

## Milchqualität und Eutergesundheit an der Quelle messen: Wunschtraum oder wirklich machbar?

Marijan Culina, Jochen Hahne, Klaus-Dieter Vorlop<sup>1</sup>, Dieter Ordolff<sup>2</sup>

### 1 Einleitung und Problemstellung

Entzündliche Eutererkrankungen (Mastitiden) stellen nicht nur deutschlandweit ein großes Problem dar. Sie gehören weltweit zu den verlustreichsten Erkrankungen im Bereich der Milchviehhaltung. Allein in Deutschland werden die volkswirtschaftlichen Verluste auf ca. 1,4 Mrd. €/Jahr beziffert. Zurückzuführen sind diese Verluste vorrangig auf die von den Milcherzeugern nicht erkannte oder nicht beachtete subklinische Mastitis. Die Einbußen sind hauptsächlich auf verringerte Milchleistung betroffener Euterviertel zurückzuführen (70 %). Erhöhte Remontierungskosten durch vorzeitiges Ausscheiden erkrankter Tiere aus dem Produktionsprozess, erhöhter Arbeitsaufwand für das Melken erkrankter Tiere sowie Tierarztkosten tragen zusammen etwa 19 % bei. Die restlichen 11 % kommen durch nicht verwertbare Milch zustande. Insgesamt wird pro subklinischem Erkrankungsfall mit Erlösverlusten und Kosten zwischen 100 - 250 € gerechnet. Bereits bei Zellzahlen deutlich unter dem Qualitätsgrenzwert von 400.000 Zellen/ml entstehen erhebliche Milch-, Fett- und Eiweißverluste, die größere monetäre Einbußen verursachen als die Abzüge vom Milchgeld bei Überschreitung des Qualitätsgrenzwertes.

Die wichtigsten Erregergruppen von Mastitiden sind Streptokokken, Staphylokokken, coliforme Keime (Umweltkeime) und Pyogenesbakterien. Vor allem unter den Streptokokken und Staphylokokken finden sich Spezies, die als typische Euterentzündungserreger bekannt sind (z.B. *Staph. aureus*, *Step. agalactiae*). Da die Milch erkrankter Tiere neben erhöhten Zell- und Keimzahlen auch Veränderungen in der Zusammensetzung aufweist, wird schon seit einigen Jahren versucht, Eutererkrankungen durch Analyse spezifischer Milchparameter frühzeitig zu erkennen. Die Bemühungen führten bis jetzt jedoch entweder zu keiner zufrieden stellenden Unterscheidung zwischen erkrankten und gesunden Tieren oder scheiterten an wirtschaftlichen bzw. technischen Gesichtspunkten bei der Umsetzung in die Praxis.

Aus diesem Grund haben sich die Institute "Technologie und Biosystemtechnik" und "Betriebstechnik und Bauforschung" der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) in Braunschweig sowie die Fa. TRACE Analytics GmbH im Rahmen eines BMBF-Verbundprojekts mit der Frage beschäftigt, ob es wirklich machbar ist, Milchqualität und Eutergesundheit direkt an der Quelle während des Melkvorgangs zu erfassen.

Die Hauptaspekte dieses Projekts sind die Identifikation eines Mastitisindikators in Milch, mit dem krankheitsbedingte Veränderungen der Milchezusammensetzung und damit auch die Verkehrsfähigkeit der Milch sicher bewertet werden kann, die Entwicklung eines hochspezifischen und selektiven Sensors und die Gesamtverfahrensumsetzung für automatische Melkverfahren. Neue Hygienevorschriften eröffnen weitere Anwendungsmöglichkeiten. Das so genannte EU-Hygienepaket, das aus drei Verordnungen und einer Aufhebungsrichtlinie besteht, ist ein wesentlicher Baustein des neuen europäischen Lebensmittelrechts und tritt am 01.01.2006 in Kraft. Die bereits 2004 beschlossenen und veröffentlichten Gesetze setzen den Umbau des europäischen Lebensmittelrechts konsequent fort. Vom Anfang des neuen Jahres an hat das allgemeine EU-Hygienerecht Vorrang und setzt sich im Zweifel über nationales geltendes Recht hinweg. Im Gegensatz zur momentan noch geltenden nationalen Milchverordnung kann der Landwirt dann selbst entscheiden, ob er sich vor jedem Melkvorgang persönlich von der Güte der Milch überzeugt, oder ein anderes Verfahren anwendet, das zu gleichen Ergebnissen führt. Aus diesem Grund sollten auch konventionelle Melkverfahren nicht aus den Augen verloren werden. Durch eine zusätzliche Integration eines entsprechenden Sensorsystems in ein solches konventionelles Melkverfahren könnte für jede betriebliche Form ein Herdenmanagement-System erstellt werden, welches den präventiven Tierschutz, die Milchqualität und die Wirtschaftlichkeit erheblich verbessern würde.

---

<sup>1</sup> Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Technologie und Biosystemtechnik, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, tb@fal.de

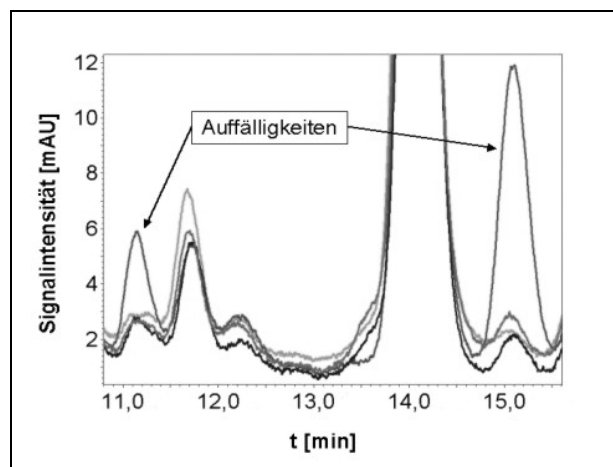
<sup>2</sup> Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Betriebstechnik und Bauforschung, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, bb@fal.de

Die Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines online-Sensorsystems zur Früherkennung von Eutererkrankungen war die Identifikation von physiko-chemischen Parametern in frisch ermolkenen Milch, die krankheitsbedingte Veränderungen der Milchezusammensetzung zuverlässig wiedergeben. Hinzu kommt, dass neben einer ausreichenden Sensitivität vor allem auch die Wirtschaftlichkeit der Messung geeigneter Mastitisindikatoren in der betrieblichen Praxis gewährleistet werden musste.

## 2 Screening nach Mastitisindikatoren

Die Milchezusammensetzung ist von vielen beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Faktoren abhängig, auf denen bei der Interpretation von Messdaten ein besonderes Augenmerk lag. Bei diesen Faktoren handelt es sich zum einen um physiologische Gesichtspunkte wie Rasse, Vererbung, Züchtung, Alter des Milchtieres und Laktationsstadium. Zum anderen spielen auch äußere Einflussfaktoren wie Jahreszeit, klimatische Einflüsse, Fütterung, Standort und Haltung der Milchtiere und die Melktechnik eine große Rolle. Durch die nicht zu vernachlässigenden Auswirkungen dieser Faktoren wird eine allgemeingültige Identifikation von Mastitisparametern wesentlich erschwert, da zum Teil erhebliche Schwankungen in der Zusammensetzung der Milch auftreten. Aus diesem Grund und aufgrund der Tatsache, dass Mastitiden durch die anatomische Trennung der einzelnen Euterviertel meist nur auf einem oder zwei Vierteln auftreten, wurden während der Voruntersuchungen immer nur die Messdaten zeitgleich genommener Viertelgemelksproben eines Tieres miteinander verglichen. Hierdurch konnte eine Kompensation der Auswirkungen der physiologischen und äußeren Einflussfaktoren erreicht werden.

