Universitätsklinik für Wiederkäuer
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael Hess, Diplomate ECVPS

Fach: Wiederkäuermedizin
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Diplomate ECBHM

Vergleichende Untersuchungen zur Messung der somatischen Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilch

Diplomarbeit

zur Erlangung der Würde einer
Magistra Medicinae Veterinariae
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von
Andrea Gunzer
Wien, im Jänner 2021

Erster Begutachter und Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Diplomate ECBHM Universitätsklinik für Wiederkäuer Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin Veterinärmedizinische Universität Wien
Mitbetreuende Assistentin:	Dr. med. vet. Martina Baumgartner Universitätsklinik für Wiederkäuer Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin Veterinärmedizinische Universität Wien
Zweiter Begutachter:	Dr. med. vet. Priv.-Doz. Michael Iwersen Universitätsklinik für Wiederkäuer, Bestandsbetreuung bei Wiederkäuern Veterinärmedizinische Universität Wien

Eidesstattliche Erklärung: Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Andrea Gunzer

Wien, Jänner 2021

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CMT	California Mastitis Test
CPP	Zytoplasmatische Partikel
DCC	DeLaval Cell Counter
ICC	Intra-Class- Korrelationskoeffizient
PMG	Pyronin-Y-Methyl-Grün
SCC	Somatische Zellzahl
Tab.	Tabelle
S.	Staphylococcus

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 5
1. Einleitung und Fragestellung 8
2. Literaturübersicht 10
2.1. Die somatische Zellzahl in der Milch als Parameter für die Beurteilung der Eutergesundheit 10
2.1.1. Ökonomische Bedeutung von Mastitiden 10
2.1.2. Die Bedeutung der Zellzahl 10
2.2. Parameter zur Beurteilung der Schafmilch 10
2.2.1. Zusammensetzung der Milchinhaltsstoffe in der Schafmilch 10
2.2.2. Zelltypen in der Schafmilch 11
2.2.3. Physiologische Zellzahl in der Schafmilch 12
2.3. Parameter zur Beurteilung der Ziegenmilch 12
2.3.1. Zusammensetzung der Milchinhaltsstoffe in der Ziegenmilch 12
2.3.2. Zelltypen in der Ziegenmilch 13
2.3.3. Physiologische Zellzahl in der Ziegenmilch 13
2.3.4. Besonderheiten in der Ziegenmilch 14
2.3.4.1. Milchsekretion 14
2.3.4.2. Zytoplasmatische Partikel 14
2.4. Einflussfaktoren auf die Zellzahl 15
2.4.1. Infektiöse Ursachen 15
2.4.2. Nichtinfektiöse Ursachen 17
2.4.2.1. Intrinsische Faktoren 17
2.4.2.2. Extrinsische Faktoren 19
2.4.3. Methodische Faktoren 20
2.4.3.1 Zählverfahren 20
2.4.3.2 Konservierung 21
2.5. Methoden zur Messung der somatischen Zellzahl 22
2.5.1. Indirekte Schätzung der somatischen Zellzahl 22
2.5.1.1. California Mastitis Test 22
2.5.2. Direkte Messung der SCC mittels Direktausstrich/Direkter Mikrokopie 22
2.5.3. Direkte Messung der SCC mittels Zellzahlmessgeräten in der Schaf- und Ziegenmilch 23
2.5.3.1. DeLaval Cell Counter® 23
2.5.3.2. Fossomatic/Combifoss® 24

2.5.3.3. HrimaPro SCC® 27
3. Material und Methoden 30
3.1. Fallzahlschätzung und Studiendesign 30
3.2. Milchprobenentnahme 30
3.3. Untersuchungen im Labor 31
3.3.1. Probenvorbereitung 31
3.3.2. California-Mastitis-Test (CMT) 31
3.3.3. Zellzahlbestimmung mit dem DeLaval Cell Counter® (DCC) 33
3.3.4. Zellzahlbestimmung mit dem HrimaPro SCC®-Gerät 34
3.3.5. Zellzahlbestimmung mit dem Combifoss®-Gerät 35
3.3.6. Messung der Präzision und des Einflusses des Tiefgefrierens 35
3.3.7. Messvergleich von verdünnten zu unverdünnten Schafmilchproben 35
3.4. Statistische Auswertung der Testergebnisse 36
3.4.1. Scatterplot 36
3.4.2. Boxplot 36
3.4.3. Bland-Altman- Plot 36
3.4.4. Kolmogorov-Smirnov-Test 37
3.4.5. Intra-Class-Korrelationskoeffizient 37
4. Ergebnisse 38
4.1. Datengrundlage 38
4.2. Scatterplots zur Darstellung des Zusammenhangs der Zellzahlergebnisse der Messmethoden mit der Referenzmethode 40
4.3. Scatterplot zur Darstellung des Einflusses der Milchinhaltstoffe auf die Zellzahlmessung mittels HrimaPro SCC® und DCC® 41
4.4. Bland-Altman-Plot zur Darstellung der mittleren Differenzen 45
4.5. Histogramm zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messdifferenzen der Referenzmethode und der entsprechenden Vergleichsmethode 48
4.6. Intra-Class-Korrelationskoeffizient zur Beurteilung der statistischen Einigkeit zweier Testmethoden: 49
4.7. Boxplot zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung der CMT- Ergebnisse in Abhängigkeit der SCC-Ergebnisse der Referenzmethode. 50
4.8. Präzisionsmessung mittels der Vergleichsmethoden 53
4.9. Scatterplot zur Darstellung des Vergleichs der Zellzahlergebnisse von unverdünnten zu unverdünnten Schafmilchproben mittels DCC® und HrimaPro SCC® 54
5. Diskussion 56
6. Zusammenfassung 61
7. Schlussfolgerung 63
8. Summary 64

9. Danksagung 66
10. Literaturverzeichnis 68
11. Abbildungsverzeichnis 74
12. Tabellenverzeichnis: 76

1. Einleitung und Fragestellung

In Österreich wurden laut Grünem Bericht 2019 über 28.400 Milchschafe und 38.600 Milchziegen gehalten. Die Entwicklung der Tierzahlen und Milchleistungsdaten zeigt einen anhaltenden Aufwärtstrend, was die Produktion von Schaf- und Ziegenmilch betrifft. Besonders für Kleinbetriebe und Hofkäsereien stellt die Haltung von Milchschafen und -ziegen eine wirtschaftlich relevante Produktionsnische dar. Um die Qualität der Milchprodukte zu garantieren, ist es notwendig, Qualitätsstandards und Kennzahlen zu beachten. In der Milchkuhhaltung ist die somatische Zellzahl schon seit Jahrzehnten einer der bedeutendsten Kernparameter für die Bewertung der Eutergesundheit. Während bei Milchkühen die Eignung der Zellzahl zur Detektion und Diagnostik von Mastitiden eindeutig geklärt ist, existieren bisher keine offiziellen Zellzahlgrenzwerte für die Beurteilung der Milchgüte bei Schaf und Ziege auf Tier- und auf Bestandsebene, obwohl eine Vielzahl von Studien in den letzten Jahren einen deutlichen Zusammenhang zwischen Eutergesundheit und Zellzahl auch beim kleinen Wiederkäuer belegt. In der Milch eutergesunder Ziegen sind höhere Zellzahlen und größere Schwankungen als beim Rind physiologisch, was bei der Beurteilung der Eutergesundheit berücksichtigt werden muss. Bei Schafen werden am Beginn der Laktation ähnlich niedrige Zellzahlen wie beim Rind gemessen, im Verlauf der Laktation kann die Zellzahl auch in der Milchdrüse eutergesunder Tiere deutlich ansteigen.

In Ziegenmilch gilt es zusätzlich einige Besonderheiten mit Auswirkung auf die Zellzahlmessung zu beachten. Dabei stellt vor allem die apokrine Sekretionsweise der Drüsenzellen besondere Anforderungen an die Messverfahren.

Für die Messung der somatischen Zellzahlen im Rahmen der Milchleistungsprüfung und in großen Routinelabors gilt die fluoreszenz-optische Messung der Zellzahl mittels Durchfluss-zytometer als Referenzverfahren. Diese Methode basiert darauf, dass nach Färbung der Zell-DNA mit Fluoreszenzmarkern eine automatische Partikelzählung durchgeführt wird. Für kleinere Labors, Tierarztpraxen und landwirtschaftliche Betriebe sind diese Geräte aufgrund des hohen apparativen und finanziellen Aufwandes jedoch nicht geeignet. Seit einigen Jahren ist ein on-farm Gerät (DeLaval Cell Counter DCC®) für die Messung der Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilchproben erhältlich, das bereits im Rahmen einiger Studien (Berry und Broughan 2007; Gonzalo et al. 2006; Gonzalo et al. 2008; Persson und Olofsson 2011) evaluiert wurde.

Seit kurzem ist ein weiteres Messgerät (Hrima Pro SCC®) auf Basis der Zellkernfärbung und –zählung auf dem Markt. Es basiert ebenfalls auf Fluoreszenzfärbung mit anschließender Zellmikroskopie und digitaler Auswertung mithilfe einer Software. Dadurch soll eine ausschließliche Zählung von kernhaltigen Strukturen (Leukozyten, Epithelzellen etc.) ermöglicht werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden beide Zellmessgeräte auf ihre Eignung zur Messung der Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilch überprüft. Die fluoreszenzoptische Messung mittels Durchflusszytometrie wird für die Vergleichsmessung als Referenzmethode eingesetzt.

Folgende Hypothesen sollen geprüft werden:

A. Die beiden On-Farm Geräte DeLaval Cell Counter DCC® (DeLaval, Tumba, Schweden) und Hrima Pro SCC® (Biomedica, Wien, Österreich) sind geeignet, die Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilch ausreichend genau zu messen. Als Referenzverfahren für eine Vergleichsmessung wird ein fluoreszenzoptisches Verfahren auf Basis einer Durchflusszytometrie (Combifoss®, Foss, *Hillerød*, Dänemark) eingesetzt.
B. Die Zusammensetzung der Milch und etwaige Konservierungsverfahren haben dabei keinen Einfluss auf das Messergebnis.

2. Literaturübersicht

2.1. Die somatische Zellzahl in der Milch als Parameter für die Beurteilung der Eutergesundheit

2.1.1. Ökonomische Bedeutung von Mastitiden

Eutererkrankungen gehören zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Erkrankungen in der Milchproduktion bei Schafen und Ziegen. Stehen bei klinischen Eutererkrankungen ökonomische Einbußen durch Tierverluste im Vordergrund, sind subklinische Mastitiden vor allem aufgrund von Milchleistungsrückgang und eingeschränkter Milchqualität bedeutsam. Während klinische Mastitiden aufgrund der Milchveränderungen leicht erkennbar sind, ist für die Detektion subklinischer Mastitiden der Nachweis von Entzündungsparametern notwendig (Persson und Olofsson 2011).

2.1.2. Die Bedeutung der Zellzahl

Zur Beurteilung der Milchqualität und Eutergesundheit wird eine Vielzahl von Parametern herangezogen. Einer der Kernparameter zur Beurteilung von subklinischen Mastitiden auf Herdenbasis ist die somatische Zellzahl in der Tankmilch. Im Rahmen der Kuhmilcherzeugung gibt es definiert zulässige Schwellenwerte für den Maximalgehalt von Zellen in der Tankmilch, während im Bereich der Ziegen- und Schafmilchproduktion in Europa jegliche Grenzwerte fehlen und durchaus wünschenswert wären (Berry und Broughan 2007; Paape et al. 2007).

2.2. Parameter zur Beurteilung der Schafmilch

2.2.1. Zusammensetzung der Milchinhaltsstoffe in der Schafmilch

Die Anteile der Milchinhaltsstoffe verhalten sich oft sehr unterschiedlich und hängen von vielen verschiedenen Faktoren wie der Fütterung, der Rasse, des Laktationsstadiums ab. Tabelle 1 listet den Energiegehalt sowie die durchschnittlichen Konzentrationen der Inhaltsstoffe in der Schafmilch auf.

Tab. 1 Inhaltsstoffe in der Schafmilch (Souci et al. 2008)

Nährstoffe pro 100 g	Schafmilch
Energie in kJ	392
Energie in kcal	94
Eiweiß in g	5,2
Fett in g	6,0
Laktose in g	4,4
Vitamin A in µg	43
Vitamin B2 in µg	363
Vitamin B12 in µg	0,51
Vitamin D in µg	0,2
Folsäure in µg	6,0
Kalzium in mg	198
Magnesium in mg	20
Phosphor in mg	138
Zink in mg	0,48

2.2.2. Zelltypen in der Schafmilch

Die somatische Zellzahl und die Zusammensetzung der Zelltypen in der Milch von eutergesunden Milchschafen ähneln denen, die in der Milch von Kühen beobachtet werden. Bei beiden Tierarten sind Makrophagen die vorherrschende Zellgruppe (45-88 %) in der Milch. Neutrophile Granulozyten machen etwa 2-40 % der Milchzellpopulation aus, Lymphozyten etwa 6-20 %. Einen geringen Anteil bilden eosinophile Granulozyten und Epithelzellen. Im Kolostrum der Milchschafe und bei Entzündungen sind neutrophile Granulozyten jedoch der vorherrschende Zelltyp (41-84 %), gefolgt von Makrophagen (8-49 %) und Lymphozyten (6-11 %) (Souza et al. 2012).

2.2.3. Physiologische Zellzahl in der Schafmilch

Der physiologische Bereich für die somatische Zellzahl der Schafmilch liegt zwischen 10.000 bis 200.000 Zellen/ml (Paape et al. 2001).

Unter Berücksichtigung von tierindividuellen und methodischen Einflüssen liegt der empfohlene Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen gesunden und infizierten Euterhälften bei 250.000 bis 500.000 Zellen/ml. Einige Autoren haben sogar einen höheren Schwellenwert bis 1.500.000 Zellen/ml vorgeschlagen (Paape et al. 2001; Souza et al. 2012; Lafi 2006).

2.3. Parameter zur Beurteilung der Ziegenmilch

2.3.1. Zusammensetzung der Milchinhaltsstoffe in der Ziegenmilch

Die Ziegenmilch unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von der Schafmilch. Der Gehalt von Fett- und Eiweiß ist in der Ziegenmilch im Vergleich zum Schaf wesentlich geringer. Schafmilch ist zudem energiereicher. Ziegenmilch ist mineralstoffreich, Schafmilch hingen reicher an Vitaminen pro 100 g Milch (Souci et al. 2008). Tabelle 2 sind wiederum der durchschnittliche Energiegehalt und die Konzentration der Milchinhaltsstoffe gelistet.

Tab. 2 Inhaltsstoffe in der Ziegenmilch (Souci et al. 2008)

Nährstoffe pro 100 g	**Ziegenmilch**
Energie in kJ	281
Energie in kcal	67
Eiweiß in g	3,6
Fett in g	3,9
Laktose in g	4,2
Cholesterin in mg	11
Vitamin A in µg	68

Vitamin B2 in µg	150
Vitamin B12 in µg	0,07
Vitamin D in µg	0,25
Folsäure in µg	0,8
Kalzium in mg	127
Magnesium in mg	11
Phosphor in mg	109
Zink in mg	0,24

2.3.2. Zelltypen in der Ziegenmilch

Im Gegensatz zu der Zellverteilung in der Schaf- und Kuhmilch, dominieren in der Milch von eutergesunden wie auch von euterkranken Ziegen die neutrophilen Granulozyten. Sie haben im gesunden Ziegeneuter einen Anteil von 45-47 % und in infizierten Eutern von 71-86 % an der gesamten somatischen Zellzahl. Die Tatsache, dass neutrophile Granulozyten als Erstes in der immunologischen Abwehr reagieren, könnte die Erklärung dafür liefern, warum Ziegen resistenter gegenüber Mastitiden sind (Tian et al. 2005).

Weiters befindet sich in der Milch von eutergesunden Ziegen ein Makrophagenanteil von 15-41 % und bei Euterinfektion von 8-18 %. Lymphozyten erreichen einen Anteil von 9-20 % und bei infizierten Eutern liegt der Anteil der Lymphozyten bei 5-11 %. Der Anteil an eosinophilen Granulozyten und Epithelzellen ist sehr gering (Souza et al. 2012; Paape et al. 2001).

2.3.3. Physiologische Zellzahl in der Ziegenmilch

Die somatische Zellzahl in Ziegenmilch liegt physiologisch zwischen 270.000 bis 2.000.000 Zellen pro ml (Paape et al. 2001).

Die meistverwendeten Schwellenwerte zum Erkennen einer Eutererkrankung bei Ziegen liegen zwischen 500.000 und 1.000.000 Zellen pro ml Milch (Mc Dougall et al. 2001). Der Schwellenwert der somatischen Zellzahl für die Vorhersage der Anwesenheit von „minor

pathogens“ liegt anderen Untersuchungen zufolge bei 750.000 Zellen pro ml und bei 1.750.000 Zellen pro ml für das Vorhandensein von „major pathogens“ (de Crémoux 1996). Wieder andere Autoren verweisen auf eine Zellzahl von 345.000 Zellen pro ml zur Detektion von Mastitiden (Persson und Olofsson 2011).

2.3.4. Besonderheiten in der Ziegenmilch

2.3.4.1. Milchsekretion

Die Milchsekretion bei der Ziege findet im Gegensatz zum Rind und zum Schaf apokrin statt. Dadurch wird am Ende der Sekretionsphase der apikale Teil der Epithelzelle im Rahmen der Milchproduktion von deren Basis abgeschnürt und Zellpartikel werden in die milchführenden Gänge abgeschieden. Diese Zellpartikel werden als zytoplasmatische Partikel bezeichnet (Paape et al. 2001).

2.3.4.2. Zytoplasmatische Partikel

Zytoplasmatische Partikel sind anhand ihrer Größe von somatischen Zellen nicht zu unterscheiden. In der unveränderten Ziegenmilch befinden sich rund 150.000 zytoplasmatische Partikel pro ml (Berry und Broughan 2007). Dulin et al. (1983) geben für unveränderte Ziegenmilch als Richtwert für zytoplasmatische Partikel einen Rahmen von 71.000 bis 306.000 Partikel pro ml an und für Milch von infizierten Euterhälften von 98.000 bis 231.000 Partikel pro ml Milch an. Obwohl die zytoplasmatischen Partikel kernlos sind, beinhalten rund ein Prozent der Partikel Zellfragmente (Dulin et al. 1983).

Obwohl beim Schaf die apokrine Sekretion ebenfalls eine wichtige Komponente darstellt, ist die Konzentration von zytoplasmatischen Partikeln sehr gering und beträgt etwa ein Zehntel von der in Ziegenmilch gemessenen Konzentration (Jiménez-Granado et al. 2014). Die zytoplasmatische Partikel sind rund und zwischen 5 und 30 µm groß. Da der Großteil dieser Partikel keinen Zellkern besitzen, werden diese häufig im Rahmen der Messung der somatischen Zellzahl mitgemessen, wenn keine DNA-spezifischen Messmethoden verwendet werden (Paape et al. 2001).

2.4. Einflussfaktoren auf die Zellzahl

2.4.1. Infektiöse Ursachen

Als infektiöse Ursachen werden beim kleinen Wiederkäuer vorwiegend Bakterien, im geringeren Ausmaß auch Pilze und Viren nachgewiesen.

Definition Mastitis

Mastitis ist eine entzündliche Erkrankung der Milchdrüse, die dadurch entsteht, dass Bakterien in die Milchdrüse eindringen, sich dort vermehren und eine Abwehrreaktion auslösen (Winter 2008)

Pathophysiologie

Nach dem Passieren der euterpathogenen Keime durch den Strichkanal als anatomische Barriere und deren Vermehrung im Euter kommt es zur Auseinandersetzung mit der körpereigenen Immunabwehr. Diese wird durch angeborene Immunmechanismen (humoral und zellulär) initiiert und gesteuert. Die Immigration von neutrophilen Granulozyten aus dem Blutkreislauf in die betroffene Euterhälfte wird hauptsächlich durch pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon γ (IF-γ), Interleukin 1β (IL-1β) und durch Chemokine (wie IL-8) gesteuert und ist der wichtigste Mechanismus für die Erhöhung der Zellzahl in Milch (Mehne 2009).

Formen der Mastitis

Generell kann man klinische, subklinische und nach zeitlichem Verlauf akute und chronische Euterentzündungen unterscheiden.

- Klinische Mastitis

Die klinische Mastitis geht mit Veränderung des Allgemeinverhaltens des Tieres, Abweichungen bei der Untersuchung des Euters (Schwellung, Rötung, Schmerzhaftigkeit), Veränderungen des Milchsekrets und Veränderung der Milchmenge einher. Euterpathogene Keime können nachgewiesen werden (Winter 2008, Mehne 2009).

- Subklinische Mastitis

Die subklinische Mastitis ist charakterisiert durch fehlende klinische Symptome bei gleichzeitigem Nachweis von euterpathogenen Keimen und einer Erhöhung der somatischen Zellzahl in der Milch (Winter 2008, Bergonier et al. 2003).

- Chronische Mastitis

Chronische Mastitiden können klinisch wie auch subklinisch verlaufen und sind stets ein langfristiges Geschehen. Durch eine fehlende Ausheilung kann es zu bleibenden und klinisch feststellbaren Konsistenzänderungen im betroffenen Eutergewebe kommen. Schubweises Auftreten von klinischen Symptomen einer akuten Infektion sind möglich (Winter 2008).

