

Erprobung der On-Farm-Analytik von Haptoglobin in Milch als neuer Indikator zur Gesundheitsüberwachung von Milchkühen¹

T. Möllmer¹; S. Pache¹; S. Rohrlack²; K. Zoldan³; F. Frank⁴; P. Schneider⁵; R. Fischer¹

¹ Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Am Park 3, 04886 Köllitsch

² Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, 06099 Halle

³ Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Perlickstraße 1, 04103 Leipzig

⁴ FrimTec GmbH, Weidenweg 1, 86869 Oberostendorf

⁵ Sension GmbH, Am Mittleren Moos, 86167 Augsburg

Einleitung

In der Milchrindzucht gewinnt die Gesundheitsüberwachung mit dem gestiegenen Leistungspotential und der damit verbundenen physiologischen Belastung der Tiere immer mehr an Bedeutung. Für die Erhebung von Schlüsselmerkmalen im Bereich der Gesundheitsüberwachung des Milchrindes wurde im Rahmen des Verbundprojektes On-Farm-Recording^(Breeding) ein Verfahren zur Durchführung der Analyse des immunologischen Parameters Haptoglobin (Hp) in der Milch unmittelbar im Produktionsbetrieb entwickelt.

Haptoglobin wird der Gruppe der Akut-Phase-Proteine zugeordnet, welches durch den schnellen Konzentrationsanstieg den Beginn einer entzündlichen Reaktion im Körper des Tieres markieren kann. Verschiedene Studien zeigen, dass die Hp-Konzentration im Plasma und in der Milch während einer Mastitis drastisch ansteigt.

Ziel der Arbeit war die Erprobung des On-Farm-Analyse-Verfahrens im Praxisbetrieb hinsichtlich

- Handling und Praktikabilität,
- Analysegenauigkeit zwischen wiederholten Messungen,
- Wiederholbarkeit zwischen Anfangsgemelk (AG) und Sammelgemelk (SG),
- Sensitivität und Spezifität auf die Vorhersage von entzündlichen Reaktionen bei der Milchkuh.

Im Vortrag werden erste Ergebnisse dargestellt.

Material und Methoden

Für die Untersuchung wurden im Abstand von 14 bzw. 7 Tagen Vollmilchproben (AG und SG) von insgesamt 73 Holstein Friesian Kühen des LVG Köllitsch genommen. Die Tiere der 1. bis 8. Laktation befanden sich während des 3-monatigen Versuchszeitraumes zwischen dem 6. – 316. Melktag. Alle SG-Proben wurden an den Untersuchungstagen zur labortechnischen Bestimmung von Zellzahl, Fettgehalt, Eiweißgehalt, Laktose und Harnstoff versandt.

Alle Tiere befanden sich im Programm der veterinärmedizinischen Bestandsbetreuung des Versuchsbetriebes. Alle Diagnosen und Behandlungen werden mit dem Managementprogramm HERDE erfasst und zur Beurteilung des Gesundheitsstatus der Probanden herangezogen.

Die Messung der Hp-Konzentration wurde mit dem On-Farm-Gerät eProCheck[®] durchgeführt. Die automatische Analyse im Gerät erfolgt nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA, der speziell für den Hp-Nachweis in der Rohmilch auf diesem Gerät entwickelt wurde. Der Wertebereich liegt zwischen 0,0 – 20 µg Haptoglobin je ml Rohmilch. Insgesamt wurden 968 Hp-Analysen von 375 AG-Proben und

¹ Die Förderung des Vorhabens erfolgt aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgt über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

371 SG-Proben durchgeführt. Bei einer Abweichung des Messwertes von mehr als 1,2 µg/ml zwischen AG und SG eines Tieres an einem Probetag im Wertebereich 0-5 sind diese Proben nachträglich einer Doppelbestimmung unterzogen worden.

Ergebnisse

Von den markierten Versuchstieren wurden die Milchproben während der Morgenmelkzeit im Routinebetrieb gewonnen und anschließend auf dem ePro Check[®] analysiert. Dazu wurden je Probe 50 µl Rohmilch in die präparierten Wells pipettiert. Vom Gerät werden je Untersuchungsgang bis zu 22 Proben automatisch analysiert und die Ergebnisse nach ca. 70 Minuten im Display sowie als Datei bereitgestellt. Bei entsprechender Einarbeitung des Bedienpersonals arbeitet das Gerät stabil und lässt sich auch bei größerem Probenumfang in das Herdenmanagement einordnen.