Für die Durchführung der Voruntersuchungen wurde auf eine HPLC (Hochleistung-Flüssigkeitschromatographie) zurückgegriffen, um die Milch durch verschiedene Aufbereitungsverfahren, Methoden und Applikationen in ihre Einzelbestandteile aufzutrennen zu können. Das geschah vor dem Hintergrund, ein sehr großes Spektrum an Milchinhaltsstoffen auf eventuelle krankheitsbedingte Konzentrationsänderungen hin zu beobachten. So wurden die Viertelgemelksproben von insgesamt acht Tieren mit einer nachweislich klinischen Mastitis untersucht. Bei diesen Tieren handelte es sich um FAL-eigene und externe Kühe der Rasse Schwarzbunt (Holstein-Friesen). Als Referenz diente die Anzahl an somatischen Zellen in der Milch (anerkannter Parameter zur Beurteilung des Gesundheitsstatus) und bakteriologische Untersuchungen. Bei allen acht Tieren konnten in der Milch des jeweiligen erkrankten Euterviertels zellzahlabhängige Auffälligkeiten entdeckt werden. In Abbildung 1 ist ein Ausschnitt eines HPLC-Chromatogramms dargestellt, in dem die Messsignale von vier zeitgleich genommenen Viertelgemelksproben eines dieser Tiere übereinander gelegt wurden.



**Abbildung 1:** Zellzahlabhängige Auffälligkeiten in vier Viertelgemelksproben einer Kuh

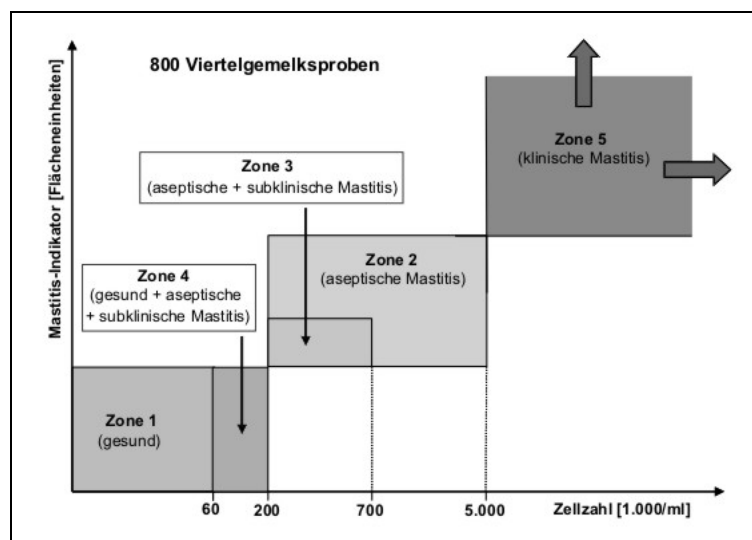
In dieser Abbildung sind die über einer Zeitachse aufgetragenen Signalintensitäten zu sehen. Nach knapp über 11 und 15 Minuten ist deutlich zu erkennen, dass die Konzentrationen zweier Substanzen eines Euterviertels im Gegensatz zu den übrigen drei Vierteln um ein Vielfaches erhöht waren. Analog hierzu wurden auch stark erhöhte Zellzahlen in dem auffälligen Viertel gefunden (802.000 Zellen/ml). Dieser Sachverhalt ist bei der Analyse der Milchproben der anderen Versuchstiere bestätigt worden. Im Anschluss daran wurden die zwei Substanzen quali- und quantifiziert. Hierbei hat sich die im Chromatogramm bei knapp über 15 Minuten befindliche Substanz in Bezug auf die Sensitivität bei subklinischen und aseptischen Mastitiden und die wirtschaftliche Messbarkeit als besonders geeignet herausgestellt.

### 3 Verifizierung des identifizierten Mastitisindikators

Um die Eignung des bei den HPLC-Screenings identifizierten Mastitisindikators zur zuverlässigen Einschätzung des Gesundheitsstatus von Kuheutern zu bestätigen, wurde in der Versuchsstation der FAL eine Kuhgruppe mit 15 Tieren zusammengestellt und über eine Laktationsperiode hinweg wöchentlich beprobt. Diese Tiere gehörten wie die während der Vorversuche beprobten Kühe ebenfalls der Rasse Schwarzbunt (Holstein-Friesen) an. Für diese Hauptuntersuchungen wurde ein spezielles Versuchsprogramm zusammengestellt, um den Mastitisindikator zusätzlich zu den Referenzen Zellzahl und bakteriologische Befunde mit weiteren Parametern der Standardmilchuntersuchung und mit schon länger aus der Literatur bekannten Parametern zu vergleichen.

Der Milchwirtschaftliche Kontroll- und Untersuchungsverband (MKU) in Uelzen untersuchte die Milchproben auf Zellzahl, Laktose, pH-Wert, Harnstoff, Eiweiß und Fett. Beim Eutergesundheitsdienst in Hannover-Ahlem wurden die bakteriologischen Untersuchungen durchgeführt, während das Institut für Betriebstechnik und Bauforschung (BB) der FAL Informationen zu den Parametern Leitfähigkeit und Farbparameter (Helligkeit, rot-grün, gelb-blau) lieferte. Im Institut für Technologie und Biosystemtechnik (TB) der FAL wurde der identifizierte Mastitisindikator quantifiziert und die gesamten Daten zur Ermittlung von möglichen Korrelationen ausgewertet. Insgesamt sind so die Daten von ca. 800 Viertelgemelksproben für repräsentative Ergebnisse erfasst worden.

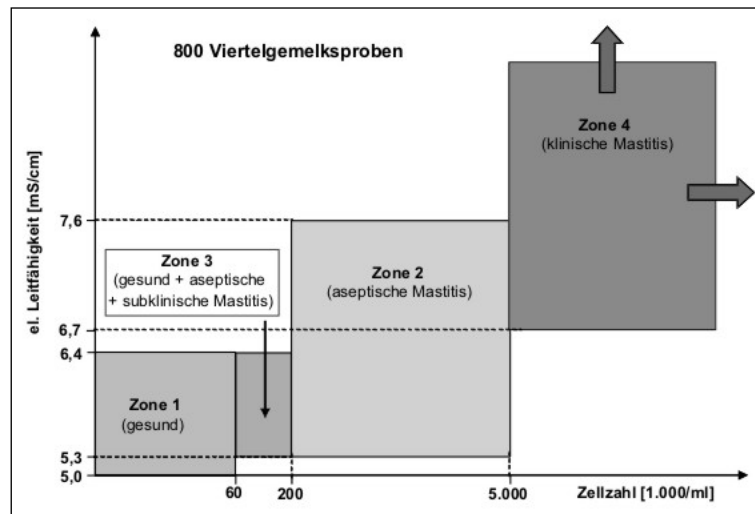
Die Auswertung der Messergebnisse hat ergeben, dass von den untersuchten Parametern neben dem Mastitisindikator die Leitfähigkeit und der Laktosegehalt auf subklinische und aseptische Krankheitsverläufe reagierten. Um einen ersten Überblick über die Zusammenhänge dieser drei Parameter zur Zellzahl und den bakteriologischen Befunden zu erhalten, werden im Folgenden die ca. 800 Viertelgemelksproben aller Tiere in einer statischen Betrachtung zusammengefasst. Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeiten und Zusammenhänge des Mastitisindikators mit den Referenzdaten.