- Akute Mastitis

Eine akute Euterentzündung ist durch ihr rasches Entstehen und ihre verhältnismäßig kurzanhaltende Erkrankungsdauer (< 3 Wochen) gekennzeichnet. Die Krankheitssymptome klingen in der Regel rasch wieder ab, bei fehlender Heilung geht die akute Form langfristig in eine chronische Form über (Winter 2008, Bergonier et al. 2003).

Euterinfektionen stellen eine der Hauptursachen für die Erhöhung der somatischen Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilch dar. Das Ausmaß der Zellzahlerhöhung ist abhängig von den beteiligten Pathogenen (Poutrel et al. 1996). Zahlreiche euterpathogene Keime können bei kleinen Wiederkäuern eine Mastitis verursachen, wobei KNS und *Staphylococcus (S.) aureus* die am häufigsten diagnostizierten Auslöser für insbesondere subklinische Euterentzündungen bei Schafen und Ziegen sind und zu hohen Zellzahlen führen können.

S. aureus kann bei Schafen und bei Ziegen aber auch für schwer verlaufende hämorrhagisch nekrotisierende Mastitiden verantwortlich sein. Andere Euterpathogene wie Streptokokken, *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Mannheimia haeomolytica*, Corynebakterien, Mykoplasmen und Pilze werden im Vergleich dazu weniger häufig nachgewiesen (Contreras et al. 2007).

Auch das CAE-Virus kann Mastitiden hervorrufen und zu einer Erhöhung der somatischen Zellzahl führen (Ryan et al. 1993).

2.4.2. Nichtinfektiöse Ursachen

2.4.2.1. Intrinsische Faktoren

Intrinsische Faktoren hängen direkt selbst vom Tier ab, dazu zählen:

Milchfraktion

Im Rahmen der Melkarbeit ergeben sich durch die verschiedenen Arbeitsschritte unterschiedliche Milchfraktionen. Es wurde nachgewiesen, dass die Vormelkfraktion eine vergleichbare bis etwas geringere Zellzahl aufweist als die übrigen Fraktionen (de Crémoux 1996).

Zwischenmelkzeit

Die somatische Zellzahl ist im Abendgemelk höher als in der am Morgen gewonnenen Milch. Dieses Phänomen beruht einerseits auf einem Verdünnungseffekt, da die Milchmenge im Morgengemelk um aufgrund der unterschiedlich langen Melkintervalle um 35-69 % höher ist, und (Aleandri et al. 1996), andererseits führt auch der höhere intramammäre Druck, bedingt durch die größeren Milchmengen am Morgen zur Verminderung des Transports von Leukozyten aus dem Blut in die Milch (Bergonier et al. 1996).

Laktationsstadium

Ziegen zeigen physiologisch einen Zellzahlanstieg und eine Abnahme der Milchmenge mit fortschreitender Laktation. Diese Tatsachen beruhen auf einem Verdünnungseffekt und dem negativen Zusammenhang zwischen Milchmenge und Zellzahl. Je höher die Milchmenge, desto niedriger der Zellgehalt. Somit kann man am Ende der Laktation aufgrund der hohen Zellzahl kaum zwischen eutergesunden und euterkranken Ziegen unterscheiden (Rota et al. 1993; Zeng et al. 1995).

Die Zellzahl in der Schafmilch ist am ersten Tag der Laktation am höchsten und sinkt im Verlauf der Laktation stetig ab. Der Zellzahlanstieg im Verlauf der Laktation konnte bei Schafen nicht nachgewiesen werden (Paape et al. 2007).

Anzahl der Laktationen

Der Einfluss der Laktationsanzahl auf die somatische Zellzahl ist abhängig vom Gesundheitszustand des Euters und in Folge auch von den entsprechenden euterpathogenen

Erregern, die an intramammären Infektionen beteiligt sind bzw. waren (de Crémoux 1996; Luengo et al. 2004).

Fruchtbarkeit und Fortpflanzung

Die meisten Studien zeigen, dass auch der Typ der Geburt einen Einfluss auf die somatische Zellzahl zeigt (Luengo et al. 2004; Jiménez-Granado et al. 2012). Mehrlingsgeburten führen zu einem höheren Milchzellzahlgehalt im Vergleich zu Einlingsgeburten. Dieses Phänomen kann auf den schlechteren Eutergesundheitsstatus von Mehrlingsgebärenden, die zwei Kitze/Lämmer säugen, zurückgeführt werden (Jiménez-Granado et al. 2012). Andere Studien belegen wiederum, dass das Fortpflanzungsgeschehen bei Schafen und Ziegen keinen Einfluss auf die somatische Zellzahl zeigt (Sànchez-Rodríguez et al. 2000; Gonzalo et al. 1994).

Rasse

Die Rasse weist bei Schafen und Ziegen ebenfalls einen Einfluss auf die Höhe der somatischen Zellzahl in der Milch auf. In Untersuchungen von Paape et al. (2007) konnten Rassenunterschiede bei Ziegen nachgewiesen werden. So zeigten Oberhasli-Ziegen die niedrigste SCC mit durchschnittlich 400.000 Zellen pro ml und Toggenburger Ziegen die höchste SCC mit durchschnittlich 650.000 Zellen pro ml. Bei den Schafen konnte ebenfalls der Einfluss der Rasse auf die SCC bei dem Awassi Schaf, beim Assaf Hausschaf, beim Churra Hausschaf und beim Castellana- Schaf nachgewiesen werden (Leitner et al. 2001; Gonzalo et al. 2005). Boscos et al. (1996) hingegen konnte keinen Zusammenhang zwischen Rasse und somatischer Zellzahl im Rahmen seiner Studien nachweisen.

Milchmenge und Milchinhaltsstoffe

Die Milchproduktion ist abhängig von der Parität. Primipare Tiere zeigen im Gegensatz zu multiparen Tieren eine geringere Milchleistung. Studien zeigen, dass sich bei Ziegen mit geringerer Milchleistung eine höhere somatische Zellzahl ergibt (Jiménez-Granado et al. 2012). Weiters scheinen die Milchinhaltsstoffe Fett, Eiweiß und Laktose wenig Einfluss auf die somatische Zellzahl zu haben (Chen et al. 2010).

Brunst

Die Brunst, unabhängig davon ob natürlichen oder induzierten Ursprungs, und auch unabhängig von Alter und Anzahl der Graviditäten, führt zu einem deutlichen vorübergehenden

Anstieg der somatischen Zellzahl in der Milch von Ziegen (Aleandri et al. 1996; McDougall et al. 2002a). Studien haben auch gezeigt, dass brünstige Ziegen mit einer Eutererkrankung eine höhere Zellzahl zeigen als brünstige eutergesunde Ziegen (Bergonier et al. 2003).

2.4.2.2. Extrinsische Faktoren

Extrinsische Faktoren hängen nicht direkt selbst vom Tier ab, sondern beeinflussen die Zellzahlentwicklungen von außen. Dazu zählen:

Melkroutine

Der Einfluss der Melkroutine auf die Zellzahl wurde vielfach erforscht und zeigt widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits wurde bemerkt, dass die Zellzahl beim maschinellen Melken niedriger ist, andererseits beim Melken von Hand (Randy et al. 1991; Kosev et al. 1996). Andere Autoren verweisen wiederum darauf, dass die Art des Melkens keinen Einfluss auf die SCC in der Ziegenmilch zeigt (Zeng et al. 1995).

Fütterung

Eine unausgeglichene Ration kann Ursache für eine Erhöhung der Tankmilchzellzahl sein (Sánchez et al. 2007). Generell gilt, wenn die Ration zu einer Stoffwechselstörung (Azidose, Alkalose) führt, folgt eine Erhöhung der somatischen Zellzahl. Es wird angenommen, dass es durch diese Störungen zu einer Reduktion der Milchmenge mit gleichzeitig höherer Zellzahl kommt (Fedele et al. 1996).

Stress

In Folge von Stresssituationen durch Tierhaltung und -management kann es bei Einzeltieren und auf Herdenebene zu spontanen Erhöhungen der Zellzahl in der Milch kommen. Dazu zählen die Paarungszeit und Maßnahmen wie Blutabnahme oder Impfungen (Aleandri et al. 1996). Bei der Thematik des Parasitenbefalls geht man davon aus, dass es zur Reduktion der Milchmenge kommt und infolgedessen die Zellzahl steigt (Pérez-Baena et al. 2012). Kurze Tiertransporte (< 45 Minuten) scheinen keinen Einfluss auf die Zellzahl zu haben (McDougall et al. 2002b; Paape et al. 2001).

Saisonalität

Die Tageslichtlänge beeinflusst das Fortpflanzungeschehen und somit auch die Milchmenge und infolgedessen auch die somatische Zellzahl. Im Frühjahr kommt es zur Steigerung der Milchmenge und somit zu einem Verdünnungseffekt der Zellen in der Milch. Im Herbst verhält sich dieses Verhältnis gegensätzlich. Kommt es im Sommer zur Reduktion der Milchmenge durch Hitze, führt dies ebenfalls zu einem Anstieg der Zellzahl in der Milch (García-Hernández et al. 2007; Paape et al. 2001).

Betriebsführung und Arbeitsweise

Gutes Management, Betriebshygiene und Stalleinrichtung sind entscheidend für die Haltung eutergesunder Tiere und für die Gewinnung von Milch mit signifikant weniger Bakterien und niedriger somatischer Zellzahl (Morand-Fehr et a. 2007).

Aufzuchtsystem

Das Aufzuchtsystem zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Milchinhaltstoffe Fett und Eiweiß. Ein Einfluss auf die somatische Zellzahl konnte nicht nachgewiesen werden (Delgado-Pertíñez et al. 2009).

2.4.3. Methodische Faktoren

2.4.3.1 Zählverfahren

Die Ziegenmilch hat die Besonderheit, dass sie zytoplasmatische Partikel beinhaltet. Diese Besonderheit erfordert den Einsatz von DNA-spezifischen Zählmethoden, um die Zellzahl korrekt wiederzugeben (Dulin et al. 1983). Als Goldstandard gilt der Einsatz der direkten Mikroskopie (ISO/IDF, 2008) (Berry und Broughan 2007). Methoden, die mit der Anwendung der Durchflusszytometrie arbeiten, sind im Bereich der Kuhmilcherzeugung weit verbreitet, wobei es nur wenige Forschungsarbeiten zur Messung der SCC beim kleinen Wiederkäuer gibt (Boulaaba et al. 2011). Diese elektronische Fluoreszenz-optische Methode ist DNA-spezifisch und beruht auf der Anfärbung der Zellkerne und deren darauffolgende Zählung. Petersson et al. (2011) verwendeten das Verfahren auch zur Validierung der Färbemethoden für die direkte mikroskopische Zellzählung mit verschiedenen Zellfarbstoffen in Schafmilch. In den letzten Jahren wurden dazu auch tragbare Geräte (DeLaval Cell Counter®, Porta SCC®,

C-system Reader®) entwickelt. Die Leistung des DeLaval Cell Counter® wurde auch schon im Schaf- wie auch Ziegenbereich getestet (Berry und Broughan 2007; Gonzalo et al. 2003). In großen Routinelabors wird die Zellzahl durch Fluoreszenz-optische Methoden bzw. durch die Durchflusszytometrie bestimmt (Bintsis et al. 2008).

2.4.3.2 Konservierung und Aufbewahrung der Proben

Viele Autoren (Petersson et al. 2011; Berry und Broughan 2007; Gonzalo et al. 2006; Hillerton et al. 2004; Souza et al. 2012) weisen auf die Notwendigkeit der Standardisierung von Aufbewahrung und Arbeitsmethoden hin, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Faktoren, die die Genauigkeit der Ergebnisse beeinflussen sind:

- **Konservierung der Milchprobe (Aufbewahrungstemperatur, Aufbewahrungszeit)**

  In Bezug auf die Temperatur sollte darauf geachtet werden, dass die Aufbewahrung bei Raumtemperatur vermieden werden sollte, um die Zerstörung der Zellintegrität, welche zur Abnahme der somatischen Zellzahl führt, zu vermeiden (Gonzalo et al. 2003).

  Untersuchungen belegen, dass das Messen von Proben, die ohne Konservierungsmittel im Kühlschrank bei vier Grad Celsius aufbewahrt werden, innerhalb von zehn Tagen bei Ziegen zu stabilen Zellzahlergebnissen führt. Gonzalo et al. (1998) verweist wiederrum darauf, dass Milchproben ohne Konservierungsmittel im Vergleich zur Referenzmethode zu nicht zufriedenstellenden Ergebnissen führen.

- **Typ des Konservierungsmittels**

  Studien zeigen, dass Bronopol (2-Bromo-2-nitro1,3-propandiol, $C_3H_6BrO_4$) für die Messung der somatischen Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilchproben das Konservierungsmittel der Wahl ist und zu zuverlässigen Messergebnissen führt. Bronopol wird aufgrund seiner bakteriziden Wirkung zur Stabilisierung von Milchproben eingesetzt, gleichzeitig bewirkt es jedoch ein stärkeres Eindringen des fluoreszierenden Farbstoffs in die Zelle und hat somit zur Folge, dass stärkere Signale bei fluoreszierend-optischen Geräten erzeugt werden, wodurch die Messergebnisse verbessert werden (Raynal-Ljutovac et al. 2007).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Schaf- und Ziegenmilchproben die besten Ergebnisse bezüglich Messpräzision und Wiederholbarkeit erzielt wurden, wenn die Milchproben mit Bronopol konserviert, bis zur Messung bei Kühlschranktemperatur gelagert und vor der Messung auf 40 °C erwärmt wurden. Die Messung sollte zusätzlich innerhalb von 5 Tagen nach Probennahme erfolgen. Nicht konservierte Proben, welche bei Kühlschranktemperatur gelagert, und innerhalb von 24-48 Stunden nach Probenahme gemessen werden, liefern ein ähnliches gutes Ergebnis (Gonzalo et al. 2003).

2.5. Methoden zur Messung der somatischen Zellzahl

2.5.1. Indirekte Schätzung der somatischen Zellzahl

2.5.1.1. California Mastitis Test

Der California Mastitis Test wird weit verbreitet zur indirekten Messung der somatischen Zellzahl verwendet. Aufgrund der kostengünstigen, einfachen und schnellen Anwendung, die dazu führt, dass die Messung von Landwirten im Stall durchgeführt werden kann, wird diese Methode besonders gern praktiziert. Das Verfahren kommt aus dem Rinderbereich und findet schon seit geraumer Zeit Anwendung im Bereich der kleinen Wiederkäuer (Lafi 2006; Winter und Baumgartner 1999; Perrin et al. 1996). Der California Mastitis Test verwendet eine Flüssigkeit, in der sich Alkylarylsulfonat befindet. Dieses Reagenz setzt die Desoxyribonukleinsäure der Zellen frei und führt dadurch zu einer Konsistenzänderung in der Milch, die in ihrer Stärke mit der Zellzahl positiv korreliert (Baumgartner und Wittek 2018).

2.5.2. Direkte Zählung der SCC mittels Direktausstrich/Direkter Mikrokopie

Diese Methode gilt als Referenzmethode zur Beurteilung der somatischen Zellzahl in Ziegenmilch. Sie ist zeitaufwändig und setzt Laborbedingungen voraus (Berry und Broughan 2007; Gonzalo et al. 2003).

Nach der Probenvorbereitung (erhitzen auf 40 Grad Celsius und abkühlen auf Raumtemperatur) werden zehn Mikroliter auf einen Objektträger pipettiert. Danach wird die

Probe mit Methylenblau, May-Grünwald, Giemsa oder Pyronin-Y-Methyl-Grün (PMG) gefärbt und anschließend fixiert (Gonzalo et al. 2003).

Der Nachteil der Methylenblau-Färbung ist, dass die Zellzahl häufig überschätzt wird, da oft zytoplasmatische Partikel mitangefärbt werden. Deshalb wird eine DNA-spezifische Färbemethode mit Giemsa oder PMG empfohlen (Paape et al. 2001).

Petersson et al. (2011) fanden bei Vergleichsmessung von Schafmilch mit dem fluoreszenzoptischen Verfahren ebenfalls eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden wenn PMG für die Zellfärbung eingesetzt wurde und bestätigten die Überschätzung der Zellzahl bei Zellfärbung mit Methylenblau.

2.5.3. Direkte Messung der SCC mittels Zellzahlmessgeräten in der Schaf- und Ziegenmilch

2.5.3.1. DeLaval Cell Counter®

Es handelt sich beim DCC® um ein tragbares und handliches Zellzahlmessgerät, das aufgrund der einfachen Anwendung und Schnelligkeit als on-Farm Gerät von Landwirten und Tierärzten verwendet werden kann (Abb.1). Die Messmethode des DCC® basiert auf einer fluoreszenzoptischen Arbeitsweise.

Abb. 1 DeLaval Cell Counter® mit eingelegter Messkassette (Pfeil)

Pro Probe wird eine Messkassette verwendet, die ein festgelegtes Milchvolumen (ca. 60 Mikroliter) aufnimmt und auf einer DNA-spezifischen Technik basiert. Die Färbung der Zellkerne mittels Propidiumiodid führt dazu, dass diese fluoreszieren und als digitales Bild erkannt werden können. Anhand dieses Bildes wird die Zellzahl rechnerisch ermittelt. Nach Einlegen der Kassette wird ein Milchvolumen von circa einem Mikroliter in die Messzelle eingesogen, nach 45 Sekunden kann das Messergebnis vom Display abgelesen werden.

Der DCC® wurde für die Erfassung der somatischen Zellzahl in der Rindermilch entwickelt, im Bereich der Zellzahlmessung mit dem DCC® bei kleinen Wiederkäuern hingegen gibt es erst wenige Forschungsarbeiten. Gonzalo et al. (2006) haben erstmals Schafmilchproben verdünnt wie auch unverdünnt mit der Direktmikroskopie und dem fluoreszenzoptischen Verfahren Fossomatic® verglichen. Die Autoren empfehlen das DCC®-Gerät zur Messung der SCC in Schafmilch, da es zufriedenstellende Messergebnisse liefert. Der Korrelationskoeffizient liegt bei > 0,99 für unverdünnte, wie auch verdünnte Schafmilchproben. Als vorteilhaft erweist sich die geringe Probenmenge, die schnelle Arbeitsweise, die geringeren Kosten wie auch die Möglichkeit mit dem DCC® direkt am landwirtschaftlichen Betrieb zu messen. Berry und Broughan (2007) haben sich mit der Messung der SCC mittels dem DCC® im Ziegenmilchbereich beschäftigt. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die mit DCC® gemessenen SCC in unverdünnter Milch mit der direkten Mikroskopie korrelieren. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,95. Berry und Broughan (2007) berufen sich auch auf die zahlreichen Vorteile für die Verwendung des DCC® zur Messung der Zellzahl bei Ziegen.

2.5.3.2. Fossomatic/Combifoss®

Die Arbeitsweise der Fossomatic®-Geräte beruht grundsätzlich auf der Technik der Durchflusszytometrie mit DNA-Spezifität (Abb. 2). Combifoss®-Geräte verbinden die Messung der Milchinhaltsstoffe mittels Infrarotspektrometrie mit der Zellzahlmessung auf fluoreszenz-optischer Basis in einem Analyseschritt. Das Analyseverfahren zählt Zellen auf der Grundlage der Erkennung der Zell-DNA. Ein Gemisch aus Milch und Färbelösung (Ethidiumbromidfarbstoff) wird von einer Hüllflüssigkeit umgeben und durch eine Durchflusszelle geleitet. In der Durchflusszelle werden die gefärbten Zellen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt.

Der Ethidiumbromidfarbstoff durchdringt die Zellwand und produziert einen fluoreszierenden Komplex mit der DNA. Jede gefärbte Zelle produziert einen elektrischen Impuls, welcher anschließend aufgezeichnet wird. Die Zellen senden Fluoreszenzlichtimpulse mit einer

anderen Wellenlänge aus, die Impulse werden gezählt und angezeigt. Das Design der Durchflusszelle stellt sicher, dass jeweils nur eine somatische Zelle erfasst wird (Martínez et al. 1996) .

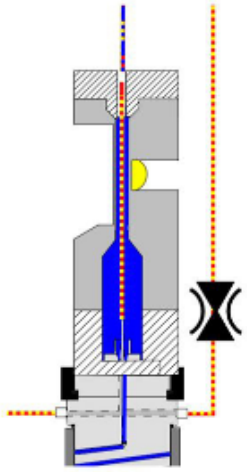

Abb. 2 Funktionsmechanismus der Combifoss®- Zellzahlmessgeräts: Das Milch-Ethidiumbromidfarbstoffgemisch passiert die Durchflusszelle. Dort sind die gefärbten Zellen einer spezifischen Wellenlänge ausgesetzt. Die Zellen emittieren fluoreszierende Lichtimpulse in einer anderen Wellenlänge, welche gezählt und technisch erfasst werden. Bildquelle: Fossomatic TMFC. 2006. Somatic cell counting for rawmilk testing. [Broschüre]

Im Allgemeinen ist die Standardisierung der Combifoss®-Zellzahlmessung für Schafmilch bei Milchqualitätskontrollen unerlässlich, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Gonzalo et al. (2003) haben sich mit der Messung der SCC mittels Combifoss® bei Schafen auseinandergesetzt und nachgewiesen, dass diese Methode unter Verwendung von konservierten und folgend gekühlten Proben einwandfreie Ergebnisse liefert.