In der Stichprobe mit 369 auswertbaren Wertepaaren wurde für das AG bzw. SG ein Median von 0,5 bzw. 0,4 µg/ml und ein Mittelwert mit einer Standardabweichung von 2,41 ±3,51 bzw. von 2,18 ±3,53 µg/ml berechnet. Die Varianzanalyse hinsichtlich der Beprobungsart - AG oder SG – ergab eine Wiederholbarkeit von 0,85.

Zur Überprüfung der Analysegenauigkeit wurden 144 empirisch ausgewählte Probenpaare einer Doppelbestimmung unterzogen und mittels Varianzanalyse eine sehr hohe Wiederholbarkeit von 0,99 berechnet. Dieses Ergebnis erlaubte die Etablierung des o.g. Verfahrens zur Qualitätssicherung für die insgesamt 823 ausgewerteten Analysewerte.

Über den Versuchszeitraum konnten mindestens 274 Proben für eine erste Schätzung der Sensitivität und Spezifität des Hp-Wertes im AG/SG zur Vorhersage entzündlicher Erkrankungen beim Milchrind herangezogen werden. Die Sensitivität beschreibt dabei den prozentualen Anteil der Kühe, die durch tierärztliche Bestandsbetreuung als krank eingestuft wurden und ebenfalls durch erhöhten Haptoglobinwert als krank erkannt wurden.

Tab. 1: Ermittlung Sensitivität/Spezifität für Proben des Anfangsgemelks (AG). Einstufung der Tiere am Probetag anhand Haptoglobinkonzentration (Hp) als gesund (Hp < 1,2µg/ml) und krank (Hp ≥ 1,2µg/ml). Abgleich mit in HERDE-Managementprogramm eingetragenen Erkrankungen +/- 3 Tage zum Probedatum.

AG	krank	gesund
n = 275	n = 95	n = 180
Hp ≥ 1,2	Richtig Positiv n = 64	Falsch Positiv n = 29
Hp < 1,2	Falsch Negativ n = 31	Richtig Negativ n = 151

AG - Spezifität = 0,84
AG - Sensitivität = 0,67

Tab. 2: Ermittlung Sensitivität/Spezifität für Proben des Sammelgemelks (SG). Einstufung der Tiere am Probetag anhand Haptoglobinkonzentration (Hp) als gesund (Hp < 1,2µg/ml) und krank (Hp ≥ 1,2µg/ml). Abgleich mit in HERDE-Managementprogramm eingetragenen Erkrankungen +/- 3 Tage zum Probedatum.

SG	krank	gesund
n = 274	n = 94	n = 180
Hp ≥ 1,2	Richtig Positiv n = 65	Falsch Positiv n = 20
Hp < 1,2	Falsch Negativ n = 29	Richtig Negativ n = 160

SG - Spezifität = 0,89
SG - Sensitivität = 0,69

Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit dem neuen Testverfahren ist eine schnelle Bestimmung von Hp in der Rohmilch im Milchviehbetrieb möglich. Die hohen Wiederholbarkeiten zwischen AG und SG sowie zwischen Doppelbestimmungen erlauben eine praktikable Einordnung in das Herdenmanagement.

Weiterhin sind die Effekte von Leistungsmerkmalen auf den Hp-Gehalt in der Milch varianzanalytisch zu untersuchen.

Die Schätzungen der Sensitivität und Spezifität von Hp in der Milch als Indikator für Entzündungen des Uterus, des Euters und der Gliedmaßen im Rahmen der Gesundheitsüberwachung sind an einer größeren Stichprobe zu überprüfen.

Für das praktische Herdenmanagement sind Hp-Schwellenwerten und entsprechende Handlungsempfehlungen zur Gesundheitsüberwachung abzuleiten.

Literatur

ECKERSHALL P.D. et al (2005): Acute Phase Proteins in Bovine Milk in an Experimental Model of *Staphylococcus aureus* Subclinical Mastitis.- J. Dairy Sci. 89: 1488-1501

LAI I.-H., TSAO J. H., LU Y. P., LEE J. W., ZHAO X., CHIEN F. L., MAO S. (2009): Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk.- Vet. Res 40: 17 – 28

NIELSEN B.H., JACOBSEN S., ANDERSEN P.H., NIEWOLD T.A., HEEGAARD P.M.H. (2004): Acute phase protein concentration in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions.- Veterinary Record 154: 361-365