**Abbildung 2:** Mastitisindikator in Abhängigkeit zur Zellzahl und bakteriologischen Befunden

Die bei der Analyse erfassten und über der Zellzahl aufgetragenen Flächeneinheiten der HPLC-Mastitisindikator-Peaks sind als Äquivalent zu dessen Konzentration zu verstehen. Auf den ersten Blick fällt auf, dass Zone 1, das Zonenpaar 2 und 3 sowie Zone 5 eindeutig voneinander getrennt sind. Und das, obwohl die physiologischen und äußeren Einflussfaktoren auf die Milchezusammensetzung bei dieser Betrachtungsweise noch nicht kompensiert worden sind. Da die physiologische Norm des Mastitisindikators aber nahezu gegen null tendierte, war die Schwankungsbreite der Konzentration in Milch von gesunden Tieren erwartungsgemäß sehr gering. Die Differenzierung zwischen einer aseptischen und subklinischen Mastitis war weder durch den Mastitisindikator noch durch die Zellzahl möglich (siehe Zone 2 und 3). Ohne die Kompensation der Einflussfaktoren stellte Zone 4 in dieser statischen Betrachtungsweise ein Problem dar, da sich in ihr keine eindeutige Abgrenzung zwischen gesund, aseptisch und subklinisch festlegen ließ. Eine weitere sehr wichtige Erkenntnis war, dass die Werte bei einer subklinischen Mastitis von allen Krankheitsformen am geringsten ausfielen. Teilweise lagen sie sogar fast auf dem jeweiligen Grundniveau.

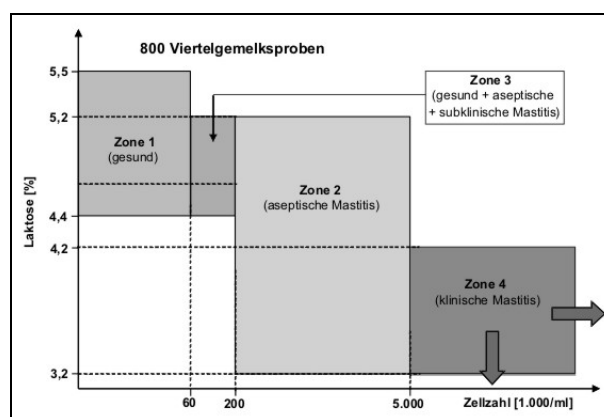
Ein Grund für diese Tatsache könnte das Auftreten eines so genannten Gewöhnungseffekts sein. Wird die Leitfähigkeit unter identischen Gesichtspunkten betrachtet, fällt auf, dass die Grenzen zwischen den einzelnen Zonen wesentlich weniger ausgeprägt waren (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Leitfähigkeit in Abhängigkeit zur Zellzahl und bakteriologischen Befunden

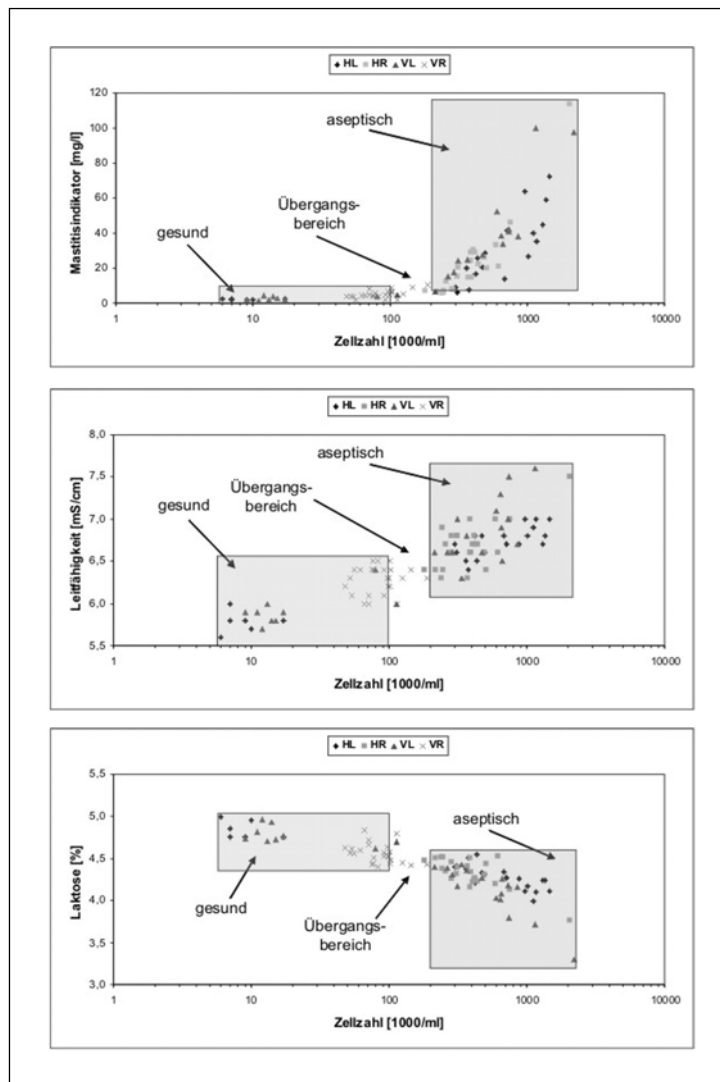
Es war also nur eingeschränkt möglich, zwischen gesund, aseptisch, subklinisch und klinisch zu unterscheiden. Zone 1 mit den Messdaten von gesunden Tieren überschneidet sich im Bereich von 5,3 - 6,4 mS/cm mit Zone 3 (aseptische Mastitis). Ähnlich verhielt es sich mit den Zonen 2 und 4. Im Bereich von 6,7 - 7,6 mS/cm konnte keine Unterscheidung zwischen einer aseptischen und einer klinischen Mastitis erfolgen. Auch bei diesem Parameter war in diesem Fall mit Zone 3 ein Problembereich vorhanden, der hauptsächlich auf der nicht durchgeführten Kompensation der verschiedenen Einflussfaktoren beruhte. Da Milch von Grund auf eine hohe Ionenstärke aufweist, war die Sensitivität der Leitfähigkeit eher gering. So muss die Integrität bzw. die Permeabilität der Blut-Euter-Schranke relativ stark verändert sein, um zuverlässige Aussagen treffen zu können.

Der dritte Parameter, der in unseren Untersuchungen auf Mastitiden reagierte, ist die Laktose. Im Gegensatz zum Mastitisindikator und zur Leitfähigkeit fiel der Gehalt an Laktose mit zunehmender Stärke einer Eutererkrankung (Abbildung 4). Durch die auftretenden Permeabilitätsstörungen der Blut-Euter-Schranke diffundiert Laktose verstärkt aus der Milch ins Blut. Dies dient dazu, die durch die Passage der im Parameter Leitfähigkeit enthaltenen Ionen vom Blut in die Milch verursachte Störung des osmotischen Druckverhältnisses im Euter auszugleichen.