Der Vorteil ist, dass mit diesem Gerät große Probenanzahlen schnell gemessen werden können und dass die gleichzeitige Messung von Zellzahl und Milchinhaltsstoffen in einem Durchgang erfolgen kann. Es wird daher für Reihenuntersuchungen und Routinemessungen verwendet. In Abbildung 3 ist das Combifoss®-Gerät dargestellt.

Abb. 3: Combifoss®-Zellzahlmessgerät zur Untersuchung größerer Probenzahlen Bildquelle: Fossomatic TMFC. 2006. Somatic cell counting for rawmilk testing. [Broschüre]

2.5.3.3. HrimaPro SCC®

Das tragbare Gerät HrimaPro SCC®, welches ebenfalls auf einer direkt fluoreszierenden somatischen Zellzählung mit geringer Vergrößerung basiert, wurde von der Firma Milkotronic Ltd. entwickelt und wird von der Firma Biomedica vertrieben. HrimaPro SCC® verwendet den Fluoreszenzfarbstoff „SOFIA GREEN“, sowie die LED-Optik CMOS Technologie zur Erfassung der Zellbilder. Die Analyse der Zellen sollte dadurch genauer, zuverlässiger und schneller werden (Milkotronic Ltd, 2017).

Abb. 4 HrimaPro SCC®- Gerät

Um die somatische Zellen mit HrimaPro SCC® zu zählen, wird die Milchprobe mit dem Färbereagenz, das den Fluoreszenzfarbstoff Sofia Green enthält, gemischt. Nur 8 µL aus der gefärbten Probe werden auf die Messkammer des Einweg-LACTOCHIPs pipettiert. Der Chip wird in das Gerät geladen und in einer Zeitspanne zwischen wenigen Sekunden und 2 Minuten, je nach Messmodus, wird die Analyse durchgeführt.

Das HrimaPro SCC®-System fokussiert automatisch auf den Chip und die gefärbten Zellen werden von der empfindlichen Kamera erfasst. Der Analysealgorithmus der digitalen Bilder bestimmt die Anzahl und Dimension der fluoreszierenden Zellen und zählt ihre Konzentration. Die Ergebnisse werden automatisch auf dem Display angezeigt und können aufbereitet, ausdruckt bzw. gespeichert werden.

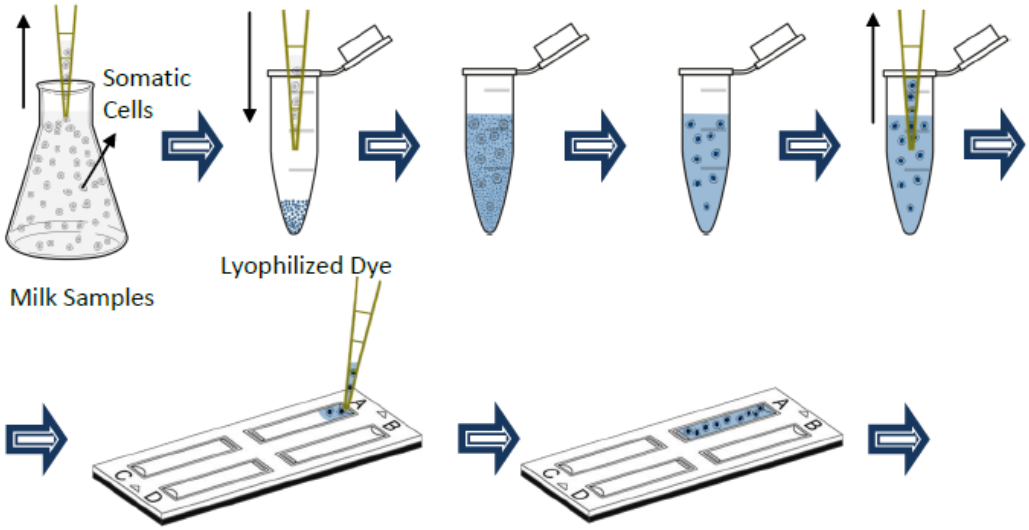

Abb. 5 Aufbereitung der Milchproben für die Zellzahlmessung mit dem HrimaPro SCC®-Gerät. Bildquelle: Milkotronic Ltd. 2017. Lactoscan SCC Operation Manuel. [Broschüre]

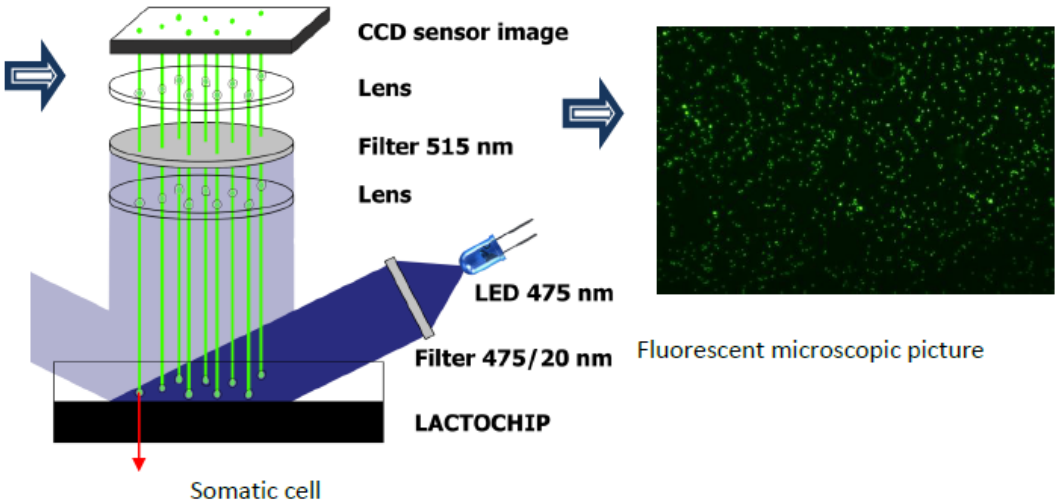

Abb. 6 Funktionsweise der HrimaPro SCC®-Geräts. Bildquelle: Milkotronic Ltd. 2017. Lactoscan SCC Operation Manuel. [Broschüre]

Das Wesen der Methode beruht auf der Tatsache, dass nach der Zerstörung der zytoplasmatischen Membran der somatischen Zellen in der Milch, unter dem Einfluss eines getrockneten lysogenen Pufferreagenzes, die Zellkerne der Wirkung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes SOFIA GREEN, der die Kern-DNA färbt, zugänglich werden. Die Lichtsignale der farbigen Zellen werden vom Detektor der Kamera mit CMOS-Sensor erfasst, und dadurch werden Bilder erzeugt. Durch die automatische Bewegung des Mechanismus auf den Achsen X und Y nimmt das Gerät maximal 70 Bilder auf. Die Bilder werden mit Hilfe der eingebetteten Software analysiert und auf diese Weise die Menge der somatischen Zellen bestimmt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten sowohl das DCC® Zellzahlgerät als auch das Gerät HrimaPro® in einer Äquivalenzstudie mit dem Referenz-Verfahren Fossomatic (Combifoss®) verglichen werden, und zwar hinsichtlich der Messung der Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilch.

3. Material und Methoden

3.1. Fallzahlschätzung und Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde als Äquivalenzstudie geplant. Sie wurde durchgeführt, um nachzuweisen, dass die beiden für kleinere Labors, landwirtschaftliche Betriebe bzw. tierärztliche Praxen vorgesehenen Zellzahlmessgeräte DCC® und HrimaPro SCC® dem Referenzverfahren Combifoss®, welches aufgrund des hohen apparativen und finanziellen Aufwandes nur großen Routinelabors verfügbar ist, äquivalent (d.h. annähernd gleichwertig) sind. Für die Fallzahlplanung wurden zunächst Zufallszahlen im Schwankungsbereich der Zellzahl (200.000 bis 1.000.000 Zellen pro ml) generiert. Für die Berechnung wurden Zufallsschwankungen zwischen 5 und 30 % angenommen sowie ein Äquivalenzbereich (Toleranzbereich) von 10 %. Auf Basis dieser Simulation sollten je 200 Schaf- und 200 Ziegenmilchproben untersucht werden.

3.2. Milchprobenentnahme

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde mit dem niederösterreichischen Landeskontrollverband sowie drei Milchschaf- und einem Milchziegenbetrieb zusammengearbeitet. Die Referenzmessung wurde im Qualitätslabor Niederösterreich in Gmünd zeitgleich mit den Messungen für die Milchleistungsprüfung (MLP) durchgeführt. Um die gleiche Ausgangslage für die Vergleichsmessung zu schaffen, erfolgte die Milchprobennahme zeitgleich mit der Milchleistungskontrolle durch die Kontrollorgane des LKV Niederösterreich. Nach der Melkung wurde die Kontrollmilch aus dem Abscheidegefäß der Melkmaschine in einen Melkbecher geschüttet und geschwenkt. 30 ml wurden für die LKV-Messung in die Probengefäße der LKV gegeben und der Rest der Probe (3-15 ml) wurde für die Messung an der Veterinärmedizinischen Universität mitgenommen.

Die Konservierung der Proben erfolgte mittels Bronopol-Lösung. Die LKV- Proben wurden alle konserviert. Die Proben für die Messung an der Veterinärmedizinischen Universität wurden zum Teil konserviert und zum Teil nativ mitgenommen. In Tabelle 3 sind Tierart (Schaf, Ziege)

Anzahl der untersuchten Proben pro Betrieb sowie die Verteilung hinsichtlich Konservierung aufgelistet.

Tab. 3: Gesamtanzahl und Konservierung der untersuchten Proben

	Gesamtanzahl	**Konserviert**	**Unkonserviert**
Schafe			
Betrieb A	79	0	79
Betrieb B	51	0	51
Betrieb C	70	70	0
Betrieb C.2*	32	32	0
Summe	232	102	130
Ziegen			
Betrieb A	170	170	0
Betrieb A.2*	100	0	100
Summe	270	170	100

* Beprobung im Zuge eines 2. Betriebsbesuches bei der nächstfolgenden MLP

3.3. Untersuchungen im Labor

3.3.1. Probenvorbereitung

Die gekühlten Proben wurden im Wasserbad auf 40 °C erwärmt. Danach wurden sie auf Zimmertemperatur abgekühlt und vor den Messungen drei- bis viermal mit dem Vortexmixer gemischt.

3.3.2. California-Mastitis-Test (CMT)

Der CMT dient der indirekten Bestimmung der somatischen Zellzahl in der Milch. Für den CMT wurde die gut vermischte Milchprobe in die Testschale gegeben und anschließend bis auf eine Menge von ca. 2 ml dekantiert. Anschließend wurde die gleiche Menge Schalmreagenz (Alkyl-Aryl-Sulfonat) hinzugefügt. Die Interpretation und damit die quantitative Beurteilung erfolgten nach den Vorgaben der klinischen Propädeutik (Baumgartner und Wittek, 2018). Die

semiquantitative Zellzahlbestimmung erfolgte aufgrund der Veränderung der Konsistenz des Milch-Schalmreagenzgemisches und wurde nach den in Tabelle 4 angeführten Kriterien beurteilt. In Abbildung 7 sind verschiedene Formen der Schlierenbildung und Konsistenzänderungen des Milch-Schalmreagenzgemisches und die daraus abbleitbaren Zellzahlschätzwerte dargestellt.

Tab. 4: Beurteilungskriterien zur Schätzung der Milchzellzahl mittels CMT nach Baumgartner und Wittek 2018

Ergebnis des CMT	**Konsistenz**	**SCC pro ml Milch**
Negativ (-)	Flüssig	0-150.000
Geringgradig (ggr.) erhöhte Zellzahl (+)	Schlierenbildung	200.000-700.000
Mittelgradig (mgr.) erhöhte Zellzahl (++)	Schlieren- und Gelbildung	500.000-1.500.000
Hochgradig (hgr.) erhöhte Zellzahl (+++)	Gel- und Propfbildung	>1.000.000

Abb. 7: Beurteilung des CMT: Viertel links unten (B):
Mittelgradig erhöhte Zellzahl (++), restliche Viertel: negativ

3.3.3. Zellzahlbestimmung mit dem DeLaval Cell Counter® (DCC)

Der DeLaval Cell Counter® dient der direkten Bestimmung der Zellzahl. Die Milchprobe wurde im Anschluss an den CMT nochmals mit dem Vortexmixer gemischt. Die Kassette (Abb. 8) saugt das benötigte Milchvolumen, welches 60 Mikroliter beträgt automatisch durch ein mechanisches erzeugtes Vakuum ein.

Danach wurde die Einmalkassette in das Gerät eingesetzt (Abb. 9) und die Messung gestartet. Nach der Messung wurde das Zellzahlergebnis vom Display abgelesen und in das Laborprotokoll übertragen.

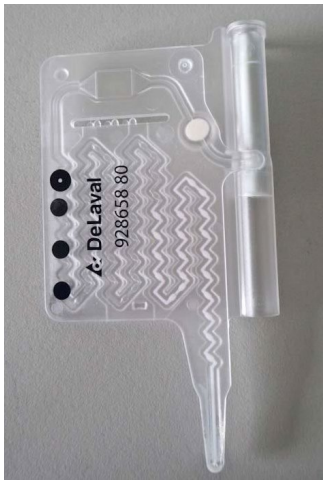

Abb. 8: Messkassette für den DeLaval Cell Counter®

Abb. 9: Einsetzen der Messkassette in den DCC®

3.3.4. Zellzahlbestimmung mit dem HrimaPro SCC®-Gerät

Das HrimaPro SCC® Gerät dient ebenfalls der direkten Bestimmung der Zellzahl. Nach der Beurteilung des CMT wurden aus der gut gemischten Probe 100 Mikroliter entnommen und in eine bereits mit dem Farbstoff SOFIA GREEN beimpften Eprouvette für die Zellzahlmessung pipettiert. Im Anschluss wurde das Röhrchen mit dem Farbstoff 8-9 Mal gemixt und danach drei Minuten inkubiert (minimal eine Minute, maximal 20 Minuten). In der Zwischenzeit wurde die Zellzahl mit dem DCC® gemessen. Danach wurde das Röhrchen für die HrimaPro SCC®-Messung nochmals 2-3 Mal gemixt und danach 8 Mikroliter auf den LACTOCHIPx4R pipettiert (Abb. 11) und in das Gerät eingesetzt. Die Messung erfolgt für vier Milchproben gleichzeitig (Abb. 12). Die Messergebnisse wurden anschließend vom Display abgelesen und in das Laborprotokoll eingetragen.

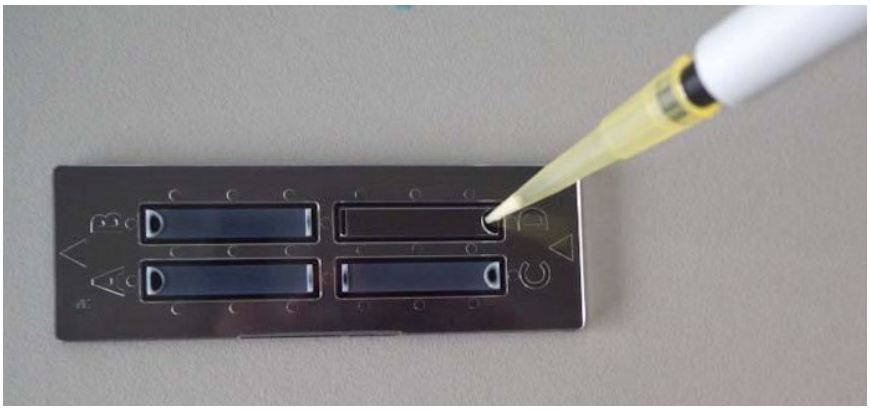

Abb. 10: HrimaPro SCC®-LACTOCHIP mit den entsprechenden vier Messfeldern: A-C bereits befüllt, D: vorbereite Milchprobe wird in das Messfeld pipettiert.

Abb. 11: Benutzeroberfläche bei gleichzeitiger Bearbeitung und Messung der vier Milchproben durch das HrimaPro SCC®-Gerät. Bildquelle: Milkotronic Ltd. 2017. Lactoscan SCC Operation Manuel. [Broschüre]

3.3.5. Zellzahlbestimmung mit dem Combifoss®-Gerät

Die Messung mit dem Combifoss®-Gerät wurde im Rahmen der LKV-Messung im LKV-Labor durchgeführt. Die Ergebnisse der Zellzahlmessung, wie auch der Fett-, Eiweiß- und Laktosegehalt, das Geburtsdatum und die Milchmenge wurden im Anschluss an die Messung übermittelt und ebenfalls in das Laborprotokoll übertragen. Auch für diese Messung werden die Milchproben auf 40 °C erwärmt und automatisch durchmischt.

3.3.6. Messung der Präzision und des Einflusses des Tiefgefrierens

Um den Einfluss des Tiefgefrierens als etwaiges Konservierungsverfahren zu testen wurden bereits gemessene Milchproben tiefgekühlt. Die eingefrorenen Proben wurden im Wasserbad mit einer Temperatur von 40 °C für zehn Minuten aufgetaut. Gemessen wurden jeweils drei Schaf- und drei Ziegenmilchproben mit drei verschieden Zellzahlniveaus. Jede Probe wurden fünf Mal hintereinander mit dem DCC® und dem HrimaPro®- Gerät gemessen und die Ergebnisse wiederum im Laborprotokoll vermerkt.

3.3.7. Messvergleich von verdünnten zu unverdünnten Schafmilchproben

15 bereits gemessene Schafmilchproben wurden aufgetaut, nochmals mit dem DCC® und dem HrimaPro SCC® gemessen, dann 1:1 mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung verdünnt und nochmals gemessen und folgend im Laborprotokoll vermerkt.

3.4. Statistische Auswertung der Testergebnisse

Die oben genannten Daten wurden mit Microsoft EXCEL 2010 in tabellarischer Form gesammelt und folgend mittels SPSS (IBM, SPSS Statistics 26) statistisch ausgewertet. Die errechneten Ergebnisse wurden ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

Die Daten wurden zunächst mittels Kolmogorov Smirnov Test auf Normalverteilung geprüft und in einem 2. Schritt grafisch dargestellt. Die grafische Darstellung der Ergebnisse des Methodenvergleiches erfolgte mittels Punkt-Streu-Diagramm, Boxplots und Blant Altman Diagrammen. Die Berechnung der Übereinstimmung der Methoden erfolgte über den Intra-Class Korrelationskoeffizienten.

3.4.1. Scatterplot

Zwei auf metrischem Niveau gemessene Merkmale können in einem sogenannten Scatterplot (Streudiagramm) gepaart als Punkte dargestellt werden. Anhand der graphischen Verteilung dieser Punkte kann man darauf schließen in welchem Ausmaß die beiden Merkmale miteinander zusammenhängen.

3.4.2. Boxplot

Statistische Kennzahlen wie der Median, die Quartile, die Spannweite und der Interquartilsabstand können mit Hilfe eines Boxplots graphisch dargestellt werden. Im Boxplot können wichtige Informationen über die Verteilung der Daten und deren Abweichung vom zentralen Lagemaß, des Medians erkannt werden. Abgesehen davon dienen Boxplots sehr gut zum Vergleich der Streuung mehrerer Merkmale und/oder zwischen verschiedenen Kategorien eines Merkmals.

3.4.3. Bland-Altman- Plot

Der Bland-Altman-Plot ist ein statistisches Verfahren und ermöglicht den Vergleich zweier Messmethoden, in diesem Fall den Vergleich von zweier Alternativmethoden mit der Referenzmethode. Dieses Diagramm wird in einem kartesischen Koordinatensystem

dargestellt. Auf der X-Achse werden die Werte der Referenzmethode und auf der Y-Achse die jeweilige Differenz der beiden Verfahren aufgetragen. Im Gegensatz zum Korrelationskoeffizient nach Pearson können die Verzerrung und Streuung der Daten besser berücksichtigt werden. Die Beurteilung von systematischen Abweichungen, Ausreißern sowie Abhängigkeiten der Varianz von der Größe der Messwerte kann mithilfe dieses Verfahrens leichter erfolgen. Weiters kann beobachtet werden, ob systematische Messfehler auftreten (z.B. die eine Methode misst prinzipiell niedrigere oder höhere Werte als die Vergleichsmethode)

3.4.4. Kolmogorov-Smirnov-Test

Mit diesem Test ist es möglich zu überprüfen, ob die erhaltenen Stichprobenergebnisse mit vermuteten theoretischen Häufigkeiten übereinstimmen. Der Hintergrund dieser Berechnung ist, dass die tatsächliche Verteilung von einer hypothetischen Normalverteilung an einem beliebigen Punkt eine bestimmte flächenmäßige Abweichung nicht überschreiten darf, andernfalls ist es notwendig die Annahme einer Normalverteilung zu verwerfen. Folgend wird in einer Reihe von Berechnungsschritten die jeweilige konkrete Abweichung berechnet.

3.4.5. Intra-Class-Korrelationskoeffizient

Die Intraklassen-Korrelation ist ein Zusammenhangsmaß mithilfe dessen es möglich ist, die Übereinstimmung einer Merkmalsausprägung durch mehr als zwei Rater/Beurteiler an den gleichen Fällen für intervallskalierte Messungen zu beurteilen. Infolgedessen schätzt das zugehörige Maß, der Intra-Class-Korrelationskoeffizient (ICC), die Zuverlässigkeit (Reliabilität) eines beliebigen Beurteilers (Geräts) ein. Der Vorteil gegenüber der Korrelation nach Pearson ist, dass der ICC für mehr als zwei Beurteiler (Geräte) ausgerechnet werden kann. Ähnlich den anderen Korrelationskoeffizienten liegt der berechnete Wert zwischen 0 und 1. Der Wert 0 steht für gar keine Übereinstimmung, der Wert 1 für vollkommene Übereinstimmung. Koo et al. (2016) geben an, dass auf Basis 95 % Konfidenzintervalls, Werte, die niedriger als 0,5, eine geringe Zuverlässigkeit, Werte zwischen 0,5 und 0,75 eine moderate, Werte zwischen 0,75 und 0,9 eine gute und Werte > 0,9 eine exzellente Übereinstimmung angeben.

