERGIN, A.J. GUIDRY u. W.D. SCHUTZE (1981):

Phagocytic defense of the ruminant mammary gland.

Adv. Exp. Med. Biol. 137, 555 – 578

PANKEY, J.W., P.A. DRECHSLER u. E.E. WILDMANN (1991):

Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition.

J. Dairy Sci. 74, 1550 – 1552

PRENTICE, J.H. (1962):

The conductivity of milk – the effect of the volume and degree of dispersion of the fat.

J. Dairy Res. 29, 131 – 139

RAO, G.N. (1965):

Mechanism and factors affecting certain screening tests for detection of mastitis milk.

Ph.D. Thesis, Univ. of Wisconsin

RASMUSSEN, M.D. (2002):

Defining acceptable milk quality at time of milking.

In: Proc. of “The first North American Conference on Robotic Milking”.

Wageningen, s. IV 9 – IV 16

RAST, A. (1854):

Der gelbe Galt.

Arch. Tierheilkunde 13, 289 – 321

REDEZKY, R., K. FEHLINGS u. J. HAMANN (2004):

Zur direkten und indirekten Zellzählung in Milch – Vergleich von Stall- und Labortest zur Mastitisdiagnostik.

In: Bundesinstitut für Risikobewertung: 5. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, Tierärztl. Praxis G 32, 5, Stuttgart: Schattauer, 2004, S. 85

REDEZKY, R., J. HAMANN, N.TH. GRABOWSKI u. G. KLEIN (2005):

Diagnostic value of the CMT in comparison to electronically-counted somatic cells in bovine milk.

4<sup>th</sup> IDF International Mastitis Conference, Maastricht, 2005, Proc., CD-Rom, S. 487 - 494

REDEZKY, R., J. HAMANN, N.TH. GRABOWSKI u. G. KLEIN (2006):

Teat sealer – Voraussetzungen für die Anwendung.

In: Tagung des Arbeitskreises „Eutergesundheit“ d. Dtsch. Veterinärmed. Ges., Leipzig, 2006, S. 57 - 77

REICHMUTH, J. (1975):

Somatic cell count – Interpretation of results.

Int. Dairy Federation Doc. 85, 93 – 124

REINECKE, F. (2002):

Untersuchungen zu Zellgehalt und N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase-Aktivität (NAGase) in Viertelanfangsgemelken sowie zur Leistungsentwicklung von Kühen bei Anwendung eines konventionellen oder eines automatischen Melkverfahrens.

Hannover/D., Tierärztl. Hochsch., Diss.

RØNTVED, C.M., L. NIELSEN, M. BJERRING, M.D. RASMUSSEN, O. LIND u. K.L.INGVARTSEN (2005):

Somatic cell count analysis of milk performed with DeLaval Cell Counter DCC. 4<sup>th</sup> IDF International Mastitis Conference, Maastricht, 2005, Proceed., CD-Rom, S. 874

RÜEGG, M., J.O. BOSSET, E. POP u. B. BLANC (1980):

Die Bedeutung der elektrischen Leitfähigkeit für die Milchanalytik und –hygiene: Eine Literaturübersicht von 1954 – 1979.

Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 71, 427 – 444

RULLOF, U. (1997):

Untersuchungen über Art und Häufigkeit intramammärer Infektionen bei Färsen ante und post partum in einem norddeutschen Hochzuchtgebiet und die Effizienz präpartaler antibiotischer Behandlung.

Hannover/D., Tierärztliche Hochschule, Diss. 1997

SANDHOLM, M. u. T. MATTILA (1985):

Merits of different indirect tests in mastitis detection (cell counting, NAGase, BSA, antitrypsin).

Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber. 37, 334 – 339

SARGEANT, J.M., K.E. LESLIE, J.E. SHIRLEY, B.J. PULKRABEK u. G.H. LIM  
(2001) :

Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for  
identifying intramammary infection in early lactation.

J. Dairy Sci. 84, 2018-2024

SCHÄLLIBAUM, M. (2001):

Mastitis control in Switzerland.

IDF, Mastitis Newsletter 24, 36 – 39

SCHALM, O.W. (1960):

Ein neuer Mastitis-Test.

Tierärztliche Umschau 15, 151-153

SCHALM, O.W., D.M. GRAY u. D. NOORLANDER (1955):

Procedures for the use of the Whiteside Test on milk in the laboratory or barn.