**Abbildung 4:** Laktosegehalt in Abhängigkeit zur Zellzahl und bakteriologischen Befunden

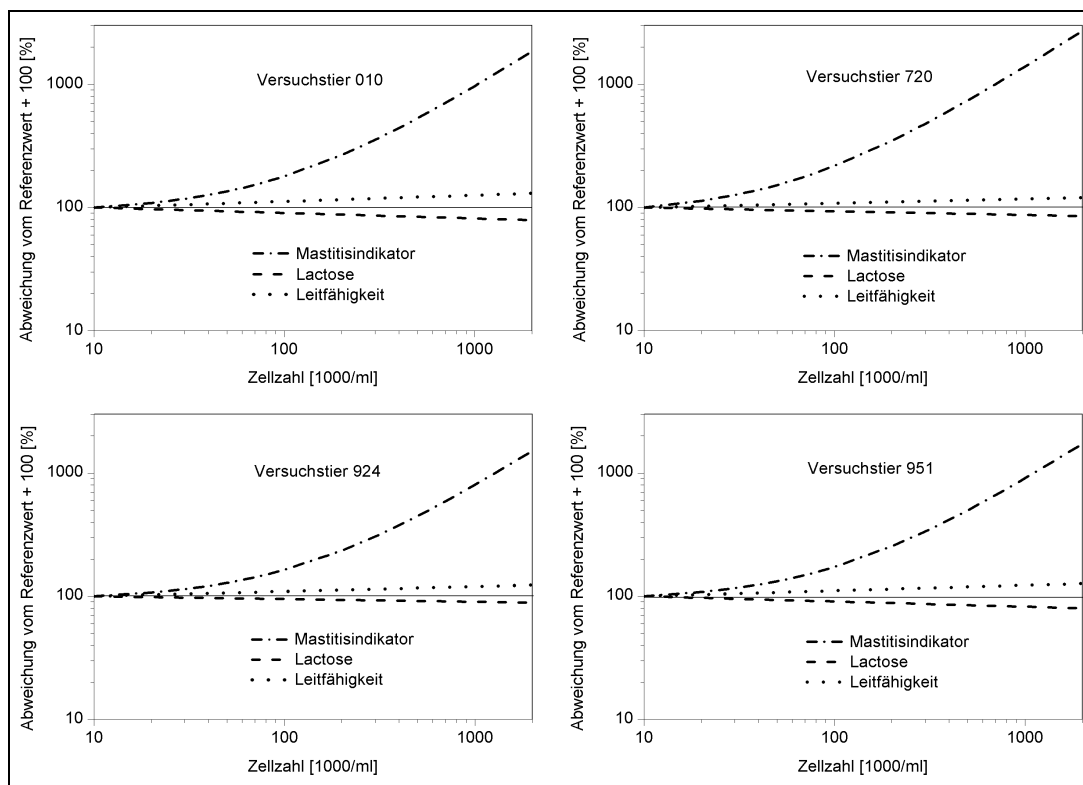
Ähnlich wie bei der Leitfähigkeit, war auch hier keine eindeutige Differenzierung zwischen gesund, aseptisch, subklinisch und klinisch möglich. Zone 1 (gesund) und Zone 2 (aseptisch) überschneiden sich im Bereich von 5,2 und 4,4 %. Als sehr problematisch stellte sich ebenfalls das Zonenpaar 2 und 4 dar. Zwischen 4,2 und 3,2 % Laktose konnte nicht zwischen einer aseptischen und einer klinischen Mastitis unterschieden werden. Wie auch beim Mastitisindikator und der Leitfähigkeit existierte bei der Laktose eine durch fehlende Kompensation der oben erwähnten physiologischen und äußeren Einflussfaktoren entstandene Problemzone (Zone 3). In dieser Zone befinden sich Daten aus den Bereichen gesund, aseptisch und subklinisch. Die im Gegensatz zum Mastitisindikator geringere Sensitivität der Laktose war wie bei der Leitfähigkeit auf das hohe physiologische Grundniveau zurückzuführen. In das Raster bei der statischen Betrachtung der Messdaten zu verkleinern bzw. zu verfeinern, musste jede Kuh als separate Einheit angesehen werden. Zusätzlich war es sinnvoll, auch die einzelnen Euterviertel als eigenständiges System zu definieren. Zu diesem Zweck sind in Abbildung 5 die Parameter Mastitisindikator (oben), Leitfähigkeit (Mitte) und Laktose (unten) eines Versuchstieres viertelspezifisch in Abhängigkeit zur Zellzahl und den bakteriologischen Untersuchungen dargestellt.



**Abbildung 5:** Tierspezifische Abhängigkeit von Mastitisindikator, Leitfähigkeit und Laktose zur Zellzahl und bakteriologischen Befunden (HL: hinten links; HR: hinten rechts; VL: vorne links; VR: vorne rechts)

Die mit "gesund" gekennzeichneten Kästchen stellen die Schwankungsbreite der Messwerte im Bereich bis 100.000 Zellen/ml dar. Dieser Wert ergibt sich aus der Definition für noch nicht vorhandene Sekretionsstörungen bzw. Erkrankungen mit positivem Erregerbefund (50.000 Zellen/ml) plus der doppelten Standardabweichung. Von 100.000 bis 200.000 Zellen/ml ist ein Übergangsbereich zwischen gesunden und erkrankten Eutervierteln festgelegt worden. Alle Daten über 200.000 Zellen/ml wurden aufgrund fehlender positiver Erregernachweise und offensichtlicher Symptome einer unspezifischen bzw. aseptischen Erkrankung zugeordnet. Auch mit diesem feineren Raster fanden sich bei der Leitfähigkeit und der Laktose Überschneidungen bezüglich gesunder und aseptisch erkrankter Viertel, während die beiden Zonen beim Mastitisindikator weiterhin wesentlich eindeutiger voneinander getrennt waren. Allerdings waren die Streuungen in den aseptischen Bereichen der drei Parameter auf Viertelzebene in dieser kleinstmöglichen Auflösung der statischen Betrachtungsweise für eine präzise Einschätzung des Gesundheitsstatus, bezogen auf die hohen Ansprüche, noch nicht ausreichend genug.

Um die Sensitivitäten des Mastitisindikators, der Leitfähigkeit und der Laktose aufgrund unterschiedlicher Einheiten (mg/l, mS/cm, %) direkt graphisch und mathematisch miteinander vergleichen zu können, mussten die Messwerte normiert werden. Hierzu wurden die gemittelten prozentualen Abweichungen zum jeweiligen physiologischen Referenzwert berechnet. Aufgrund der sinkenden Laktosewerte sind die Referenzwerte gleich 100 % gesetzt worden. Für Laktose und Leitfähigkeit ließen sich potentielle Ansätze in der Form  $y=a*x-b$  bzw.  $y=a*x$  anwenden. Für den Mastitisindikator konnte ein linearer Ansatz in der Form  $y=a*x+b$  gewählt werden. Die Viertelgemelksdaten von vier Tieren sind im relevanten Bereich zwischen 10.000 und 2.000.000 Zellen/ml in Abbildung 6 zu sehen.