4. Ergebnisse

4.1. Datengrundlage

Tatsächlich wurden insgesamt 232 Schafmilchproben und 270 Ziegenmilchproben entnommen, davon waren jeweils 102 Schafmilchproben und 170 Ziegenmilchproben konserviert. Bei diesen insgesamt 502 Proben wurden mittels DCC® und HrimaPro SCC® die SCC gemessen. Von dem LKV Niederösterreich erhielten wir ebenso die entsprechenden Zellzahlergebnisse der Vergleichsmessung mittels Combifoss® und sowie die Messergebnisse der Milchinhaltsstoffe (Fett, Eiweiß, Laktose). Zusätzlich wurden drei Schafmilchproben und drei Ziegenmilchproben für die Präzisionsmessung aufgetaut und jeweils mit dem DCC® und dem HrimaPro SCC fünf Mal hintereinander gemessen, was wiederum insgesamt 30 Zellzahlergebnisse lieferte. Letztendlich wurden im Rahmen des Messvergleichs von verdünnten zu unverdünnten Schafmilchproben weitere 30 Zellzahlergebnisse gemessen. In den Tabellen 5 und 6 wurden Werte der deskriptiven Statistik jeweils für Schaf- und Ziegenmilchproben dargestellt. Die Daten wurden mittels Kolmogorov Smirnov Test auf Normalverteilung geprüft, diese konnte nicht bestätigt werden, woraufhin logarithmierte Daten für die weiteren Untersuchungen verwendet wurden.

Tab. 5: Deskriptive Statistik

	Combifoss®	**DCC®**	**HrimaPro SCC®**
Schaf gesamt			
Mittelwert log^{10}	5,08	4,95	5,07
Standardabweichung log^{10}	0,60	0,57	0,50
Median	78.500	67.500	91.000
Minimum	9.000	6.000	17.000
Maximum	9.999.000	5.892.000	4.821.000
Ziegen gesamt			
Mittelwert log^{10}	5,44	5,29	5,72
Standardabweichung log^{10}	0,54	0,44	0,38
Median	281.000	172.500	528.500
Minimum	10.000	15.000	57.000
Maximum	9.999.000	6.091.000	6.635.000
Gesamte Proben			
Mittelwert log^{10}	5,27	5,14	5,42
Standardabweichung log^{10}	0,59	0,53	0,54
Median	175.500	123.500	282.500
Minimum	9.000	6.000	17.000
Maximum	9.999.000	6.091.000	6.635.000

4.2. Scatterplots zur Darstellung des Zusammenhangs der Zellzahlergebnisse der Messmethoden mit der Referenzmethode

Bei der Erstellung des Scatterplots wurden die logarithmierten Zellzahlergebnisse (dekadischer Logarithmus, log10) des Combifoss®-Gerätes als Referenzmethode auf der Y-Achse aufgetragen und die logarithmierten Zellzahlergebnisse der zu vergleichende Messmethode auf der X-Achse. Weiters wurde die Zellzahlergebnisse auf eine Tierart bezogen und der Unterschied zwischen unkonservierten und konservierten Proben farblich hervorgehoben. Die Abbildung 12 zeigt den Zusammenhang der Zellzahlergebnisse zwischen dem Combifoss® und dem HrimaPro SCC und in Abbildung 13 ist der Zusammenhang zwischen dem Combifoss® und dem DCC® ersichtlich.

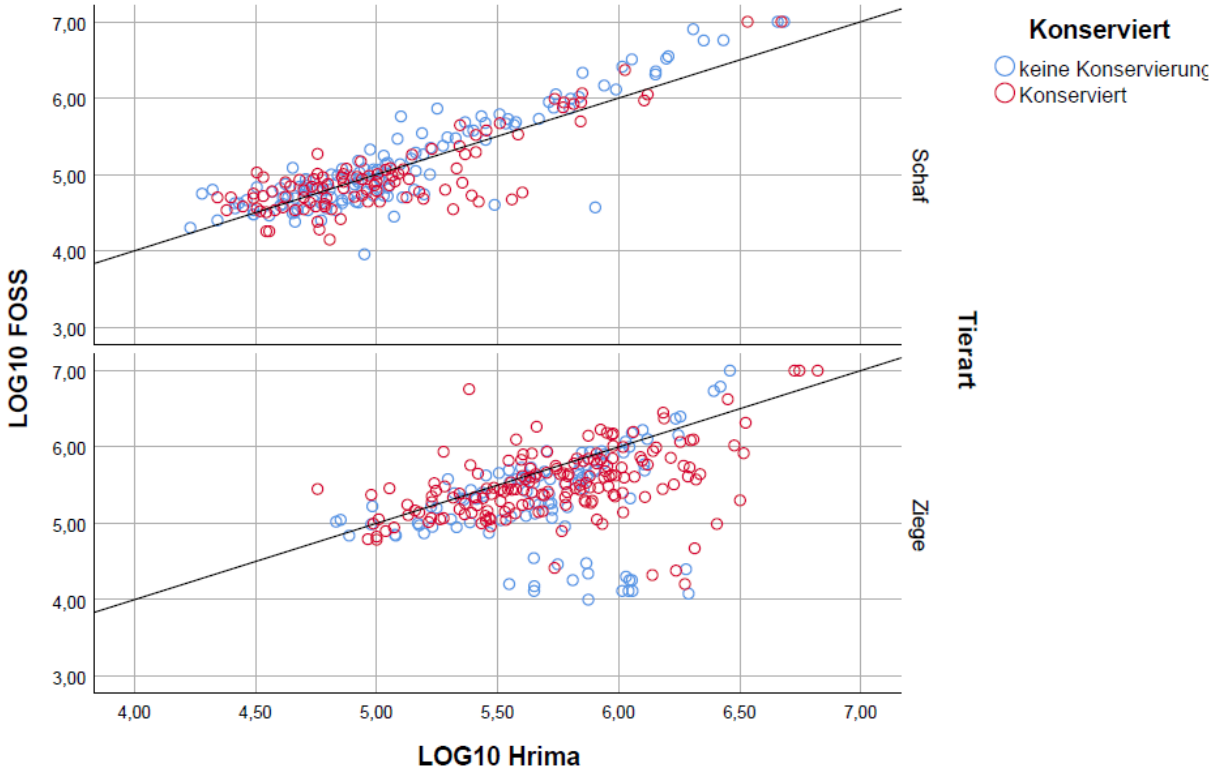

Abb. 12: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Zellzahlmessung der Referenzmethode mit der Vergleichsmethode HrimaPro SCC®

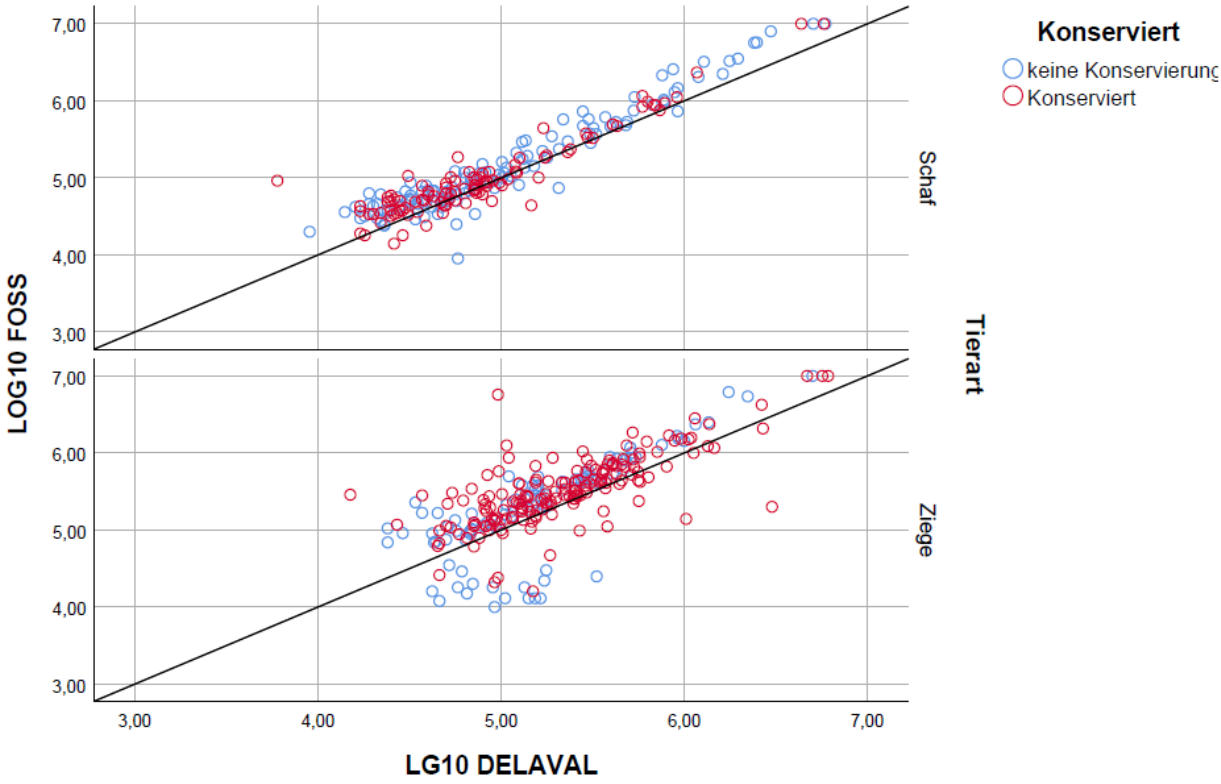

Abb. 13: Darstellung des Zusammenhangs der Zellzahlmessung der Referenzmethode im Vergleich zur DCC®-Messung

Die graphischen Darstellungen zeigen, dass die Ergebnisse der Zellzahlmessung in Schafmilch gut übereinstimmen. Im Gegensatz dazu streuen die Werte bei der Ziege deutlich stärker. Die Abweichungen sind insgesamt beim Messgerät HrimaPro SCC® stärker ausgeprägt. Es wird ersichtlich, dass bei der Ziege Abweichungen dadurch zustande kommen, dass im niedrigen Zellzahlbereich deutlich höhere Messwerte durch das Gerät HrimaPro SCC® ausgegeben werden als durch die Referenzmethode. Im Gegensatz dazu lassen sich aus der grafischen Darstellung keine Einflüsse der Konservierung ablesen (Abb. 12 und Abb. 13).

4.3. Scatterplot zur Darstellung des Einflusses der Milchinhaltstoffe auf die Zellzahlmessung mittels HrimaPro SCC® und DCC®

Für die Darstellung der Scatterplots wurde die Differenzen der logarithmierten Zellzahlergebnisse zwischen der Referenzmethode (Combifoss®) und dem Vergleichsgerät (DCC®, HrimaPro SCC®) auf der Y-Achse angegeben und die entsprechenden Messwerte des jeweiligen Milchinhaltsstoffes (Fett, Eiweiß, Laktose) auf der X-Achse (Abb. 14 bis 19). Für die Berechnung dienten die SCC-Ergebnisse des Combifoss® als Minuend und die SCC

Ergebnisse der jeweiligen Vergleichsmethode als Subtrahend. Die Darstellung erfolgt wiederum für jede Tierart einzeln und die Konservierung ist durch rot bzw. blau farblich kodiert.

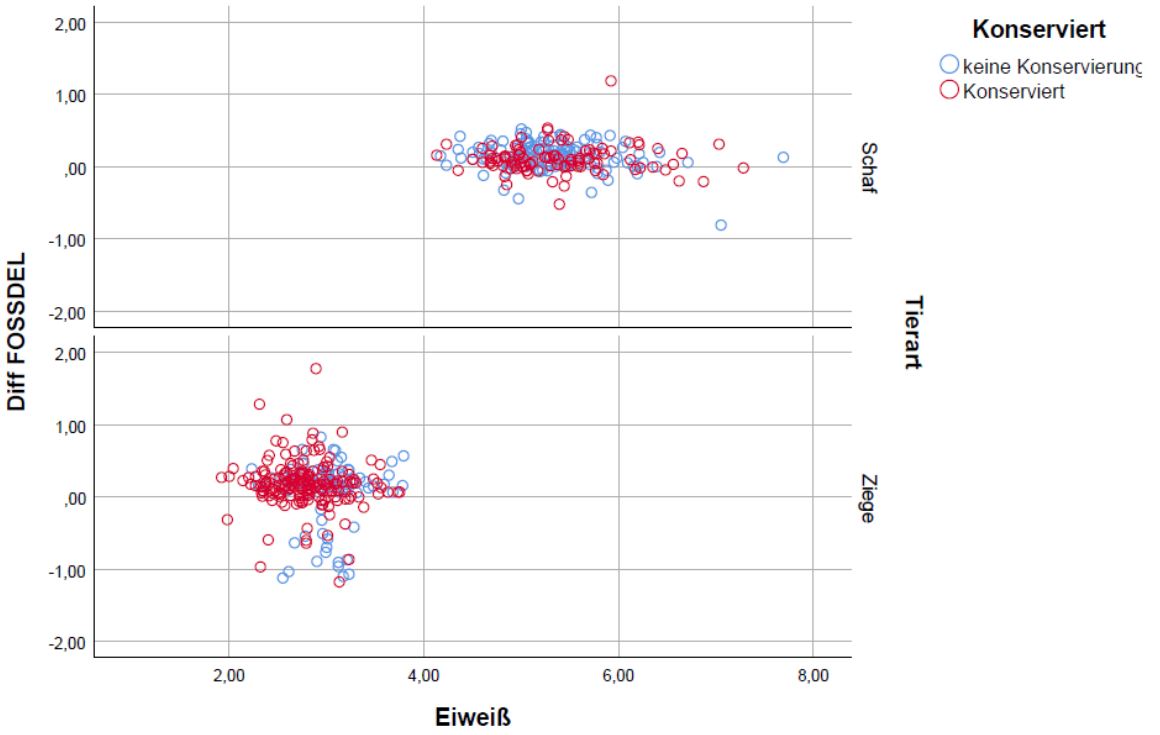

Abb. 14: Einfluss von Eiweiß auf die SCC-Messung beim DCC® im Vergleich zur Referenzmethode

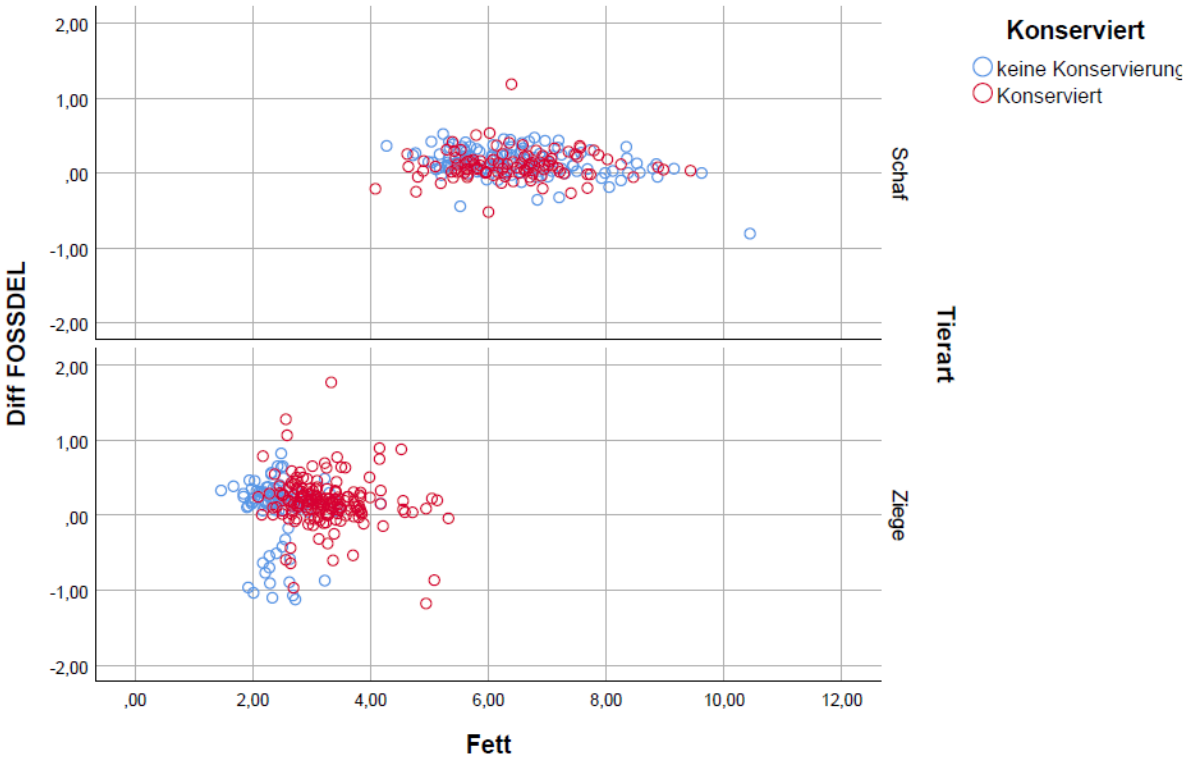

Abb. 15: Einfluss von Fett auf die Zellzahlmessung durch den DCC® im Vergleich zur Referenzmethode

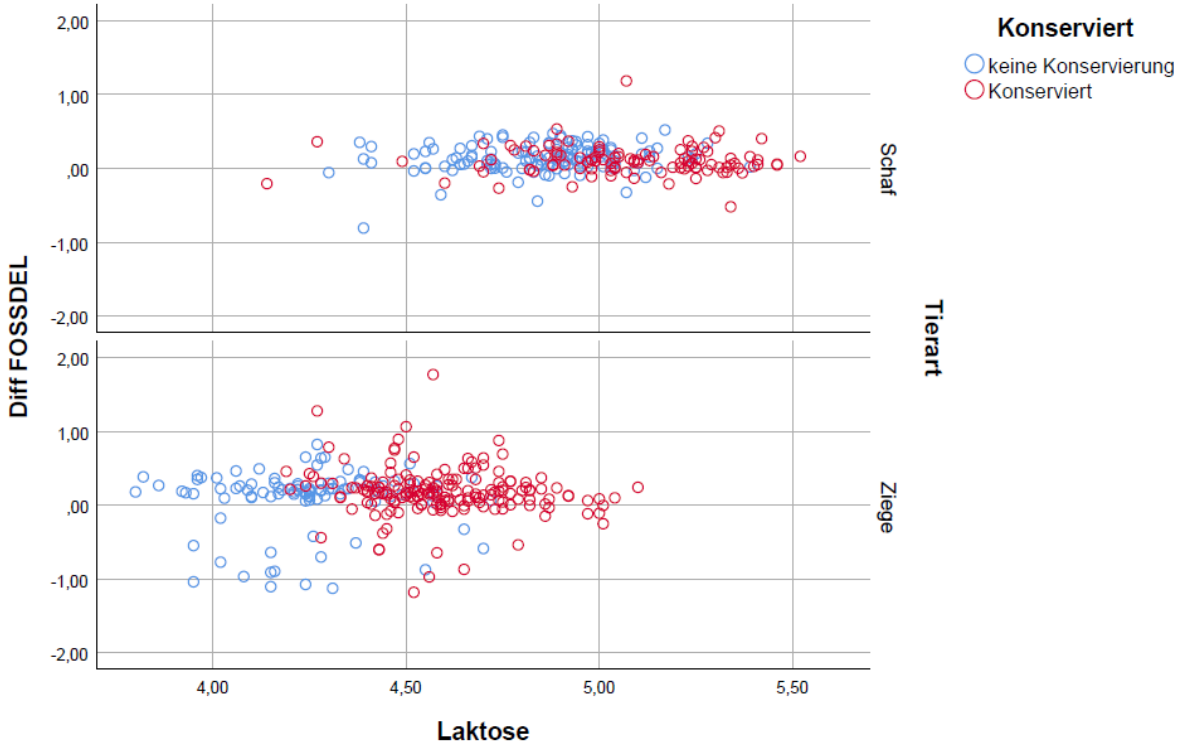

Abb. 16: Einfluss von Laktose auf das Zellzahlergebnis bei Messung mit dem DCC® im Vergleich zur Referenzmethode