North Am. Vet. 36, 1011- 1016

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

Experiments and Observations Leading to Development of the California  
Mastitis Test.

J. American Vet. Med. Assoc. 130, S. 199 – 204

SCHEIDEWIG, G. (1964):

Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit eines modifizierten  
Schalm- Tests zur Mastitisiagnose bei Einzelgemelken des Rindes

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

SCHMIDT MADSEN, P. (1975):

Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk.

J. Dairy Res. 42, 227 – 239

SCHRIDDE, M. (2006):

Vergleichende Untersuchung des Zitzengewebestatus von Kühen nach Einsatz eines konventionellen oder eines automatischen Melkverfahrens unter Berücksichtigung der Eutergesundheit.

Hannover/D., Tierärztl. Hochsch., Diss.

SCHÜTTEL, M. (1999):

Vergleich von N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase-Aktivitäten (NAGase) in Milch, Blut und Harn beim laktierenden Rind

Hannover/D., Tierärztl. Hochsch., Diss

SCHUKKEN, Y.H., F.J. GROMMERS, D. VAN DE GEER, H.N. ERB u. A.

BRAND (1990):

Risk factors for clinical mastitis in herds with low bulk milk somatic cell count 1. data and risk factors for all cases.

J. Dairy Sci. 73, 3463 – 3471

SCHULTZ, L.H. (1977):

Somatic cells in milk- physiological aspects and relationship to amount and composition of milk.

J. Food Protect. 40, 125 – 131

SCHULTZE, W.D. (1985):

Developments in the identification of diseased udder quarters or cows.

Kiel. milchwirtsch. Forschungsber. 37, 319 – 332

SHELDRAKE, R.F., G.D. MCGREGOR u. R.J.T. HOARE (1983):

Somatic cell count, electrical conductivity and serum albumin concentration for detecting bovine mastitis.

J. Dairy Sci. 66, 548 – 555

SINGH, B. u. R.T. MARSHALL (1966):

Bacterial deoxyribonuclease production and its possible influence on mastitis detection.

J. Dairy Sci. 49, 822-825

SULZER, A. (2005):

Einfluss von Magermilch auf phänotypische und funktionelle Eigenschaften boviner Blutleukozyten.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss

TOLLE, A. (1975):

Mastitis – The disease in relation to control methods.

Bulletin of the International Dairy Federation 85, 3 - 15

TRINIDAD, P., S.C. NICKERSON u. T.K. ALLEY (1990):

Prevalence of intramammary infections and teat canal colonization in unbred and primigravid heifers.

J. Dairy Sci. 73, 107 – 109

TSCHISCHKALE (1996):

Mastitiden im Abkalbezeitraum.

Milchpraxis 34, 14 – 16

TUCKER, H.A. u. M.J. PAAPE (1965):

Effects of milk storage duration on various tests for abnormal milk.

J. Dairy Sci. 49, 173-175

WAAGE, S., H.R. SKEI, J. RISE, T. ROGDO, S. SVILAND u. S.A. ØDEGAARD (2000):

Outcome of clinical mastitis in heifers assessed by re-examination of cases one month after treatment.

J. Dairy Sci. 83, 70 – 76

WAAGE, S., S. SVILAND u. S.A. ØDEGAARD (1998):

Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers.

J. Dairy Sci. 81, 1275 – 1284

WENDT, K. (1997):

Färsenmastitis.

Informationsschrift Fa. Boehringer Ingelheim, 17

WHITTLESTONE, W.G. u. H. De LANGEN (1965):

The cell count of milk and rapid tests for mastitis.

Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 25, 137- 151

WHITTLESTONE, W.G., L.R. FELL u. H. De LANGEN (1970):

A viscometric method for the estimation of milk cell count.

Journal of Milk Food Technology 33, 351-354

WHYTE, D., M. WALMSLEY, A. LIEW, R. CLAYCOMB u. G. MEIN (2005):

Chemical and rheological aspects of gel formation in the California mastitis Test.

J. Dairy Res. 72, 115-121

WIEDEMANN, M. (2004):

Überwachung der Eutergesundheit bei Milchkühen durch Kombination verschiedener chemisch-physikalischer Messwerte.

München, Techn. Universität, Diss.

WIGGANS, G.R. u. G.E. SHOOK (1987):

A lactation measure of somatic cell count.

J. Dairy Sci. 70, 2666 – 2672

WILDMANN, E.E. , J.K. O`NEIL, P.A. DRECHSLER u. J.W. PANKEY (1990):

Prevalence of mastitis in primiparous cows.