**Abbildung 6:** Normierte, zellzahlabhängige Änderungen von Mastitisindikator; Laktose und Leitfähigkeit

Durch das Auftragen der normierten, zellzahlabhängigen Daten ist sehr gut zu erkennen, dass der Mastitisindikator bei allen vier Kühen eine wesentlich höhere Sensitivität als Laktose und die Leitfähigkeit aufgewiesen hat. Schon bei einer Zellzahl von 100.000 Zellen/ml waren die mittleren Abweichungen von den Referenzwerten beim Mastitisindikator um bis zu 90 % höher als die der anderen beiden Parameter. Dabei reagierten alle Parameter (auch die Zellzahl) völlig unabhängig von der Art der jeweiligen Erkrankungsform. Durch die bakteriologischen Untersuchungen konnte dem Versuchstier 010 eine auf Staphylokokken zurückzuführende subklinische Mastitis zugeschrieben werden. Die Milch der Tiere 720, 924 und 951 blieb ohne positiven Erregerbefund (aseptische bzw. unspezifische Mastitis).

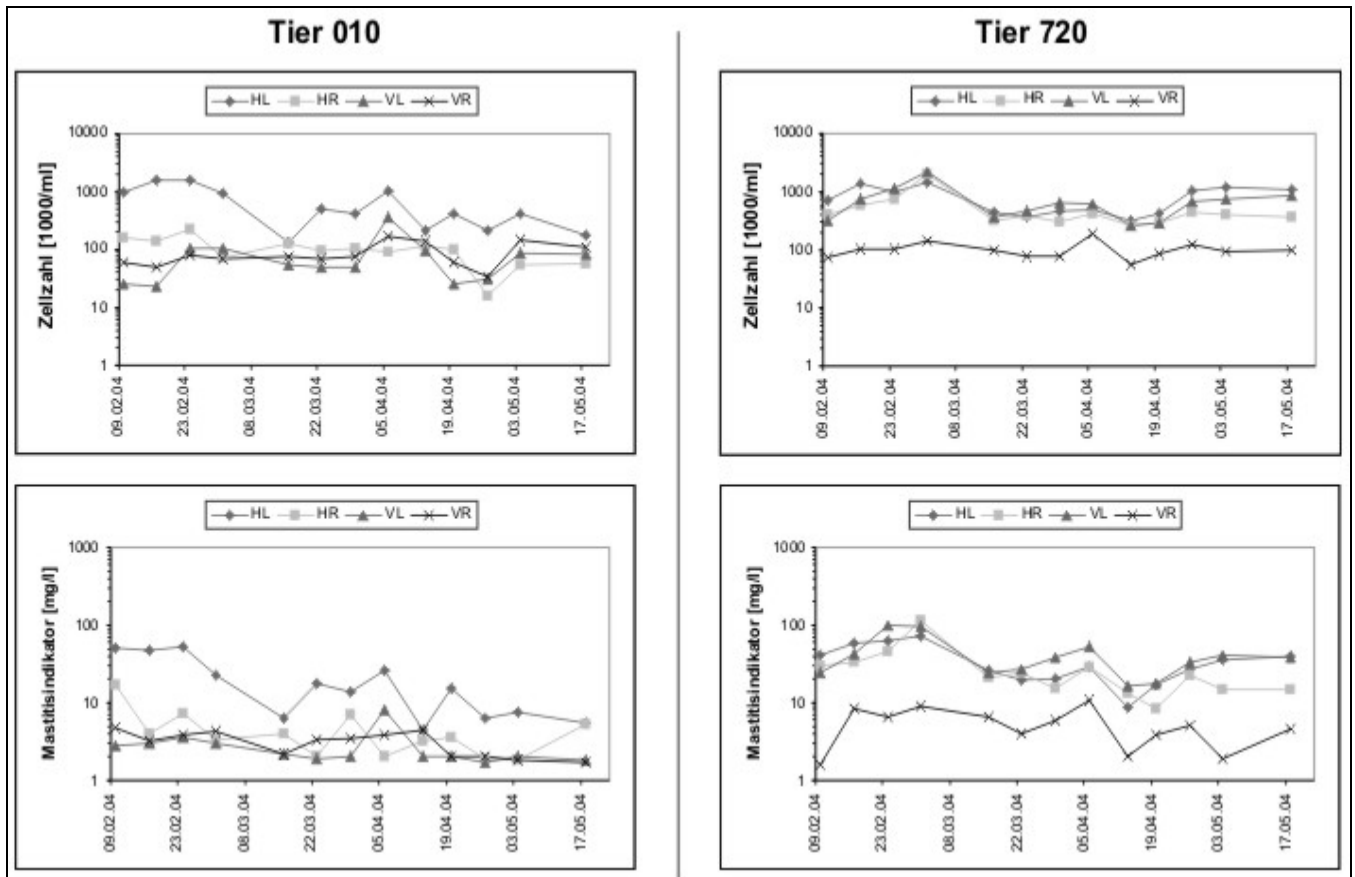
Um ein Maß für die Sensitivitäten zu erhalten, wurden aus den Beträgen der normierten Messdaten entsprechende neue Funktionen gebildet. Für Laktose und die Leitfähigkeit ergab sich die logarithmische Form  $y=a*\ln(x)-b$ . Der Mastitisindikator blieb bei einer linearen Ausrichtung. Anschließend sind diese Funktionen in den Grenzen 10 bis 2.000 Zellen\*1000/ml integriert worden. In Tabelle 1 sind die normierten Sensitivitätsmaße als Flächeneinheiten in FE/1000 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Normierte, zellzahlabhängige Sensitivitätsmaße von Mastitisindikator, Laktose und Leitfähigkeit

Versuchstier	Normiertes Sensitivitätsmaß [FE/1000]		
	Mastitisindikator	Laktose	Leitfähigkeit
010	1740	35	48
720	2590	24	32
924	1408	18	37
951	1615	33	67

Die normierten Sensitivitätsmaße des Mastitisindikators erstreckten sich von knapp 1400 bis 2600, während Laktose und die Leitfähigkeit nur maximal 35 bzw. 67 erreichten. Das Verhältnis von Leitfähigkeit und Laktose befindet sich im Bereich zwischen 1,3 und 2,0. Der Mastitisindikator wies gegenüber der Leitfähigkeit Verhältnisse im Bereich von 24 bis 81 bzw. 49 bis 108 gegenüber Laktose auf. Laktose und Leitfähigkeit waren aufgrund ihrer geringen Sensitivitäten nur bedingt geeignet, Aussagen über den Gesundheitszustand der Euter zuzulassen. Im Gegensatz dazu ist die diagnostische Qualität der Mastitisindikatorkonzentration schon in der statischen Betrachtung viel versprechend gewesen.

Um die Aussagekraft noch weiter zu erhöhen, sollte statt einer statischen eine dynamische Betrachtung der Messdaten erfolgen. Dies resultierte aus der Tatsache, dass jedes Tier auf identische Krankheitsverläufe in gewissen Grenzen unterschiedlich reagiert hat. Aus diesem Grund war die Tendenz (der Bereich zwischen zwei Messwerten) für eine zuverlässige Einschätzung des Gesundheitsstatus entscheidend. Dies beinhaltet die Erfassung des Anstiegs- und Abklingverhaltens der Mastitisindikatorkonzentration. In Abbildung 7 sind die Zeitverlaufskurven der Zellzahl und des Mastitisindikators der einzelnen Euterviertel von zwei Versuchstieren dargestellt.