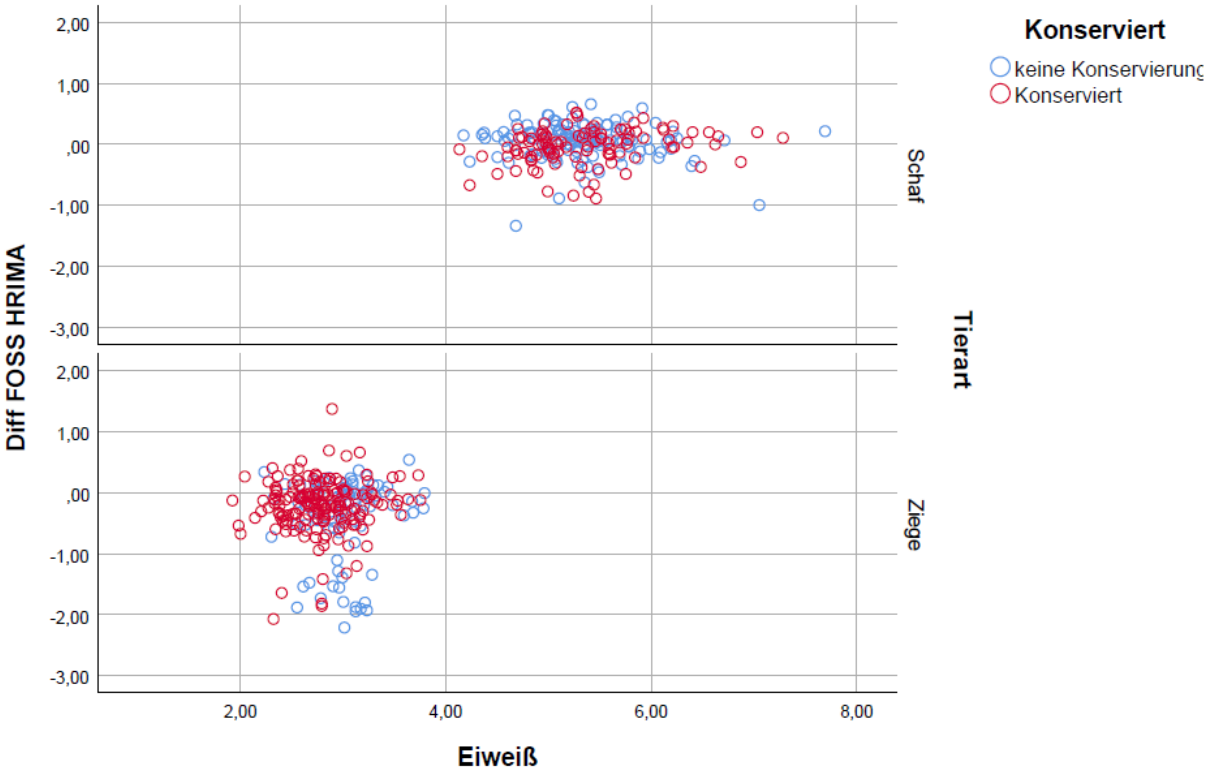

Abb. 17: Einfluss von Eiweiß auf das Zellzahlergebnis bei Messung mit dem HrimaPro SCC® im Vergleich zur Referenzmethode

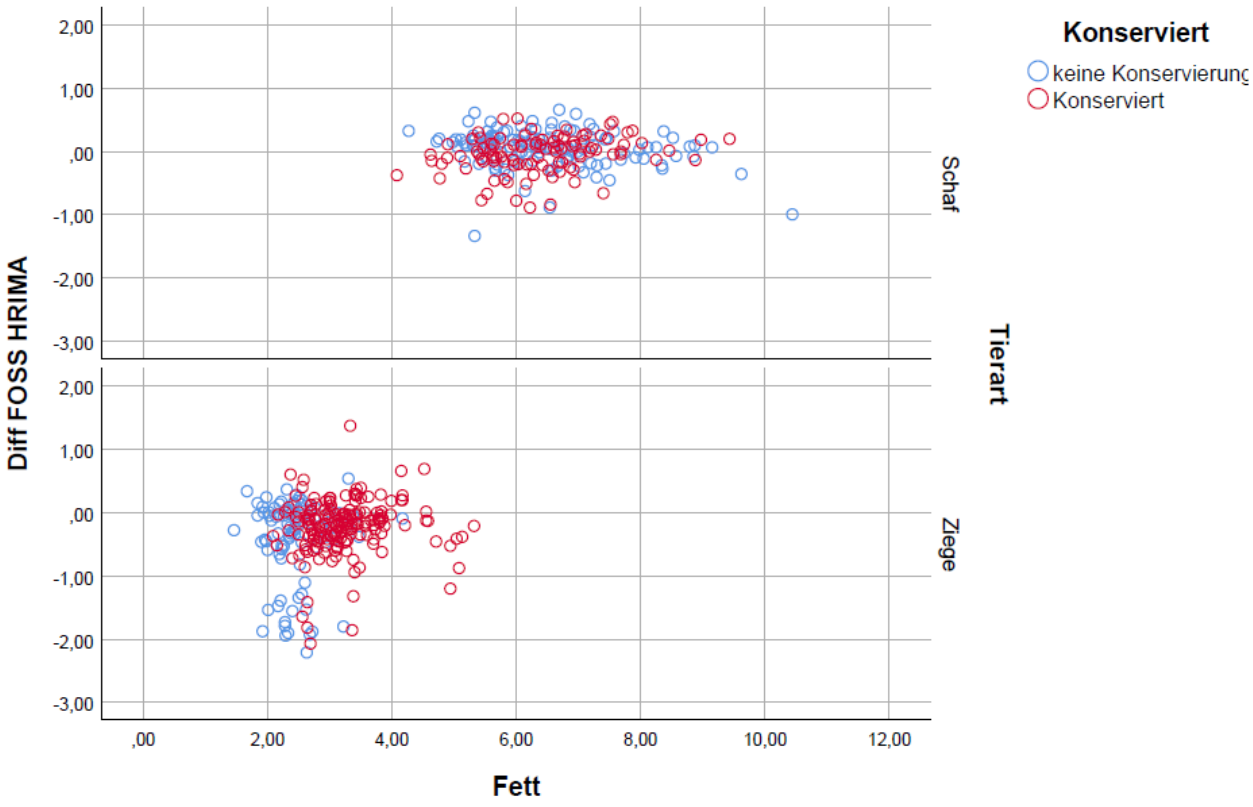

Abb. 18: Einfluss von Fett auf die SCC-Messung beim HrimaPro SCC® im Vergleich zur Referenzmethode

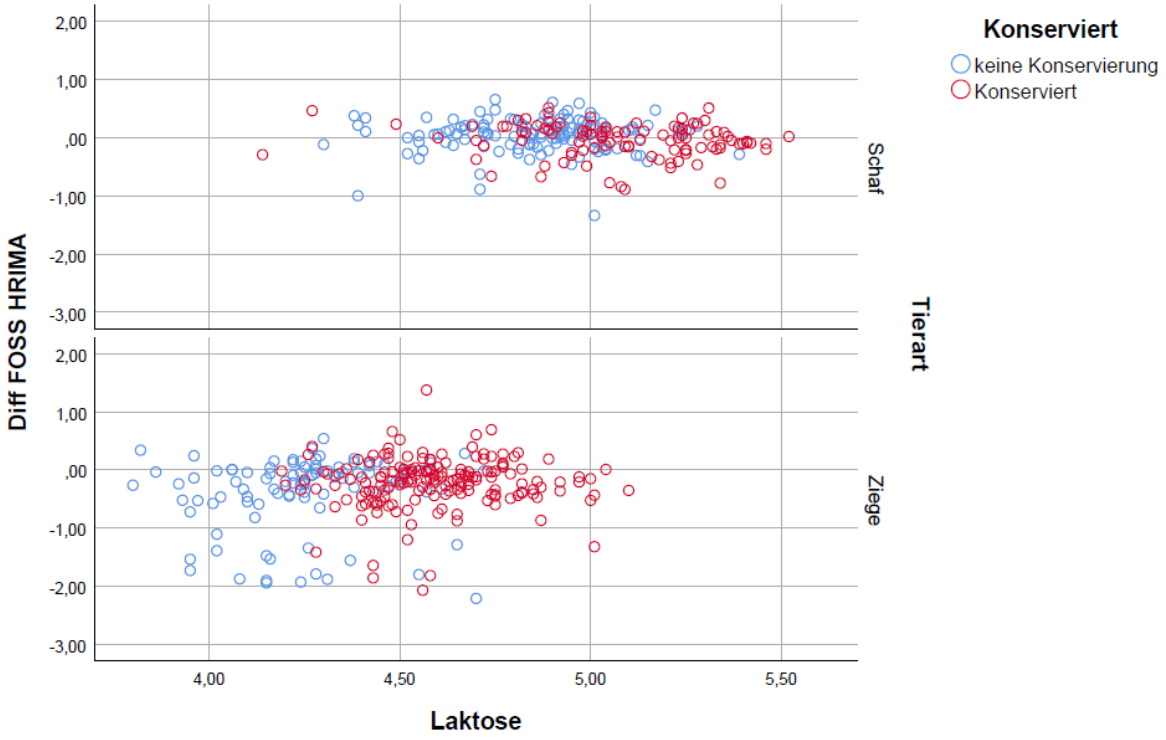

Abb. 19: Einfluss von Laktose auf die Zellzahlmessung durch das HrimaPro SCC® im Vergleich zur Referenzmethode

Aus den Abbildungen geht zwar hervor, dass die Milchinhaltsstoffe in Schafmilch deutlich höher sind als in Ziegenmilch, ein Einfluss des Eiweißgehaltes (Abb. 14), des Fettgehaltes (Abb. 15) bzw. des Laktosegehaltes der Milch (Abb. 16) auf die Übereinstimmung der Zellzahlmesswerte von Referenzmethode und DCC® lässt sich jedoch nicht ablesen. Auch auf die Messung mittels HrimaPro SCC® haben der Eiweißgehalt der Milch (Abb. 17), der Fettgehalt (Abb. 18) und der Laktosegehalt (Abb. 19) keinen Einfluss.

4.4. Bland-Altman-Plot zur Darstellung der mittleren Differenzen

Zur Erstellung des Bland-Altman-Plots wurde auf der Y-Achse die logarithmierte Differenz zwischen den Zellzahlergebnissen der Referenzmethode Combifoss® und der jeweiligen Vergleichsmethode (DCC®, HrimaPro SCC®) aufgetragen und auf der X-Achse wurde die logarithmierte SCC des Combifoss® angeführt. Die mittlere Linie schneidet die Y-Achse im Mittelwert der Differenz zwischen Combifoss und der Vergleichsmethode. Die beiden strichlierten Linien stellen die obere und die untere Schranke dar und berechnen sich aus dem Mittelwert±Standardabweichung*1,96.

Abbildung 20 gibt den Bland-Atlman-Plot für die Referenzmethode Combifoss® mit der Vergleichsmethode HrimaPro SCC® für die Zellzahlergebnisse der Ziegen und die Abbildung 21 für die Zellzahlergebnisse der Schafe wieder. Der Mittelwert der Differenz zwischen Combifoss® und der Vergleichsmethode HrimaPro SCC liegt bei -0,28 in der Ziegenmilch (obere Schranke: 0,76, untere Schranke -1,32) und bei 0,01 in der Schafmilch (obere Schranke 0,58 und untere Schranke -0,56).

Abbildung 22 zeigt den Bland-Altman-Plot für die Referenzmethode Combifoss® mit der Vergleichsmethode DCC® für die Zellzahlergebnisse der Ziegen und Abbildung 23 für die Zellzahlergebnisse der Schafe. Der Mittelwert der Differenz zwischen Combifoss® und der Vergleichsmethode DCC® liegt bei 0,14 in Ziegenmilch (obere Schranke: 0,87 und untere Schranke: -0,59). Für Schafe liegt der Mittelwert der Differenzen zwischen der Referenzmethode und dem DCC Gerät bei 0,13 (obere Schranke 0,50 und untere Schranke: -0,24)

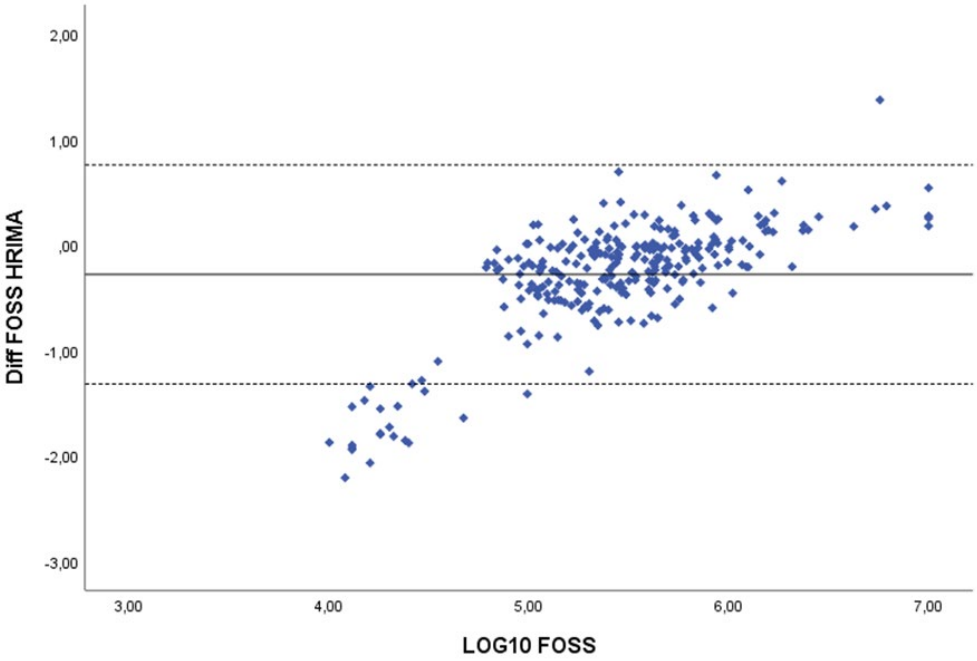

Abb. 20: Bland-Altman-Plot Combifoss® - HrimaPro SCC® für Ziegenmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte beider Verfahren (-0,28), die gepunktete Linie stellt die obere (0,76) und untere (-1,32) Schranke dar.

Abb. 21: Bland-Altman-Plot Combifoss® - HrimaPro SCC® für Schafmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte beider Verfahren (0,01), die gepunktete Linie stellt die obere (0,58) und untere Schranke (-0,56) dar.

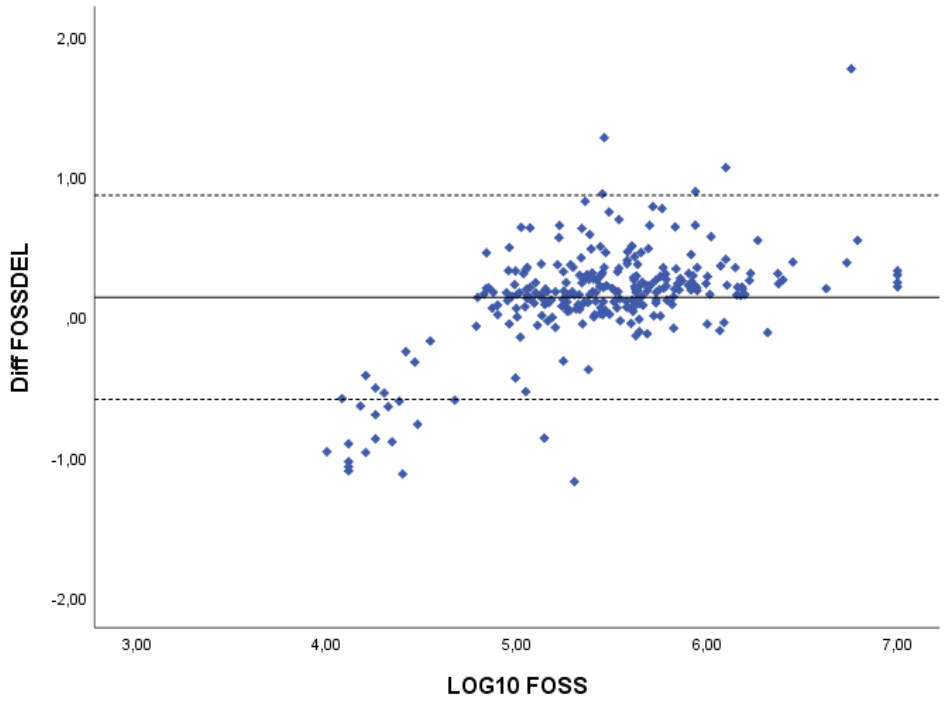

Abb. 22*:* Bland-Altman-Plot Combifoss® - DCC® für Ziegenmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte beider Verfahren (0,14), die gepunktete Linie stellt die obere (0,87) und untere Schranke (-0,59) dar

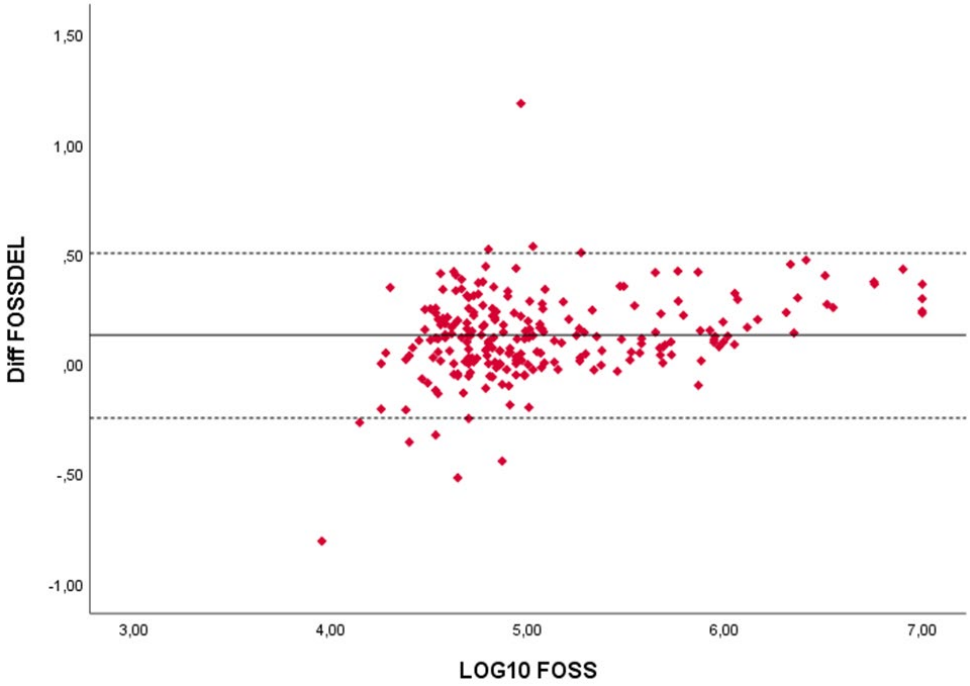

Abb. 23: Bland-Altman-Plot Combifoss® - DCC® für Schafmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte (0,13) beider Verfahren, die gepunktete Linie stellt die obere (0,5) und untere Schranke (-0,24) dar

Die Bland-Altman-Diagramme zeigen, dass deutlich mehr Ziegenmilchproben außerhalb der oberen und unteren Schranke liegen. Der Mittelwert für die DCC-Methode liegt im positiven Bereich und der der HrimaPro SCC® im negativen Bereich. Weiters wird aus den Diagrammen ersichtlich, dass die Abweichungen bei beiden Tierarten vorrangig im niedrigen Zellzahlbereich außerhalb der Schranken liegen.

4.5. Histogramm zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Messdifferenzen der Referenzmethode und der entsprechenden Vergleichsmethode

Bei der Erstellung des Histogramms wurden auf der Y-Achse die Häufigkeiten der Differenzen aufgetragen und auf der X-Achse die Differenz der Zellzahlergebnisse der Referenz- und der Vergleichsmethode. In Abbildung 24 sind die Häufigkeiten der Messdifferenzen zwischen Combifoss® und DCC® aufgetragen und in Abbildung 25 die Messdifferenzen zwischen Combifoss® und HrimaPro SCC®.