J. Dairy Sci. 73, Suppl. 1, 257 (Abst.)

WILLIAMS, D.J., R.J. MARSCHKE u. S.M. NOTTINGHAM (1991):

Effects of stage of lactation, number of lactations and dry period on N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase levels and somatic cell count in bovine milk.

Aust. J. Dairy Technol. 46, 43 – 45

WILSON, D.J., K.L. CASE, R.N. GONZALEZ u. H.R. HAN (1998):

Bacteriologic cure rates for bovine mastitis cases with no treatment or with eight different antibiotics.

37<sup>rd</sup> Annu. Meeting, National Mastitis Council, Arlington, USA (1998), Proc.,

S. 273 - 274

WOOLFORD, M.W. (1985):

The relationship between mastitis and milk yield.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 37, 415 – 425

## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Jörn Hamann möchte ich für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung und das Engagement, die er mir während der Fertigstellung meiner Arbeit hat zukommen lassen, danken.

Ich danke auch Frau Dr. Gesa Kniep, die erst die Idee zu dieser Doktorarbeit zum Leben erweckt hat.

Besonderer Dank gilt zudem Frau Dr. Friederike Reinecke „Fred“, die mir während des Zusammenschreibens der Arbeit nach Kräften, und davon hat sie viele, geholfen hat.

Ohne Frau Dr. Doris Klocke hätte mich der Computer und auch SAS wohl besiegt, auch ihr gilt mein größter Dank. Ihre ständige Einsatzbereitschaft auch als „Telefonjoker“ war sicher nicht selbstverständlich.

Herrn Jürgen „Jogo“ Falkenhagen möchte ich für all die große und kleine Hilfe – von den Probenahmen bis hin zur Schokoladenversorgung – in meiner Zeit als Doktorandin danken.

Meinen Mitdoktorandinnen und Freundinnen Astrid Sulzer und Mirja Schridde danke ich für die Unterstützung bei den Auktionen in Osnabrück und für all den Spaß den wir dabei hatten. Astrid auch noch mal ein herzliches Dankeschön für die Hilfe und Betreuung während meiner Doktorandenzeit und dafür, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest.

Frau Dr. Cordula Köß sei gedankt für die Unterstützung im FACS<sup>®</sup>-Versuch.

Meiner Co-Köchin und siamesischem Zwilling Kathrin „Hin“ Reetz Danke für die Freundschaft und den Spaß nicht nur im Institut.

Den Mitarbeiterinnen aus der Mikrobiologie Frau Sigrid Kirchschlager-Heine und Frau Susanne Mock gilt ein herzliches Dankeschön für ihre Unerschrockenheit und Flexibilität bei meinen manchmal etwas spontan geplanten Versuchsvorhaben. Frau Kirchschlager und unserem neuen Mibi-Bienchen Selina Natalie Campbell danke ich fürs Korrekturlesen der Arbeit.

Frau Silke Schlote-Kohne, Herrn Manfred Merle, Herrn Dr. Karl Nogai, Herrn Dr. Nils Grabowski und Herrn Dr. Karl Rohn vielen Dank für die Unterstützung bei allen kleinen und großen Fragen.

Herrn Prof. Kietzmann danke ich für die Anregungen zum Ultraschall-Versuch.

Lob gilt dem Team aus Ruthe, sowie Herrn Thomas Meldau für Ihre Geduld und Unterstützung bei den Probenahmen.

Den Landwirten der OHG ein Riesen-Dankeschön für die herzliche Unterstützung während der Monate meiner Auktionsversuche.

Frau Daniela Bierbaum sei gedankt für die tolle Zusammenstellung der Reisrouten in Osnabrück (wir haben uns nie verirrt).

Claire Berry ein herzliches Dankeschön für die Korrektur der Summary.

Meiner „Herde“ Eva und Nina von der Höh, Lui Angrisani, Daniel Sombrutzki, Dina Rittershaus, Martina Thomann, Eva Nerbas und Oliver Dietz danke ich für die tolle Hannover-Zeit, die moralische Unterstützung die netten Mittage, Abende und manchmal auch Nächte. Danke fürs Lachen, Trösten, Feiern und Dasein.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Inge und Helmut Kleinschmidt, ohne deren Liebe, Unterstützung und Rückhalt nichts von dem möglich gewesen wäre, was ich erreicht habe.