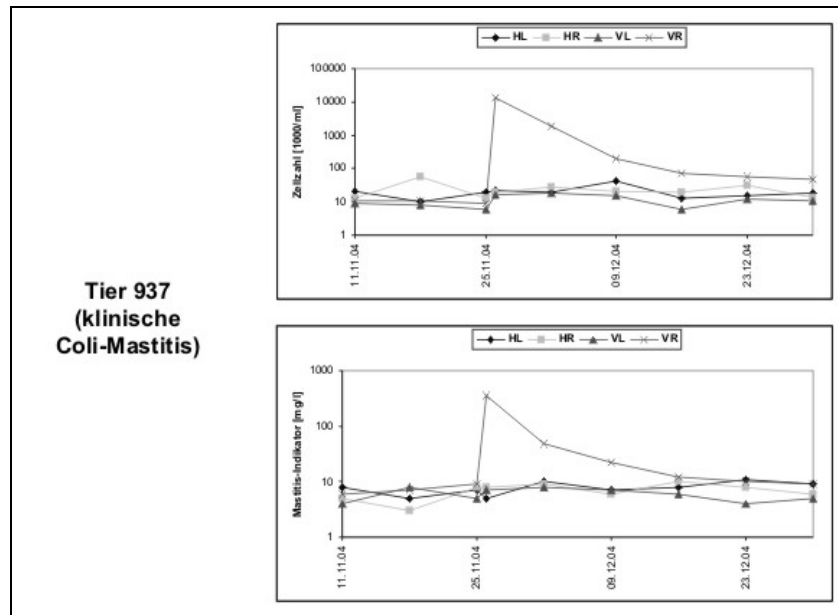


**Abbildung 7:** Euterviertelspezifische Zeitverlaufskurven von Zellzahl und Mastitisindikator bei zwei Versuchstieren (HL: hinten links; HR: hinten rechts; VL: vorne links; VR: vorne rechts)

Werden die Verläufe der Zellzahl mit den dazugehörigen Verläufen der Mastitisindikatorkonzentration rein qualitativ miteinander verglichen, fällt auf, dass die Charakteristik der Verläufe der entsprechenden Tiere nahezu identisch war. Durch diese Erkenntnis könnte die Messung der Mastitisindikatorkonzentration bei einer wirtschaftlichen Umsetzung in die Praxis unter Umständen den anerkannten Parameter "Zellzahl" ersetzen. Dies eröffnet die Option zur Identifikation von Eutererkrankungen direkt vor Ort in sämtlichen Melkverfahren (automatisch und konventionell) und punktuell mit einem Handmessgerät.

Bei klinischen Krankheitsverläufen war die optische Übereinstimmung der Verläufe von Zellzahl und Mastitisindikator noch deutlicher zu erkennen. Als Beispiel dient hier der Verlauf einer bei einem Versuchstier aufgetretenen klinischen Coli-Mastitis (Abbildung 8).





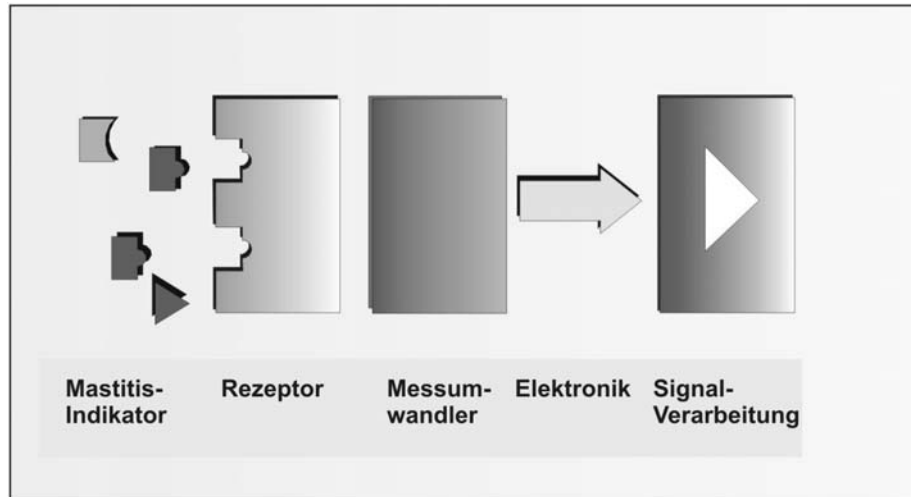
**Abbildung 8:** Euterviertelspezifische Zeitverlaufskurven von Zellzahl und Mastitisindikator eines Versuchstieres mit einer klinischen Coli-Mastitis (HL: hinten links; HR: hinten rechts; VL: vorne links; VR: vorne rechts)

Es ist gut zu erkennen, dass sowohl die Zellzahl als auch die Konzentration des Mastitisindikators ab dem Zeitpunkt der eintretenden Coli-Mastitis im betroffenen Euterviertel stark anstiegen und nach einer erfolgten Antibiotikabehandlung im Zuge des Heilungsprozesses langsam wieder ihr Normalniveau erreichten. Zusätzlich zur qualitativen Übereinstimmung stimmte auch die zeitliche Folge der Ereignisse (Krankheitsbeginn, Beginn des Heilungsprozesses, Ausheilung) überein.

Unter bestimmten Voraussetzungen stellt der Mastitisindikator also ein adäquates Mittel zur Früherkennung von Eutergesundheitsstörungen weit unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte dar. Durch die Ergebnisse und die daraus gewonnenen Erkenntnisse konnten Rahmenbedingungen für die Messung des Mastitisindikators zur Mastitisdiagnose eindeutig definiert werden. Zur Steigerung der Sensitivität des Messverfahrens und zur Vergleichbarkeit der Messwerte muss die Probenahme bzw. die Messung in der Milch des Viertelgemelks erfolgen. Zur Kompensation der physiologischen und äußeren Einflussfaktoren, sowie zur Identifikation einzelner erkrankter Euterviertel, sollte ein interner tierspezifischer Euterviertelabgleich erfolgen. Des Weiteren ist es sinnvoll, die Messdaten dynamisch zu betrachten, da einzelne Messergebnisse ohne Tendenz für eine Beurteilung des Gesundheitsstatus nicht ausreichend waren.

#### 4 Realisierung der Einzelkomponenten des online-Sensorsystems

Nach der erfolgten Verifizierung der Eignung des identifizierten Mastitisindikators zur Früherkennung von Eutererkrankungen konnte damit begonnen werden, einen entsprechenden Biosensor zu entwickeln. Dieser Sensor musste den Ansprüchen einer sensitiven, selektiven und wirtschaftlichen Messung gerecht werden. Unser Projektpartner TRACE Analytics GmbH hat in diesem Zusammenhang einen Sensor entwickelt, der den Indikator mit einer maximalen Messwertabweichung von 5 % quantifizieren kann. Für eine zuverlässige Diagnose ist die erreichte Empfindlichkeit vollkommen ausreichend. In Abbildung 9 ist das Messprinzip des entwickelten Sensors zu sehen.