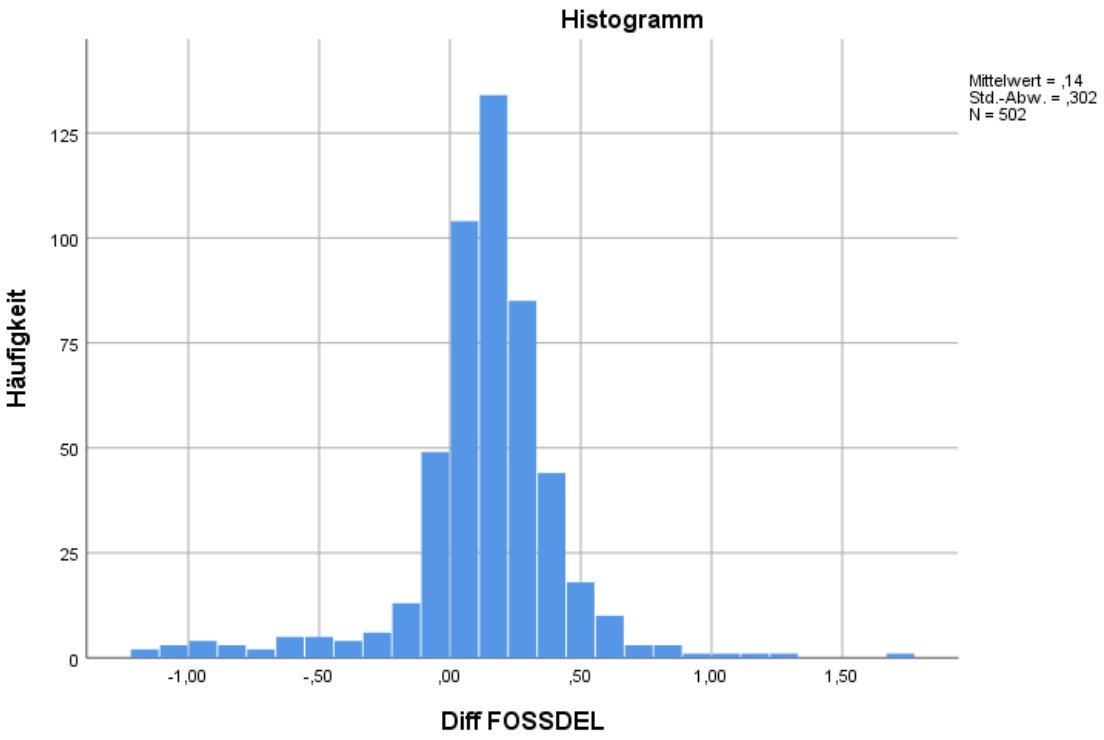

Abb. 24: Häufigkeitsverteilung der Messdifferenzen Combifoss® -DCC®

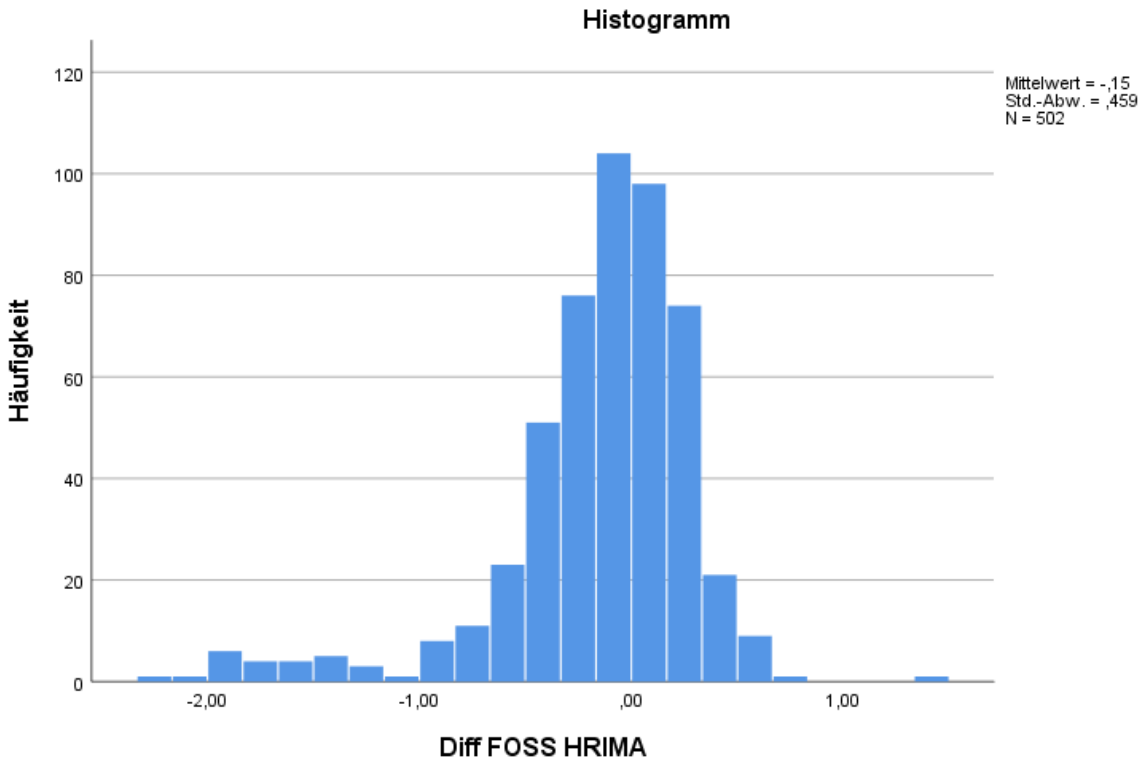

Abb. 25: Häufigkeitsverteilung der Messdifferenzen Combifoss®-HrimaPro SCC®

4.6. Intra-Class-Korrelationskoeffizient zur Beurteilung der statistischen Übereinstimmung zweier Testmethoden:

Die Berechnung der ICC basiert auf einem varianzanalytischen Ansatz und wurde mittels SPSS durchgeführt. In Tabelle 5 ist der ICC für unterschiedliche Merkmalsgruppen dargestellt. Dabei wurde bestätigt, dass die Übereinstimmung der Zellzahlen zwischen den Verfahren in Schafmilch deutlich besser als in Ziegenmilch war, sowie dass im niedrigen Zellzahlbereich eine schlechtere Übereinstimmung der Methoden vorlag (deutlich niedrigerer ICC).

Tab. 6: Übersicht der Intra-Class-Korrelationskoeffizienten

Variablen	Anzahl der Proben	ICC
Schaf gesamt	232	0,959
Ziegen gesamt	270	0,740
Unkonservierte Proben gesamt	230	0,890
Konservierte Proben gesamt	272	0,895
Proben mit Zellzahl ≤ 250000	298	0,624
Proben mit Zellzahl > 250000	204	0,860
Gesamtheit aller Proben	502	0,893

4.7. Boxplot zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung der CMT-Ergebnisse in Abhängigkeit der SCC-Ergebnisse der Referenzmethode.

Abbildung 26 stellt die logarithmierten Zellzahlergebnissen der Combifoss®-Methode (Y-Achse) als Boxplot-Darstellung in Abhängigkeit der CMT-Klassen dar.

In Abbildung 27 werden die Ergebnisse der Zellzahlmessung als Boxplot-Darstellung für die jeweiligen CMT-Klassen getrennt für die beiden Tierarten dargestellt.

Abbildung 28 zeigt die Aufteilung der CMT-Ergebnisse bezogen auf die Zellzahlergebnisse der Referenzmethode mit Unterscheidung von konservierten und unkonservierten Ziegenmilchproben.

Abbildung 29 gibt die Aufteilung der CMT-Ergebnisse auf die Zellzahlergebnisse der Referenzmethode mit Unterscheidung von konservierten und unkonservierten Schafmilchproben wieder.

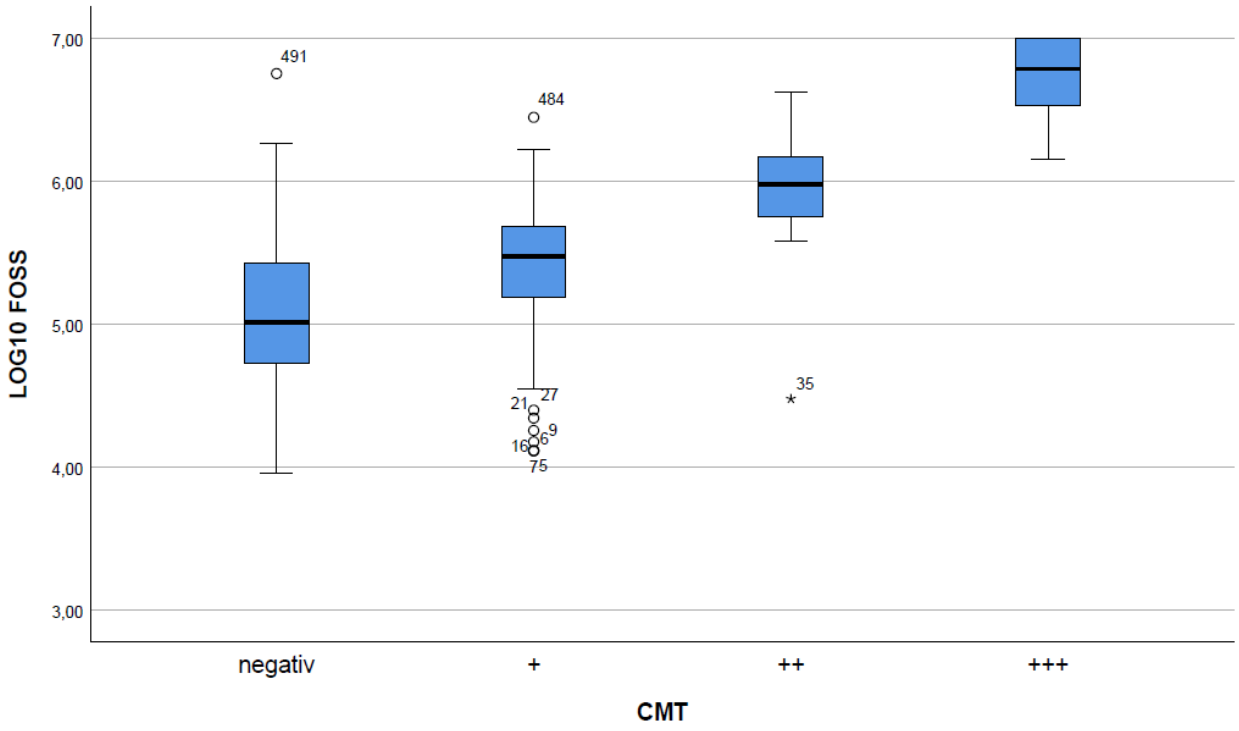

Abb. 26: Darstellung der SCC-Ergebnisse bezogen auf die CMT-Klassen

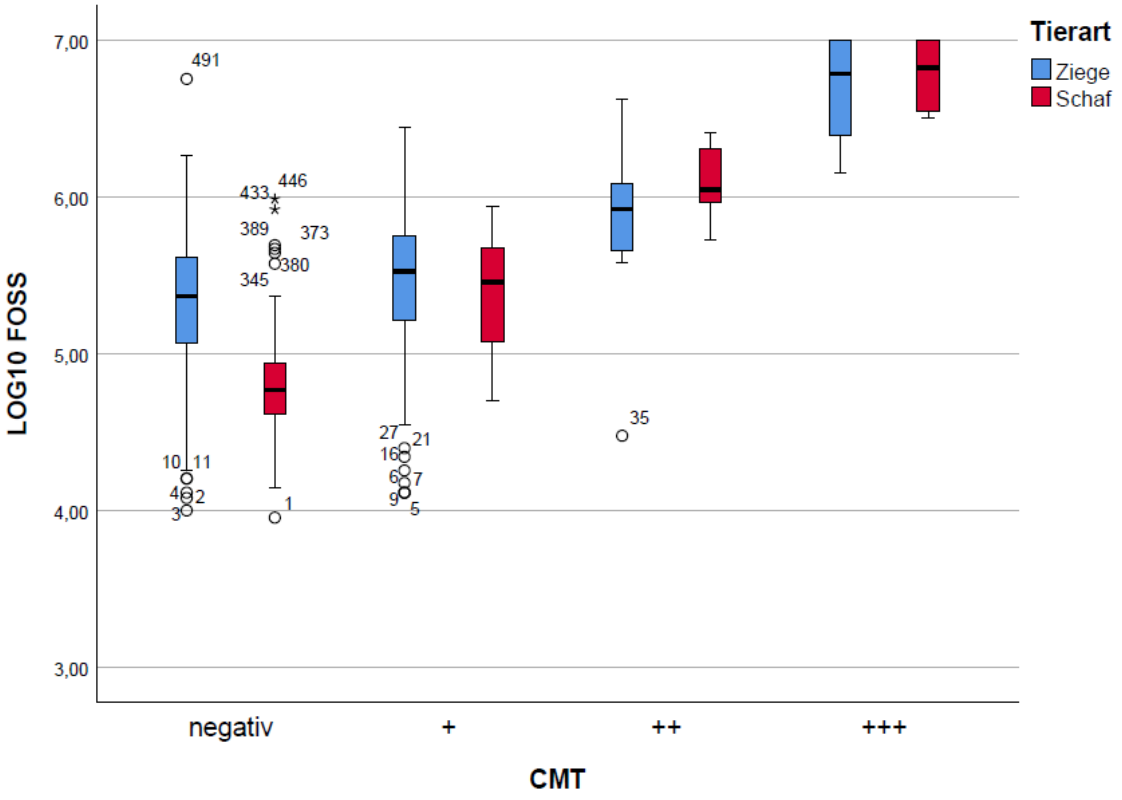

Abb. 27: Boxplot nach Tierarten getrennt zur Darstellung der SCC-Ergebnisse bezogen auf die jeweiligen CMT-Klassen

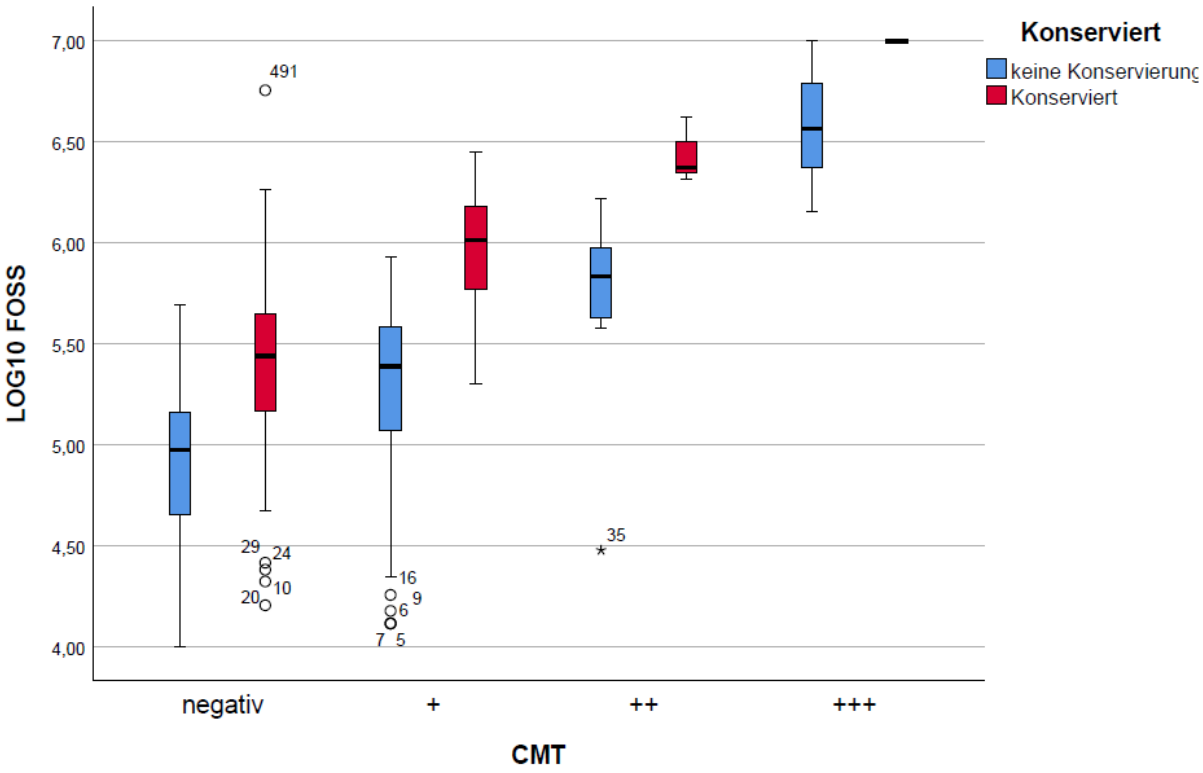

Abb. 28: Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen CMT und SCC in Abhängigkeit der Konservierung bei Ziegen

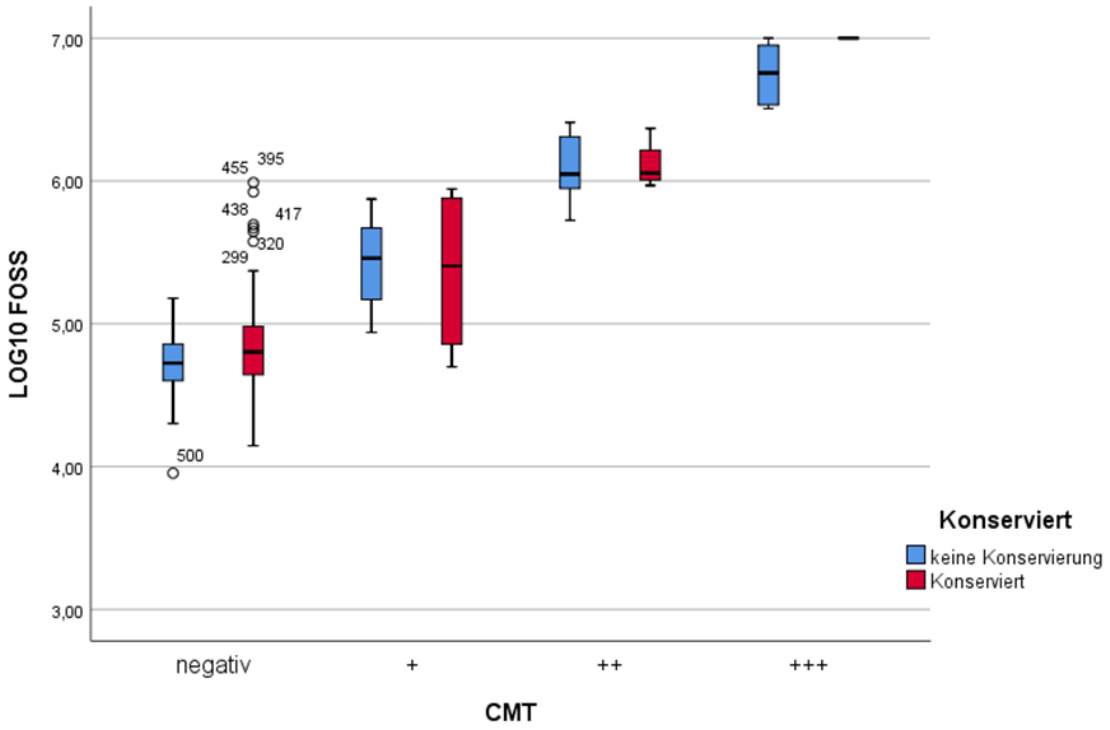

Abb. 29: Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen CMT und SCC in Abhängigkeit der Konservierung bei Schafen

Die Boxplots zeigen, dass die Ergebnisse der Zellzahlmessungen generell gut mit den Schalmtestergebnissen korrelieren. Die CMT-Klassifizierung steigt gemeinsam mit den Zellzahlergebnissen an. Auffallend ist, dass die CMT-Ergebnisse bei den konservierten Milchproben bei Schaf- wie auch bei der Ziege unterschätzt werden.

4.8. Präzisionsmessung mittels der Vergleichsmethoden

Zur Messung der Genauigkeit der jeweiligen Messmethoden wurden Präzisionsmessungen mit den zwei Vergleichsmethoden vorgenommen und dessen Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet. In der Tabelle 6 sind die Messergebnisse de Präzisionsmessung durch den DCC® dargestellt und in der Tabelle 7 die Messergebnisse des HrimaPro SCC®.

Tab. 7: Ergebnistabelle der Präzisionsmessung mit dem DCC®

	Schaf			Ziege		
	Probe SCC niedrig	**Probe SCC mittel**	**Probe SCC hoch**	**Probe SCC niedrig**	**Probe SCC mittel**	**Probe SCC hoch**
1.Messung	50.000	648.000	3.716.000	52.000	436.000	4.321.000
2. Messung	64.000	637.000	3.980.000	45.000	396.000	973.000
3. Messung	53.000	750.000	4.342.000	59.000	336.000	4.692.000
4. Messung	63.000	710.000	4.835.000	43.000	390.000	1.261.000
5. Messung	70.000	709.000	1.846.000	49.000	422.000	4.260.000
Mittelwert	**60.000**	**690.800**	**3.743.800**	**49.600**	**396.000**	**3.101.400**
Standardabweichung	**8.276**	**47.251**	**1.140.917**	**6.309**	**38.445**	**1.821.877**
Variationskoeffizient	**13,8**	**6,8**	**30,5**	**12,7**	**9,7**	**58,7**

Tab. 8: Ergebnisse der Präzisionsmessung mit dem HrimaPro SCC®

	Schaf			Ziege		
	Probe SCC niedrig	**Probe SCC mittel**	**Probe SCC hoch**	**Probe SCC niedrig**	**Probe SCC mittel**	**Probe SCC hoch**
1. Messung	66.000	544.000	6.487.000	49.000	271.000	5.731.000
2. Messung	65.000	591.000	5.040.000	57.000	313.000	6.094.000
3. Messung	55.000	608.000	5.121.000	48.000	267.000	6.038.000
4. Messung	62.000	561.000	5.168.000	57.000	231.000	5.787.000
5. Messung	51.000	647.000	5.352.000	83.000	591.000	6.053.000
Mittelwert	**59.800**	**590.200**	**5.433.600**	**58.800**	**334.600**	**5.940.600**
Standardabweichung	**6.535**	**40.407**	**599.894**	**14.184**	**146.249**	**168.209**
Variationskoeffizient	**10,9**	**6,8**	**11,0**	**24,1**	**43,7**	**2,8**

4.9. Scatterplot zur Darstellung des Vergleichs der Zellzahlergebnisse von unverdünnten zu unverdünnten Schafmilchproben mittels DCC® und HrimaPro SCC®

Zur Darstellung dieser Fragestellung wurden die logarithmierten Zellzahlergebnisse vor Verdünnung auf der X-Achse aufgetragen und die logarithmierten Zellzahlergebnisse nach 1:1 Verdünnung auf der Y-Achse aufgetragen.

In Abbildung 30 ist der Zusammenhang der Zellzahlen von unverdünnten zu verdünnten Proben mittels HrimaPro SCC®- Messung ersichtlich.

Abbildung 31 zeigt den Zusammenhang der Zellzahlen von unverdünnten zu verdünnten Proben bei der DCC®-Messung.

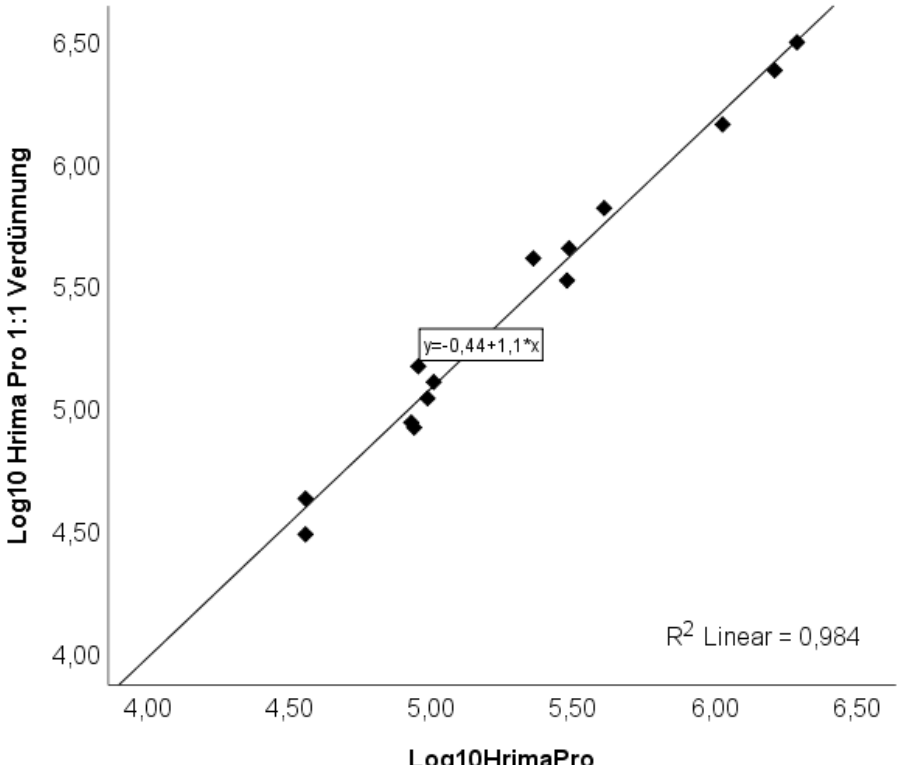

Abb. 30: Zusammenhang der Zellzahlen von unverdünnten zu verdünnten Proben mittels HrimaPro SCC®-Messung

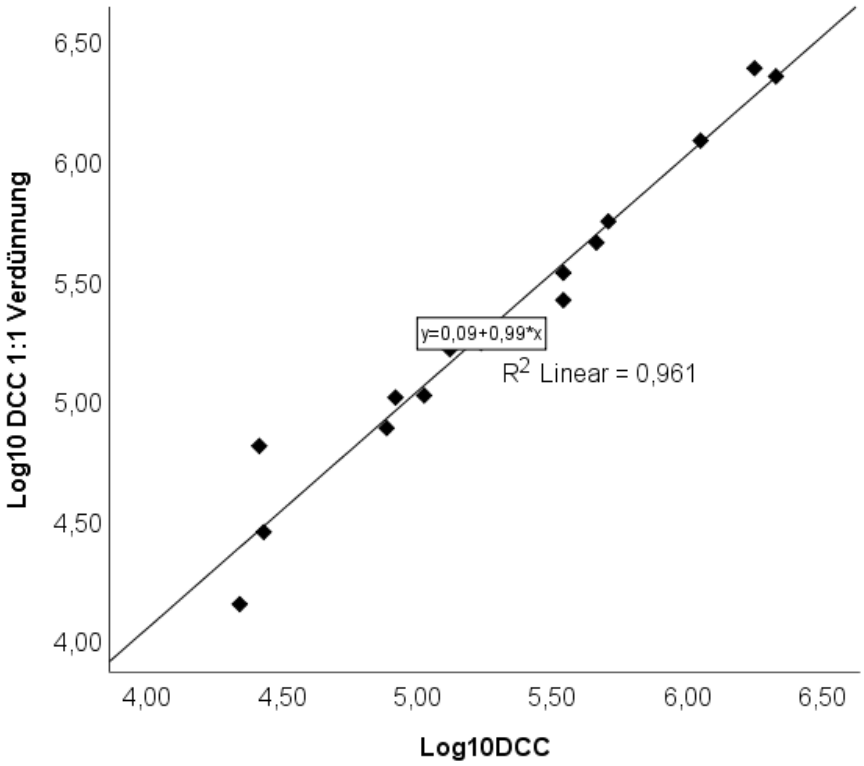

Abb. 31: Zusammenhang der Zellzahlen von unverdünnten und verdünnten Proben mittels DCC®-Messung

5. Diskussion

Übereinstimmung der Referenzmethode mit den beiden Vergleichsmethoden

Diese Studie wurde als Äquivalenzstudie mit der Forschungshypothese, dass die beiden Zellzahlmessverfahren (DCC® und HrimaPro SCC®) die Zellzahl in Schaf- und Ziegenmilch annähernd gut messen wie die Referenzmethode (Fossomatic®), durchgeführt. Für die praktische Anwendung würde das auch bedeuten, dass eventuelle Unterschiede – wie geringfügig höhere oder niedrigere Werte - im positiven Fall so klein sind, dass sie klinisch nicht relevant sind. Aus den Scatterplots ist bereits deutlich ersichtlich, dass die Zellzahlergebnisse der Schafmilchproben besser korrelieren als die der Ziegenmilchproben. Besonders im niedrigen Zellzahlbereich gibt es in Ziegenmilchproben deutliche Abweichungen von den Messwerten der Referenzmethode, bei den Schafmilchproben ist die Streuung insgesamt geringer gegeben, aber mehr im oberen Zellzahlbereich vorhanden. HrimaPro SCC® hat die Tendenz Zellzahlen höher zu messen.

Die Konservierung scheint keinen Einfluss auf die Messwertunterschiede der HrimaPro SCC®-Messung zu haben. In Untersuchungen von Sánchez et al. (2005) wurde darauf hingewiesen, dass durch Verwendung von Bronopol kein signifikanter Messunterschied zu nicht konservierten Proben besteht, im Gegensatz zum Konservierungsmittel Azidiol, bei dem die Zellzahl unterschätzt wird.

Aus dem Bland-Altman-Plot geht hervor, dass die HrimaPro®-Messung für Schafmilchproben gut geeignet ist und die Messwerte mit den Ergebnissen der Referenzmethode gut übereinstimmen. Bei den Ziegenmilchproben überschreitet ein geringer Teil der Zellzahlergebnisse im unteren Zellzahlbereich die untere Schranke, was darauf hinweist, dass HrimaPro SCC® im unteren Zellzahlbereich höhere Zellzahlen misst als die Referenzmethode. Die mittlere Differenz liegt bei -0,28, wodurch sich bestätigt, dass HrimaPro SCC® im Allgemeinen die Zellzahlen überschätzt. Das weist auf den Einfluss der zytoplasmatischen Partikel (CPP) hin, weil ihr Anteil an den gemessenen Zellen bei niedriger Zellzahl indirekt höher ist als bei hohen Zellzahlen, da die Anzahl der CPP nicht mit der Zellzahl ansteigt (Dulin et al. 1983). Dies steht im Widerspruch zu den von Berry und Broughan (2007) beschriebenen Ergebnissen wonach der DNA-spezifische Farbstoff SOFIA GREEN die CPP nicht miteinbeziehen sollte.

Bei dem Vergleich von DCC® und Combifoss® im Scatterplot ist erkennbar, dass die Zellzahlergebnisse insgesamt besser zusammenhängen als zwischen Combifoss® und HrimaPro SCC®. Wiederum ist die Streuung bei den Ziegenmilchproben größer, und findet vor allem im unteren Zellzahlbereich statt. Auch hier scheint die Konservierung zu keinem Messunterschied zu führen. Berry und Broughan (2007) beschreiben eine gut korrelierende Messperformance der DCC®- Messung im Vergleich zur Direktmikroskopie für Ziegenmilch. Gonzalo et al. (2006) haben ebenfalls die Combifoss®-Methode mit der DCC®-Methode bei Schafmilchproben verglichen, und beschreiben ebenfalls gut korrelierende Messergebnisse.

Der Bland-Altman-Plot zeigt, dass bei der DCC®-Messung die Zellzahlen der Ziegenproben im niedrigen Zellzahlbereich die untere Schranke teilweise überschreiten, und im mittleren bis hohen Zellzahlbereich die obere Schranke vereinzelt überschreiten. Das bedeutet, dass der DCC® im hohen Zellzahlbereich die Zellzahl unterschätzt und im niedrigen Zellzahlbereich überschätzt. Hillerton et al. (2004) verweisen darauf, dass es bei Proben mit hohen Zellgehalten, die mit Fossomatic-Geräten gemessen werden, zu Verschleppungen innerhalb des Gerätes kommen kann. Nachfolgende Proben könnten kontaminiert werden und somit höhere Zellgehalte aufweisen. Zellzahlwerte aus Ziegenmilch von mit Kuhmilch kalibrierten Fossomatic-Geräten wiesen um 24,5 % höhere Ergebnisse auf als bei gleichen Messungen von mit Ziegenmilch kalibrierten Geräten. Diese Untersuchungsergebnisse sollten auch in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden. Die mittlere Differenz liegt im Gegensatz zu HrimaPro SCC® hier im positiven Bereich bei 0,14 was eine generelle Unterschätzung der Zellzahl beim DCC® unterstreicht.

Einfluss der Milchinhaltsstoffe auf die Zellzahlmessung mittels HrimaPro SCC® und DCC®

Die Milchinhaltstoffe Fett, Eiweiß und Laktose haben keinerlei Einfluss auf die Zellzahlmessung mittels HrimaPro SCC® und DCC®. Gonzalo et al. (2008) haben jedoch festgestellt, dass ein höherer Fett– und Eiweißgehalt die Zellzahlmessung bei Schafmilchproben beeinflussen und zu einer Unterschätzung der Zellzahl führen kann. Sie empfehlen die Milchprobe zu verdünnen, um die Zellzahl wirklichkeitsgetreu zu messen. Unsere Messung hat keine Hinweise auf diese Notwendigkeit ergeben. Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges müssen diese Ergebnisse jedoch vorsichtig interpretiert werden.

Intra-Class-Korrelationskoeffizient

Der ICC ergab für die Gesamtheit der Schafproben einen Wert von 0,959 und für die Gesamtheit der Ziegenproben 0,740. Daraus ist klar erkennbar, dass die Übereinstimmung der drei Messmethoden bei den Zellzahlen der Schafproben sehr gut ist und bei den Ziegen deutlich abfällt. Auch beim ICC ist abzulesen, dass kein statistisch signifikanter Einfluss auf die Messung durch das Konservierungsmittel Bronopol gegeben ist. Aus der Einteilung der Zellzahlen in die Klassen <250000 und > 250000 bei der Berechnung des ICC lässt beurteilen, dass die Übereinstimmung bei den niedrigen Zellzahlen mit einem ICC von 0,624 mittelmäßig gegeben ist und bei den höheren Zellzahlen mit einem ICC von 0,860 wieder stark an Zuverlässigkeit zunimmt. Dies kann wiederum mit dem deutlich stärkeren Einfluss der CPP auf das Zellzahlergebnis im niedrigen Zellzahlbereich gewertet werden. Für alle Proben insgesamt wurde ein ICC von 0,893 berechnet, was schlussendlich eine zufriedenstellende Übereinstimmung insgesamt vermuten lässt.

CMT-Ergebnisse

Die CMT-Ergebnisse stimmen mit der Verteilung der Zellzahlen gut überein. Der Schalmtest lässt sich gut für die indirekte Messung der Zellzahl bei Schafen und Ziegen am Betrieb anwenden (Perrin et al. 1996; Lafi 2006; Mc Dougall et al. 2001).

Persson und Olofsson (2011) konnten in einer ihrer Studien feststellen, dass auch die Ergebnisse des DCC® gut mit den Ergebnissen des CMT korrelieren, und sich gut eignen Euterentzündungen festzustellen.

Die Unterschätzung der Zellzahlergebnisse bei Verwendung von Bronopol wurde als unerwarteter Befund festgestellt. Sie zeigt sich bei den Ziegenmilchproben, im Vergleich zum Schaf deutlich. Vermutlich ist es darauf hinzuführen, dass unter Verwendung von Bronopol das Schalmtestreagenz nicht ausreichend mit den Zellen interagieren kann, und somit weniger Desoxyribonukleinsäure freigesetzt wird, was zu einer verminderten Konsistenzänderung führt. Diese Beeinträchtigung des Schalmtestergebnisses durch das Konservierungsmittel Bronopol ist von wenig praktischer Relevanz, da der Test üblicherweise im Betrieb an nicht-konservierten frischen Milchproben durchgeführt wird. Sie sollte jedoch berücksichtigt werden, wenn, wie in unserem Fall, der Test nachträglich an konservierten Proben durchgeführt wird

Präzisionsmessung

Im Rahmen der Präzisionsmessung mittels der beiden Vergleichsmethoden wurden die entsprechenden Variationskoeffizienten errechnet. Bei den Ergebnissen der DCC®-Messung ist zu erkennen, dass sich der VK bei beiden Tierarten und bei den drei verschiedenen Zellzahlniveaus sehr ähnlich verhält. Auffällig ist, dass der Variationskoeffizient im hohen Zellzahlbereich bei den Schafproben 30,5 % und bei den Ziegenproben 58,7 % beträgt. Das bedeutet, dass das DCC® mehr Genauigkeit im niedrigen und mittleren Zellzahlbereich aufweist, und die Ungenauigkeit im hohen Zellzahlbereich zunimmt.

Bei dem HrimaPro SCC® verhält sich der VK bei den beiden Tierarten unterschiedlich. Bei den Schafproben ist der VK niedriger, und somit auch besonders im hohen Zellzahlbereich niedriger als bei dem DCC®. Bei der Ziege jedoch liegt der VK im niedrigen Zellzahlbereich bei 24,1 % und im mittleren Messbereich bei 43,7 %. Im Fall der 43.7 % muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der Berechnung ein sehr hoher Wert miteinbezogen wurde. Dieser kann als Ausreißer interpretiert werden, und ist für den hohen VK verantwortlich.

Auffallend ist, dass der VK bei der hohen Zellzahl sehr niedrig ist und bei 2,8 % liegt und für eine sehr hohe Messgenauigkeit spricht. In Bezug auf das Einfrieren der Proben bei den Ziegen vor der Messung konnten Sánchez et al. (2005) nachweisen, dass es bei Milchproben, die mit Bronopol konserviert wurden zu keinen Messunterschieden kommt. Bei nicht konservierten Proben und bei Verwendung von Azidol als Konservierungsmittel kommt es zur Unterschätzung der Zellzahl. Auch Martínez et al. (1996) sind der Meinung, dass es nach dem Einfrieren zu keinem bemerkenswerten Messunterschied bei den Zellzahlmessergebnissen kommt.

Vergleich der Zellzahlergebnisse von unverdünnten zu verdünnten Schafmilchproben mittels HrimaPro SCC® und DCC®

Als Ergebnis dieser Fragestellung wurde für die Messung mittels HrimaPro SCC® ein Korrelationskoeffizient von 0,984 und für die DCC®-Messung ein Korrelationskoeffizient von 0,961 errechnet. Der Unterschied der Zellzahlergebnisse zwischen verdünnten und unverdünnten Proben ist somit bei beiden Geräten als sehr gering einzustufen, wobei der Zusammenhang beim HrimaPro SCC® marginal besser ist. Gonzalo et al. (2006) bestätigen, dass das Messen von verdünnten Schafmilchproben zu validen Zellzahlergebnissen führt.

Unsere Ergebnisse verweisen darauf, dass die Unterschiede zwischen verdünnten und unverdünnten Proben so gering sind, dass eine Verdünnung von Schafmilchproben nicht notwendig erscheint.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Zellzahlmessgeräte für kleinere Labors oder eine tierärztliche Praxis DCC® und HrimaPro SCC® (Vergleichsmethoden) mit der Combifoss®-Methode (Referenzmethode) in Hinsicht der Messgenauigkeit und Richtigkeit zu vergleichen. Weiters wurden der Einfluss von Konservierungsmethoden (Konservierungsmittel, Einfrieren), Milchinhaltsstoffen (Fett, Eiweiß, Laktose) und die Verdünnung der Proben miteinbezogen.

Insgesamt wurden 232 Schafmilchproben und 270 Ziegenmilchproben mittels der drei Zellzahlmessverfahren gemessen. Davon waren 102 Schafmilchproben und 170 Ziegenmilchproben mittels Bronopol konserviert. Zusätzlich wurde vor jeder Messung ein Schalmtest der jeweiligen Milchprobe angefertigt. Weiters wurden jeweils drei Schaf- und drei Ziegenmilchproben mit drei verschieden Zellzahlniveaus mit den zwei Vergleichsmethoden für die Präzisionsmessung herangezogen. 15 bereits gemessene Schafmilchproben wurden aufgetaut und für den Vergleich von unverdünnten zu verdünnten Proben mit dem DCC® wie auch dem HrimaPro SCC® gemessen.

Der Vergleich zwischen HrimaPro®-Methode und Referenzmethode bei Messung von Schafmilchproben resultiert insgesamt in einer guten Übereinstimmung der Messergebnisse, die Streuung der Ergebnisse findet hauptsächlich im unteren Zellzahlbereich statt. Bei den Ziegen streuen die Ergebnisse im niedrigen Zellzahlbereich deutlich stärker. Die mittlere Differenz liegt bei -0,28, was wiederum eine Überschätzung der Zellzahlen bei HrimaPro SCC® belegt. Ursächlich für diese Ergebnisse sind die CPP in der Ziegenmilch, deren Anteil an den gemessenen Zellen bei niedriger Zellzahl indirekt höher ist als bei hohen Zellzahlen, da die Anzahl der CPP nicht mit der Zellzahl ansteigt.

Die Messergebnisse der DCC®-Methode und der Referenzmethode Combifoss® liefern bei den Schafen gut korrelierende Ergebnisse und bei den Ziegen wiederum eine größere Streuung der Zellzahlen, die vor allem im unteren Zellzahlbereich stattfindet. Die mittlere Differenz liegt bei 0,14, was insgesamt eine Unterschätzung der Zellzahlen mit sich bringt. Insgesamt zeigen die Zellzahlen im Vergleich zur HrimaPro®-Methode einen besseren Zusammenhang.

Die Konservierung der Milchproben, wie auch der Einfluss der Milchinhaltsstoffe Fett, Eiweiß und Laktose zeigten in den Ergebnissen keinen Einfluss auf die Zellzahlmessung.

Der Intra-Class-Koeffizient liegt bei den Schafproben insgesamt bei 0,959 und bei den Ziegen bei 0,740, was bedeutet, dass die Übereinstimmung der drei Messmethoden bei den Schafen sehr hoch ist, und bei den Ziegenproben deutlich abfällt.

Die Ergebnisse des Schalmtests (CMT) zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Verteilung der gemessenen Zellzahlen, was wiederum dessen Einsatz bei den Schaf- und Ziegenmilchproben als indirekte Messmethode empfiehlt.

Aus den Zellzahlergebnissen der Präzisionsmessung wurden für die verschiedenen Zellzahlklassen die Variationskoeffizienten berechnet. Für den DCC® verhalten sich die VK für Schaf und Ziege ähnlich. Im niedrigen und mittleren Zellzahlbereich ist die Genauigkeit hoch, im hohen Zellzahlbereich nimmt die Genauigkeit ab. Bei der HrimaPro®- Messung sind die VK beim Schaf niedriger als beim DCC® und bei den Ziegen im hohen Zellzahlbereich sehr niedrig, was auf eine hohe Genauigkeit hinweist.

Aus dem Vergleich der Zellzahlergebnisse von verdünnten zu unverdünnten Schafmilchproben konnten Korrelationskoeffizienten von 0,984 für HrimaPro SCC® und 0,961 für DCC® errechnet werden, was darauf schließen lässt, dass der Einfluss der Verdünnung einen marginalen Einfluss auf die Zellzahlergebnisse von Schafen hat.

7. Schlussfolgerung

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Methoden dazu geeignet sind, die SCC in Schaf- und Ziegenmilch zu messen. Die Ergebnisse vom DCC® korrelieren tendenziell besser mit den Combifoss®- Ergebnissen als die Zellzahlen der HrimaPro®-Methode. Beide Geräte, (insbesondere HrimaPro SCC®) überschätzen im niedrigen Zellzahlbereich die SCC bei den Ziegen, was auf die CPP in der Ziegenmilch zurückzuführen ist. Bei den Schafen eignen sich prinzipiell beide Geräte im Vergleich zur Referenzmethode gut, die Zellzahlen zu messen. Als Empfehlung für die Ziegen gilt, den Einfluss der CPP nicht außer Acht zu lassen und in falscher Weise zu interpretieren. Ein Einfluss von Milchinhaltsstoffen, des Konservierungsmittels Bronopol und des Verdünnens der Proben auf die Zellzahlergebnisse ließ sich nicht nachweisen. Aus den Ergebnissen des CMT ist erkennbar, dass dieser einwandfrei für die indirekte Messung der somatischen Zellzahl verwendbar ist. Es wäre empfehlenswert, die bereits erhobenen Messergebnisse noch mit der Methode der Direkten Mikroskopie als Folgestudie zu vergleichen. Allerdings sollte diese Untersuchung wiederum mit frischen, und nicht mit konservierten Proben, durchgeführt werden.