**Abbildung 9:** Messprinzip des entwickelten Biosensors

Der Mastitisindikator kommt mit einem spezifischen Rezeptor (Enzym) in Berührung. Das entstehende Reaktionsprodukt wird anschließend an dem unmittelbar mit dem Rezeptor verbundenen Messumwandler (Elektrode) oxidiert. Der dabei entstehende Stromfluss ist innerhalb bestimmter Grenzen proportional zur Konzentration des Mastitisindikators. Solch ein hochempfindlicher Sensor kann aber nicht direkt in den Milchstrom eingesetzt werden. Dies liegt zum einen an der hoch turbulenten, nicht stetigen Strömung mit hohem Luftanteil und zum anderen an der Tatsache, dass das Enzym nicht mit heißen und zum Teil aggressiven Reinigungsmitteln in Kontakt kommen darf. Des Weiteren ist es für reproduzierbare Ergebnisse nötig, eine konstante Temperierung des Sensorchips zu gewährleisten. Um zu verhindern, dass der Sensorchip mit dem Milchlipid und Milcheiweiß in Berührung kommt, ist eine Dialysemembran vorgeschaltet, die nur die zu analysierenden Moleküle passieren lässt. Dadurch kann die Standzeit und damit auch die Wirtschaftlichkeit erheblich gesteigert werden.

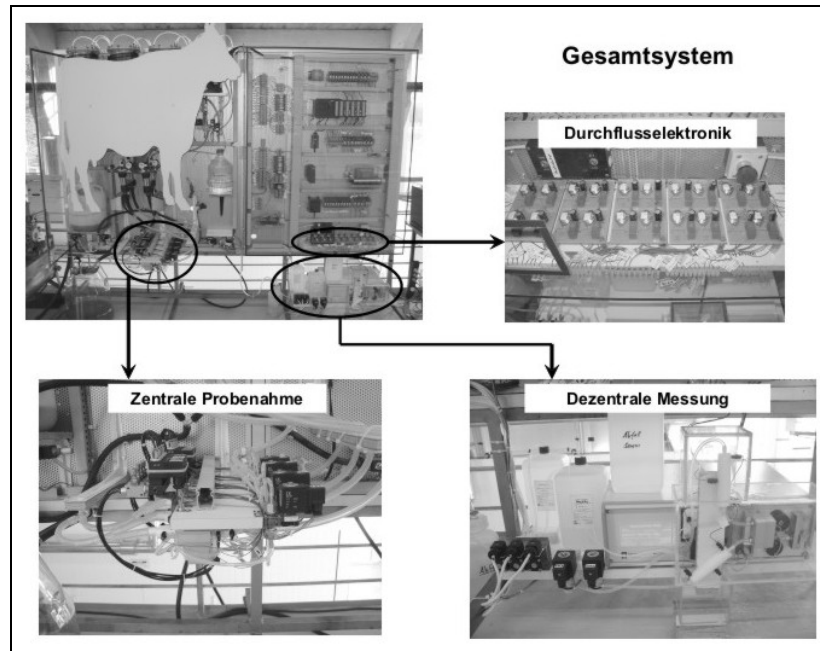
Aufgrund der nicht unerheblichen Einschränkungen bestand eine der Hauptaufgaben darin, eine Schnittstelle zwischen Tier bzw. Milchleitung und Sensor in Form einer voll automatisierten Probenahme-Einrichtung zu entwickeln. An diese Probenahme-Einrichtung wurden in Bezug auf die Milchprobe, den Probenahmeprozess, die Reinigung des Systems und die physikalischen Eigenschaften sehr hohe Ansprüche gestellt.

Anhand der definierten Rahmenbedingungen konnte ein Prototyp realisiert werden, dessen grundsätzliche Eignung in umfangreichen Tests bestätigt werden konnte. Eine weitere große Herausforderung stellte der nächste Entwicklungsschritt der Probenahme-Einrichtung dar. Dabei handelte es sich um die "blinde" Automation. Die Einrichtung muss automatisch erkennen können, wann die Probenahme zu erfolgen hat. Da die Probenahme aufgrund einer unerlässlichen reproduzierbaren Gemelksfraktion nicht zeitgesteuert werden kann, musste eine geeignete Durchflusssensorik entwickelt werden, die den richtigen Zeitpunkt der Probenahme an die Steuerung weitergibt. Erschwerend kam hinzu, dass diese Sensorik die gleichen Rahmenbedingungen und hohen Anforderungen wie die Probenahme-Einrichtung erfüllen muss. Auch für diesen Entwicklungsschritt konnte ein Prototyp eines spezifischen Durchflusssensors entwickelt werden, der nicht nur bei der Probenahme, sondern im gesamten Sensorsystem zum Einsatz kommt.

## 5 Realisierung des gesamten online-Sensorsystems

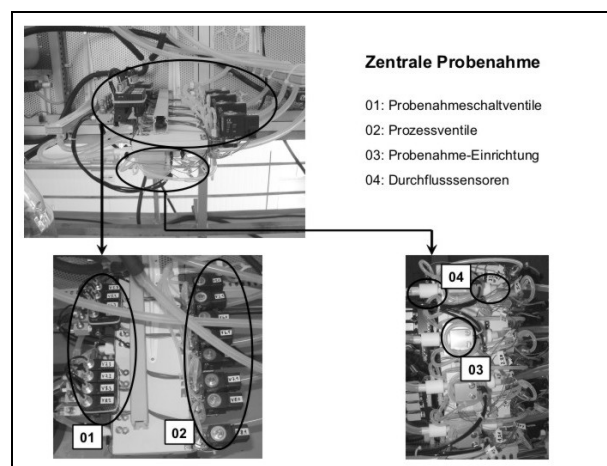
Zur Umsetzung des Gesamtverfahrens sind die entwickelten Einzelkomponenten Probenahme-Einrichtung, Durchflusssensorik und Biosensor in einen für die Tests konzipierten Versuchsstand integriert worden. Dieser Versuchsstand erlaubt durch die Simulation eines Melkvorganges, unter definierten Bedingungen zu arbeiten. Die Hauptbestandteile dieses Gesamtsystems sind die zentrale Probenahme, die dezentrale Messung und die Durchflusselektronik (Abbildung 10).

Die Hauptaufgabe bestand darin, die Komponenten aufeinander abzustimmen (Synchronisation) und entsprechende Software-Algorithmen zu erarbeiten, so dass die Steuerung und der von TRACE Analytics GmbH entwickelte Biosensor durch eine zuverlässige Kommunikation einen reibungslosen Prozessablauf garantieren. Dies umfasst die Probenahme, den Probentransport, die Messung, die Systemreinigung und die Kalibrierung des Sensors.