8. Summary

The objective of this study was to compare the two on-farm devices DCC® and HrimaPro SCC® (comparative methods) with Combifoss® (reference method) regarding validity and accuracy. Moreover, the influence of preservation methods (bronopol, freezing), milk solids (fat, protein, lactose) and the effect of dilution was tested.

In total, 502 milk samples (232 of sheep, 270 of goats) were examined using the three previously stated methods. 272 of these milk samples (102 of sheep, 170 of goats) were preserved using bronopol. Additionally, a CMT was carried out with each sample. In order to test the precision of DCC® and HrimaPro SCC®, three milk samples with different cell count levels of each species were measured. Furthermore, for testing the impact of dilution, 15 frozen sheep milk samples, which were measured before, were thawed. After measuring, they were diluted and got measured once again. All results were collected and evaluated statistically.

The comparison of the HrimaPro SCC® and Combifoss® methods in sheep samples shows a visible correlation of the measurement results. However, an overall variation can be observed at the lower cell count range, as well as at the higher cell count range. Latter of which, however, could only be observed in goat's milk. The calculated mean difference is -0.28, which proofs an overestimation of the cell numbers of HrimaPro SCC®. This is caused by the CPP in goat's milk. Their proportion in measured cells is indirectly higher at low cell count than at high cell count. The reason for that is that the number of CPPs aren't increasing with the number of cells.

The results of the DCC® method and the Combifoss® reference method demonstrate well-correlating results for sheep and for goats. More dispersion of cell counts can be observed especially in the lower cell count range. The mean difference is 0.14, which results in a general underestimation of cell numbers. Overall, the cell numbers show a better correlation compared to the HrimaPro® method.

There is no influence of preservation methods and milk ingredients fat, protein and lactose on the cell count results. The intra-class coefficient is 0,959 for all sheep samples and 0,740 for all goat samples. The congruence of the three methods is high for sheep and significantly lower for goat samples.

CMT-results exhibit consistency with the distribution of the somatic cell counts. This can be seen as proof for the reliability of this indirect measurement method for goat's milk and sheep milk samples. For testing the precision, the coefficients of variation (CV) were calculated for the different cell count classes. For the DCC®, the CV for sheep and CV for goats are similar. In the low and medium cell count range the accuracy is high. At high cell count range the accuracy decreases. When using HrimaPro® measurement, the CV in sheep are lower than when using DCC®. In goats, the CV in the high SCC is very low, which indicates a high accuracy.

The CV of the comparison of cell counts from diluted and undiluted milk samples are 0.984 for HrimaPro SCC and 0.961 for DCC. The influence of dilution is marginal.

9. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich für die großartige Betreuung meiner Diplomarbeit vor allem bei Frau Dr. Martina Baumgartner und Herrn Prof. Thomas Wittek bedanken, die mir stets motiviert mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und sehr um mich bemüht waren.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt dem Team des Milchlabors der Vetmeduni Wien, ohne dessen Räumlichkeiten und Bereitstellung der Geräte die Durchführung der Messungen nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gebührt auch Frau Dr. Monika Mellert und der Firma Biomedica für die gute Zusammenarbeit, Bereitstellung des HrimaPro SCC und die Anfrage auf Bearbeitung des spannenden Themas.

Ein herzlicher Dank gilt dem LKV Niederösterreich, im Besonderen Herrn. Ing. Martin Gehringer und dem entsprechenden Team der Milchkontrolleure für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, große Hilfsbereitschaft und Übermittlung der Daten.

Meine große Dankbarkeit gilt auch den vier Landwirten und ihren Familien, die mir die Milchproben zur Messung zur Verfügung gestellt haben, wie auch für ihre Gastfreundlichkeit, Unterstützung und Verständnis.

Ein riesengroßer Dank gilt der Österreichischen Buiatrischen Gesellschaft, unter der Führung von Herrn Prof. Baumgartner, die mich mit ihrer Großzügigkeit im Rahmen von finanziellen Mitteln diese Diplomarbeit unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Mag. phil. Dr. rer. nat. Alexander Tichy für die großartige Hilfsbereitschaft und Beratung im Rahmen der Erstellung der Statistik.

Danke sagen möchte ich auch vor allem von ganzem Herzen meinen Eltern Margarete und Wilhelm, wie auch meinen Geschwistern für die großartige und immerwährende von Herzen kommende Unterstützung meines Werdegangs und meiner Ausbildung und die mir die Liebe für die Landwirtschaft in die Wiege gelegt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen liebsten Studienkolleginnen Barbara, Eva, Christina, Anna und Madelaine für die schönste Studienzeit, die man sich nur wünschen konnte.

Zum Schluss möchte ich noch meinem Freund Michael bedanken. Danke für deine sehr große Geduld mit mir, deine Hilfsbereitschaft, fürs Zuhören, deine Zeit, fürs Aufmuntern und dein großes Verständnis für meine Berufung.

10. Literaturverzeichnis

Aleandri MA, Fagiolo P, Calderini R, Colafrancesco G, Giangolini R, Rosati, De Michels F. 1996. Studies conducted on somatic cells counts of goat's milk. In: Rubino R, Hrsg. Somactic cells and milk of small ruminants, Wageningen Pers. EAAP, 77:65–70.

Baumgartner W, Wittek T. 2018. Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. 9. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag,162-163.

Bergonier D, Lagriffoul G, Berthelot X, Barillet F. 1996. Facteurs de variation non infectieux des comptages de cellules somatiques chez les ovins et caprins laitiers. Wageningen Pers. EAAP, 77:112-135.

Bergonier D, de Crémoux, R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Veterinary Research, 34(5):689–716.

Berry E, Broughan J. 2007. Use of the DeLaval cell counter (DCC) on goats' milk. The Journal of Dairy Research, 74(3):345–348.

Bintsis T, Angelidis AS, Psoni L. 2008. Modern laboratory practices - Analysis of dairy products In: Britz TJ, Robinson RK, Hrsg. Advanced dairy science and technology. Erste Aufl. Oxford: Blackwell-Verglag,183–261.

Boscos C, Stefanakis A, Alexopoulos C, Samartzi F. 1996. Prevalence of subclinical mastitis and influence of breed, parity, stage of lactation and mammary bacteriological status on Coulter Counter Counts and California Mastitis Test in the milk of Saanen and autochthonous Greek goats. Small Ruminant Research, 21:139-147.

Boulaaba A, Grabowski N, Klein G. 2011. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. Small Ruminant Research, 97(1-3):117–123.

Chen SX, Wang JZ, van Kessel JS, Ren FZ, Zeng SS. 2010. Effect of somatic cell count in goat milk on yield, sensory quality, and fatty acid profile of semisoft cheese. Journal of Dairy Science, 93(4):1345–1354.

Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. Small Ruminant Research, 68(1-2):145–153.

de Crémoux R. 1996. Cell counts for diagnosing caprine bacterial mammary infections. Third Int. Mastitis Sem., Proceedings II S6:90–91.

Delgado-Pertíñez M, Guzmán-Guerrero JL, Mena Y, Castel JM, González-Redondo P, Caravaca FP. 2009. Influence of kid rearing systems on milk yield, kid growth and cost of Florida dairy goats. Small Ruminant Research, 88(2-3):105-111.

Dulin AM, Paape MJ, Schultze WD, Weinland BT. 1983. Effect of Parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmatic particles in goat milk. Journal of Dairy Science, 66:2426-2433.

Fedele V, Claps S, Rubino R. 1996. Effect of feding systems on somatic cells count in goats. Wageningen Pers. EAAP, 77:167-172.

Fossomatic ™ FC. Hrsg. 2006. Somatic cell counting for rawmilk testing [Broschüre]. Hilleroed: Foss

García-Hernández R, Newton G, Horner S, Nuti LC. 2007. Effect of photoperiod on milk yield and quality, and reproduction in dairy goats. Livest Science, 110(3):214-220.

Gonzalo C, Carriedo JA, Baro JA, San Primitivo F. 1994. Factors Influencing Variation of Test Day Milk Yield, Somatic Cell Count, Fat, and Protein in Dairy Sheep. Journal of Dairy Science, 77:1537-1542.

Gonzalo C, Martínez JR, San Primitivo F. 1998. Significación y métodos de valoración del recuento celular en la leche de oveja, Ovis 56: 13-25.

Gonzalo C, Carriedo JA, Blanco MA, Beneitez E, Juárez MT, De La Fuente LF, San Primitivo F. 2005. Factors of Variation Influencing Bulk Tank Somatic Cell Count in Dairy Sheep. Journal of Dairy Science, 88:969-974.

Gonzalo C, Linage B, Carriedo J, de la Fuente F, San Primitivo F. 2006. Evaluation of the Overall Accuracy of the DeLaval Cell Counter for Somatic Cell Counts in Ovine Milk. Journal of Dairy Science, 89(12):4613–4619.

Gonzalo C, Linage B, Carriedo JA, de La Fuente LF. 2008. Short communication: Evaluation of the overall accuracy of the DeLaval cell counter® for somatic cell count in ovine milk: effect of soak time in diluted and undiluted milk samples. Journal of Dairy Science, 91(8): 3114–3118.

Gonzalo C., Martínez JR, Carriedo JA, San Primitivo F. 2003. Fossomatic Cell-Counting on Ewe Milk: Comparison with Direct Microscopy and Study of Variation Factors. Journal of Dairy Science, 86(1):138-45.

Hillerton JE, Berry EA, Gravenor MB, Middelton N. 2004. Errors associated with milk cell counting. Veterinary Record, (155):445–448.

Jiménez-Granado R, Sánchez-Rodríguez M, Arce C, Rodríguez-Estévez V. 2014. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. Spanish Journal of Agricultural Research, 12(1):133.

Jiménez-Granado R, Rodríguez-Estévez V, Morantes M, Arce C, Sánchez-Rodríguez M . 2012. Relationship between reproductive parameters and somatic cell count in dairy goats. Reproduction in Domestic Animals, 47(3):108-110.

Kosev K, Tzolov S, Denev S, Michailova G, Koleva M. 1996. Influence of lactation and type of milking on the somatic cell count in goat's milk. Wageningen Pers. EAAP, 77:227-229.

Koo TK, Li MY. 2016. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. Journal of Chiropractic Medicine. 2016, 15(2):155-63.

Lafi, SQ. 2006. Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. Small Ruminant Research, 62(1-2):83–86.

Leitner G, Chaffer M, Zamir S, Mor T, Glickman A, Winkler M, Weisblit L, Saran A. 2001. Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. Small Ruminant Research, 39:107-112.

Luengo C, Sánchez A, Corrales JC, Fernández C, Contreras A. 2004. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. The Journal of Dairy Research, 71(2):169–174.

Martínez JR, Gonzalo C, Carriedo JA, San Primitivo F. 1996. Effect of Freezing on Fossomatic Cell Counting in Ewe Milk. Journal of Dairy Science, 86(8):2583-7.

McDougall S, Murdough P, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Scruton D. 2001. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance, and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. Small Ruminant Research, 40:245-254.

McDougall S, Voermans M. 2002a. Influence of Estrus on Somatic Cell Count in Dairy Goats. Journal of dairy science, 85(2):378–383.

McDougall S, Anniss FM, Cullum AA. 2002b. Effect of transport stress on somatic cell counts in dairy goats. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 62:16-18.

Mehne D. 2009. Modellhafte Untersuchungen zur Frühphase der Mastitis beim Rind [Disseration], München: Ludwig-Maximillians-Universität.

Milkotronic Ltd. 2017. Lactoscan SCC Operation Manuel [Broschüre]. Nova Zagora: Milkotronic Ltd.

Morand-Fehr P, Fedele V, Decandia M, Le Frileux Y. 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. Small Ruminant Research 68(2-3):20-34.

Paape MJ, Poutrel B, Contreras A, Marco JC, Capuco AV. 2001. Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants. Journal of Dairy Science, 84(E. Suppl.):237-244.

Paape MJ, Wiggans GR, Bannerman DD, Thomas DL, Sanders AH, Contreras A. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. Small Ruminant Research, 68(1-2):114–125.

Pérez-Baena I, Blasco E, Sánchez-Quinche A, Romero T, Mazón J, Peris C. 2012. Efecto de la sarna sobre la producción y la composición de la leche en cabras. Revista Albéitar, 158: 10-11.

Perrin GG, Mallereau MP, Lenfant D, Baudry C. 1996. Relationships between California mastitis test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. Small Ruminant Research, 26:167-170.

Persson Y, Olofsson I. 2011. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. Acta veterinaria Scandinavica, 53:15.

Petersson KH, Connor LA, Petersson-Wolfe CS, Rego KA. 2011. Evaluation of confirmatory stains used for direct microscopic somatic cell counting of sheep milk. Journal of Dairy Science, 94(4) :1908–1912.

Poutrel B, de Cremoux R, Pillet R, Heuchel V, Ducheilliez M. 1996. Caprine Mammary Infections with Respect to Cell Counts in Milk. Caprine Mammary Infections with Respect to Cell Counts in Milk. Wageningen Pers. EAAP (77):61-64.

Randy HA, Caler WA, Miner WA, Miner WH, Atwood AC, Howarg DB. 1991. Effect of lactation number, year, and milking management practices on milk yield and SCC of french Alpine dairy goats. Journal of Dairy Science, 74(1):311.

Raynal-Ljutovac K, Pirisi A, de Crémoux R, Gonzalo C. 2007. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive, and technological aspects. Small Ruminant Research, 68(1-2):126–144.

Rota AM, Gonzalo C, Rodríguez PL, Rojas AI, Martin L, Tovar JJ. 1993. Somatic cell types in goats' milk in relation to total cell count, stage and number of lactations. Small Ruminant Research, 12 (1):89-98.

Ryan DP, Greenwood PL, Nichols PJ. 1993. Effect of caprine arthritis- encephalitis virus infection on milk cell count and N-Acetyl-• •- glucosaminidase activity in dairy goats. Journal of Dairy Research., 60: 299-306.

Sánchez-Rodríguez M, Gómez Castro AG, Mata Moreno C, Doménech García V, López Baldán D, Romero AM, Cabello A. 2000. Resultados productivos del rebaño experimental de raza Florida, FEAGAS 1(18):105-107.

Sánchez A, Sierra D, Luengo C, Corrales JC, Morales CT, Contreras A, Gonzalo C. 2005. Influence of Storage and Preservation on Fossomatic Cell Count and Composition of Goat Milk. Journal of Dairy Science, 88:3095–3100.

Sánchez J, Montes P, Jimènez A, Andres S. 2007. Prevention of clinical mastitis with barium selenate in dairy goats from a selenium-deficient area. Journal of Dairy Science, 90(5):2350-2354.

Souci SW, Fachmann W, Kraut Heinrich. 2008. Food Composition and Nutrition Tables: Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft

Souza FN, Blagitz MG, Penna CFAM, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? Small Ruminant Research, 107(2-3):65–75.

Tian SZ, Chang CJ, Chiang CC, Peh HC, Huang MC, Lee J-W, Zhao X. 2005. Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. The Canadian Journal of Veterinary Research, 69: 39-45.

Winter P, Baumgartner W. 1999. Evaluation of the California mastitis test (CMT) reaction in goat milk and its interpretation. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 106(1):30-4.

Winter P. 2008. Praktischer Leitfaden Mastitis; Vorgehen beim Einzeltier und im

Bestand. Stuttgart: Parey.

Zeng SS, Escobar EN. 1995. Effect of parity and milk production on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. Small Ruminant Research, 17(3):269-274.

11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 DeLaval Cell Counter® mit eingelegter Messkassette (Pfeil) 23

Abb. 2 Funktionsmechanismus der Combifoss®- Zellzahlmessgeräts: Das Milch-Ethidiumbromidfarbstoffgemisch passiert die Durchflusszelle. Dort sind die gefärbten Zellen einer spezifischen Wellenlänge ausgesetzt. Die Zellen emittieren fluoreszierende Lichtimpulse in einer anderen Wellenlänge, welche gezählt und technisch erfasst werden. Bildquelle: Fossomatic TMFC. 2006. Somatic cell counting for rawmilk testing. [Broschüre]..... 25

Abb. 3: Combifoss®-Zellzahlmessgerät zur Untersuchung größerer Probenzahlen Bildquelle: Fossomatic TMFC. 2006. Somatic cell counting for rawmilk testing. [Broschüre] 26

Abb. 4 HrimaPro SCC®- Gerät 27

Abb. 5 Aufbereitung der Milchproben für die Zellzahlmessung mit dem HrimaPro SCC®-Gerät. Bildquelle: Milkotronic Ltd. 2017. Lactoscan SCC Operation Manuel. [Broschüre] 28

Abb. 6 Funktionsweise der HrimaPro SCC®-Geräts. Bildquelle: Milkotronic Ltd. 2017. Lactoscan SCC Operation Manuel. [Broschüre]..... 28

Abb. 7: Beurteilung des CMT: Viertel links unten (B): Mittelgradig erhöhte Zellzahl (++), restliche Viertel: negativ 33

Abb. 8: Messkassette für den DeLaval Cell Counter® 34

Abb. 9: Einsetzen der Messkassette in den DCC® 34

Abb. 10: HrimaPro SCC®-LACTOCHIP mit den entsprechenden vier Messfeldern: A-C bereits befüllt, D: vorbereite Milchprobe wird in das Messfeld pipettiert..... 34

Abb. 11: Benutzeroberfläche bei gleichzeitiger Bearbeitung und Messung der vier Milchproben durch das HrimaPro SCC®-Gerät. Bildquelle: Milkotronic Ltd. 2017. Lactoscan SCC Operation Manuel. [Broschüre]..... 35

Abb. 12: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Zellzahlmessung der Referenzmethode mit der Vergleichsmethode HrimaPro SCC®..... 40

Abb. 13: Darstellung des Zusammenhangs der Zellzahlmessung der Referenzmethode im Vergleich zur DCC®-Messung 41

Abb. 14: Einfluss von Eiweiß auf die SCC-Messung beim DCC® im Vergleich zur Referenzmethode..... 42

Abb. 15: Einfluss von Fett auf die Zellzahlmessung durch den DCC® im Vergleich zur Referenzmethode..... 42

Abb. 16: Einfluss von Laktose auf das Zellzahlergebnis bei Messung mit dem DCC® im Vergleich zur Referenzmethode 43

Abb. 17: Einfluss von Eiweiß auf das Zellzahlergebnis bei Messung mit dem HrimaPro SCC® im Vergleich zur Referenzmethode 43

Abb. 18: Einfluss von Fett auf die SCC-Messung beim HrimaPro SCC® im Vergleich zur Referenzmethode 44

Abb. 19: Einfluss von Laktose auf die Zellzahlmessung durch das HrimaPro SCC® im Vergleich zur Referenzmethode 44

Abb. 20: Bland-Altman-Plot Combifoss® - HrimaPro SCC® für Ziegenmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte beider Verfahren (-0,28), die gepunktete Linie stellt die obere (0,76) und untere (-1,32) Schranke dar. 46

Abb. 21: Bland-Altman-Plot Combifoss® - HrimaPro SCC® für Schafmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte beider Verfahren (0,01), die gepunktete Linie stellt die obere (0,58) und untere Schranke (-0,56) dar. 46

Abb. 22*:* Bland-Altman-Plot Combifoss® - DCC® für Ziegenmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte beider Verfahren (0,14), die gepunktete Linie stellt die obere (0,87) und untere Schranke (-0,59) dar 47

Abb. 23: Bland-Altman-Plot Combifoss® - DCC® für Schafmilchproben. Die mittlere Linie geht durch den Mittelwert der Differenz der Messwerte (0,13) beider Verfahren, die gepunktete Linie stellt die obere (0,5) und untere Schranke (-0,24) dar 47

Abb. 24: Häufigkeitsverteilung der Messdifferenzen Combifoss® -DCC® 48

Abb. 25: Häufigkeitsverteilung der Messdifferenzen Combifoss®-HrimaPro SCC® 49

Abb. 26: Darstellung der SCC-Ergebnisse bezogen auf die CMT-Klassen 51

Abb. 27: Boxplot nach Tierarten getrennt zur Darstellung der SCC-Ergebnisse bezogen auf die jeweiligen CMT-Klassen 51

Abb. 28: Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen CMT und SCC in Abhängigkeit der Konservierung bei Ziegen 52

Abb. 29: Boxplot zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen CMT und SCC in Abhängigkeit der Konservierung bei Schafen 52

Abb. 30: Zusammenhang der Zellzahlen von unverdünnten zu verdünnten Proben mittels HrimaPro SCC®-Messung 54

Abb. 31: Zusammenhang der Zellzahlen von unverdünnten und verdünnten Proben mittels DCC®-Messung 55

12. Tabellenverzeichnis:

Tab. 1 Inhaltsstoffe in der Schafmilch (Souci et al. 2008) 11

Tab. 2 Inhaltsstoffe in der Ziegenmilch (Souci et al. 2008) 12

Tab. 3: Gesamtanzahl und Konservierung der untersuchten Proben 31

Tab. 4: Beurteilungskriterien zur Schätzung der Milchzellzahl mittels CMT nach Baumgartner und Wittek 2018 32

Tab. 5: Deskriptive Statistik 39

Tab. 6: Übersicht der Intra-Class-Korrelationskoeffizienten 50

Tab. 7: Ergebnistabelle der Präzisionsmessung mit dem DCC® 53

Tab. 8: Ergebnisse der Präzisionsmessung mit dem HrimaPro SCC® 53