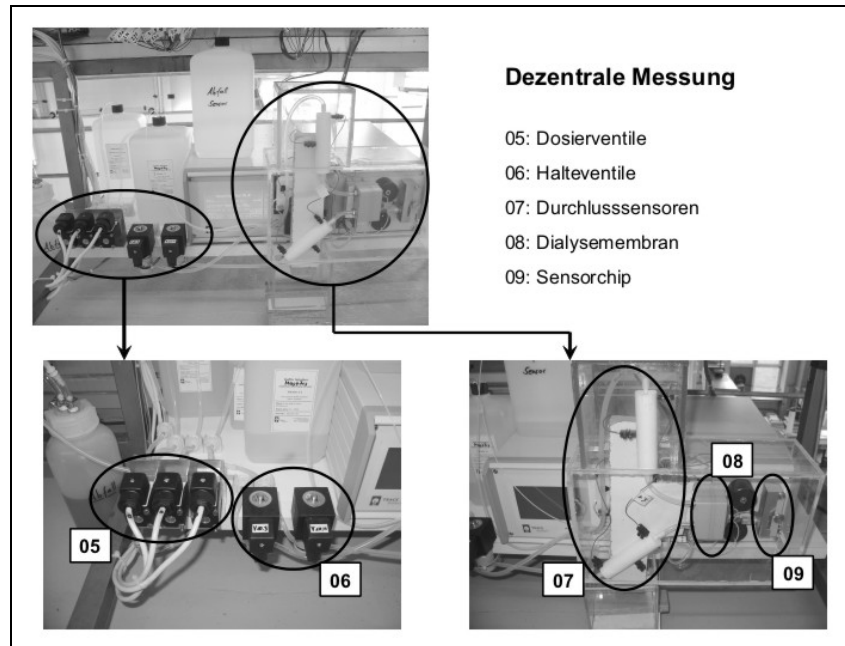
**Abbildung 10:** Hauptprozesse des online-Sensorsystems

Die zentrale Probenahme besteht hauptsächlich aus vier Prozessbereichen (Abbildung 11). Probenahmeschaltventile (01) regeln die zur Betätigung der Probenahme-Einrichtung benötigte Druckluft. So werden die Schaltstellungen "Probenahme" und "Melken" durch die entsprechende, einseitige Belastung von doppelwirkenden Druckzylindern realisiert. Für die Steuerung der Systemreinigung und des Probentransports sind die Prozessventile (02) zuständig. Sie öffnen oder schließen das System bzw. regeln, ob Transportluft oder Reinigungslösung durch das System gesaugt wird. Den Dreh- und Angelpunkt stellen die Probenahmeventilkörper der Probenahme-Einrichtung (03) dar. Für jedes Euterviertel ist ein Ventilkörper vorgesehen, der jeweils durch einen vor- und nachgeschalteten Durchflusssensor (04) in seiner Funktion automatisiert ist.



**Abbildung 11:** Zentrale Probenahme des online-Sensorsystems

Für die eigentliche Messung ist die dezentrale Messung zuständig. Die in Abbildung 12 zu sehenden Hauptbestandteile realisieren die Messung der Milchproben und die Kalibrierung des Biosensors. Vor dem Messvorgang zeigen die Durchflusssensoren (07) an, ob die Milchprobe nach dem Transportvorgang an der Dialysemembran (08) anliegt. Anschließend werden die Halteventile (06) geschlossen, um die Milchprobe während des Anreicherungs- und Messvorgangs zu fixieren. Die durch die Membran diffundierten Moleküle werden in einem separaten Kreislauf dem Sensorchip (09) zur Analyse zugeführt. Nachdem das Messgerät der Steuerung mitgeteilt hat, dass die Analyse erfolgreich stattgefunden hat, werden die Halteventile (06) wieder geöffnet und die Probe verworfen. Sobald die Durchflusssensoren (07) das Signal für ein entleertes System geben, kann die nächste Probe zur Dialysemembran (08) transportiert werden.



**Abbildung 12:** Dezentrale Messung des online-Sensorsystems

Die Zudosierung von Puffer- und Standardlösung während der Kalibrierung erfolgt über Dosierventile (05). Für die 2-Punkt-Kalibrierung stehen neben einer Null-Pufferlösung zwei Standardlösungen zur Verfügung. Der Analyseablauf erfolgt analog zur oben erwähnten Analyse der Milchproben.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Eignung des in umfangreichen HPLC-Screenings identifizierten Mastitisindikators zur Früherkennung von Eutererkrankungen konnte während laktationsbegleitender Untersuchungen von ca. 800 Viertelgemelksproben (15 Versuchskühe) bestätigt werden. Eine Erfassung von Mastitiden ist mit diesem Indikator weit unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte möglich. Unter gewissen Voraussetzungen lässt sich die Eutergesundheit mit fast identischer Aussagekraft wie über eine Zellzahlbestimmung einschätzen. Hierzu gehört neben der Probenahme aus dem Viertelgemelk und einem internen tierspezifischen Euterviiertelabgleich die dynamische Betrachtung der Messdaten. Alle aufgetretenen Mastitisformen wurden anhand der Konzentrationsänderungen des Mastitisindikators nachgewiesen. Dazu zählten Erkrankungen, die durch Erreger wie Streptokokken, Staphylokokken und coliforme Keime verursacht wurden. Aber auch eine aseptische Mastitis ohne positiven Erregerbefund konnte nachgewiesen werden. Nach den gewonnenen Erkenntnissen kann demnach der identifizierte Mastitisindikator zur Identifikation sämtlicher entzündlicher Eutererkrankungen herangezogen werden.

Für die technische Umsetzung wurde von Fa. TRACE Analytics GmbH ein Biosensor entwickelt, der den Mastitisindikator sensitiv, selektiv und wirtschaftlich messen kann. Es konnte eine maximale Abweichung von 5 % zum Sollwert erreicht werden. Diese Abweichung ist für die Mastitisiagnose ausreichend und muss nicht zwingend verringert werden. Da dieser hochempfindliche Sensor nicht direkt in eine Milchleitung eingebaut werden kann und auch der Kontakt mit Milch (Fett, Eiweiß) vermieden werden sollte, wurde eine voll automatisierte Probenahme-Einrichtung entwickelt. Mit dieser Einrichtung und spezifischen Durchflusssensoren ist es möglich, eine reproduzierbare Milchprobe zu einem dezentral gelegenen Biosensor zu leiten.

Dort kann die Milch unter definierten Bedingungen analysiert werden. Die Einzelkomponenten wurden aufeinander abgestimmt und mit Hilfe eines speziellen Versuchsstands zu einem voll funktionstüchtigen Prototypen eines Gesamtsensorsystems zusammengefügt. Aufgrund der hervorragenden Diagnosequalität des Mastitisindikators und der Rahmenbedingungen der am 01.01.2006 verbindlich in Kraft tretenden EG-Verordnung Nr. 835/2004 ist auch der Einsatz eines solchen Systems in konventionellen Melkverfahren denkbar. Nach dieser Verordnung ist es dem Landwirt selbst überlassen, ob er sich vor jedem Melkvorgang persönlich von der Güte der Milch überzeugt, oder eine andere Methode anwendet, mit der die Milch auf organoleptische sowie abnorme physikalisch-chemische Merkmale hin kontrolliert werden kann. Aus diesem Grund wurden die Komponenten und das Gesamtsystem so konzipiert, dass eine Integration in konventionellen Melkverfahren grundsätzlich möglich ist. Durch die kontinuierliche Überwachung des Gesundheitsstatus der Herde wäre es möglich, gefährdete Tiere sofort zu erkennen und entsprechend vorbeugend zu reagieren.

Weiterhin wäre es möglich, auch andere Sensoren (z.B. on-farm-Milchanalyse, Kolostralmilcherkennung) für die Überwachung und Kontrolle der Milchqualität in das System einzusetzen. Dies trifft prinzipiell auf alle Sensoren zu, die zu empfindlich für einen direkten Einbau in eine Milchleitung sind. Im nächsten Jahr (2006) wird das im Labor entwickelte online-Sensorsystem für automatische Melkverfahren einem auf Einsatzfähigkeit und Langzeitstabilität ausgerichteten Praxistest unterzogen.

