

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhaltung  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Betreuer: Prof. Dr. E. Schallenberger

Eingereicht über die Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß-  
und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

---

**EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE IGF-1-KONZENTRATIONEN IN  
VIERTELANFANGSGEMELKSPROBEN VON KÜHEN MIT  
UNTERSCHIEDLICHER  
EUTERGESUNDHEIT – EINE FELDSTUDIE**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
ULRIKE RUFFER  
Tierärztin aus Erlangen

Gießen 2003

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann  
1. Gutachter: Prof. Dr. E. Schallenberger  
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2003

---

Die Dissertation wurde mit dankenswerter finanzieller Unterstützung  
durch die Stiftung Schleswig-Holsteinische Landschaft angefertigt

Schriftenreihe des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Heft 139

© 2003 Selbstverlag des Instituts für Tierzucht und Tierhaltung  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40, 24098 Kiel

Schriftleitung: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. E. Kalm

ISSN: 0720-4272

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1 Mastitis	2
2.1.1 Definitionen	2
2.1.2 Mastitiserreger	4
2.2 Immunbiologie der Milchdrüse	5
2.2.1 Anatomische Barrieren	6
2.2.2 Zelluläre Abwehr	8
2.2.3 Lösliche Abwehrmechanismen	11
2.3 IGF-1 als Zytokin	17
2.3.1 Definition	17
2.3.2 Struktur und Genlocus des IGF-1	17
2.3.3 Das System der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren	18
2.4 Quantitativer Nachweis von IGF-1 in Milch	20
2.5 Das IGF-System in der bovinen Milchdrüse und in der Milch	21
2.6 Bovines Somatotropin, IGF-1 und Mastitis	23
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1 Rahmenprojekt	28
3.2 Probengewinnung	28
3.2.1 Ausgewählte Betriebe	28
3.2.2 Probennahmeregime und Milchprobenaufbereitung	30
3.2.3 Probenauswahl für die IGF-1-Bestimmung	31
3.3 IGF-1-Radioimmuntest	32
3.3.1 Prinzip des RIA	32

	Seite
3.3.2 Reagentien und Lösungen	32
3.3.3 Ablauf des IGF-1-RIA	34
3.3.4 Testvalidierung	36
3.4 Materialien und Geräte	42
3.4.1 Laborgeräte	42
3.4.2 Materialien	42
3.5 Statistische Auswertungen	43
3.5.1 Datenstruktur	43
3.5.2 Definitionen in den statistischen Modellen	45
3.5.3 Statistische Modelle	48
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1 Physiologische Einflußfaktoren auf die IGF-1-Konzentrationen in der Milch	54
4.1.1 Rasse	54
4.1.2 Euterviertel	55
4.1.3 Laktationsnummer und Laktationsabschnitt	57
4.1.4 Milchleistung	61
4.1.5 Trächtigkeit	62
4.1.6 Physiologische Zellzahl	66
4.2 Pathologische Einflußfaktoren auf die IGF-1-Konzentrationen in der Milch	67
4.2.1 Gesundheitsgruppe Euterviertel	67
4.2.2 Bakteriologischer Befund	69
4.2.3 Pathologische Zellzahl	73
4.2.4 Erkrankungen der Nachbarviertel	75
4.3 Korrelationen	77
<b>5 Diskussion</b>	<b>78</b>
5.1 IGF-1-Konzentrationen in Milch	78
5.2 Einflüsse auf die IGF-1-Mittelwerte	79
5.2.1 Rasse	79
5.2.2 Euterviertel	80
5.2.3 Laktationsnummer und Laktationsabschnitt	81

	Seite
5.2.4 Milchleistung	82
5.2.5 Trächtigkeit	83
5.2.6 Zellzahl	85
5.2.7 Gesundheitsgruppe	86
5.2.8 Bakteriologischer Befund	87
5.2.9 Erkrankungen der Nachbarviertel	88
5.3 Schlußfolgerung	90
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>7 Summary</b>	<b>93</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>115</b>

**Abbildungsverzeichnis**

	Seite
Abbildung 2.1: Vereinfachtes Schema der hypothetischen Kaskade zytokininduzierter Vorgänge bei der Auswanderung somatischer Zellen in die Milch (modifiziert nach Kehrlı und Shuster, 1994).	16
Abbildung 2.2: Vergleich der Sequenzen von IGF-1 unterschiedlicher Spezies modifiziert nach GroPep, 2001)	18
Abbildung 3.1: Verlauf der Magermilchverdünnungsreihe	38
Abbildung 3.2: Errechnete IGF-1-Konzentration in Magermilch bei zunehmender Probenverdünnung (gemessene Konzentration x VF, ohne Korrektur des IGF-2-Störeinflusses)	39
Abbildung 3.3: Korrigierte IGF-1-Konzentration in Magermilch bei zunehmender Probenverdünnung (gemessene Konzentration x VF, korrigiert auf den Störeinfluß des IGF-2 )	40
Abbildung 3.4: Wiederfindung von IGF-1 in Puffer A (▲) und in Puffer A mit Borsäurezugabe (■), Arbeitsbereich der Standardkurve	41
Abbildung 3.5: Relative Häufigkeit der in der Magermilch von Viertelanfängsgemelksproben gemessenen IGF-1-Konzentrationen (n = 5728)	43
Abbildung 3.6: Relative Häufigkeit der dekadischen Logarithmen der in der Magermilch von Viertelanfängsgemelksproben von 571 Kühen gemessenen IGF-1-Konzentrationen (log [c (IGF-1)], n = 5728)	44
Abbildung 3.7: Residuenplot des Grundmodells	49
Abbildung 4.1: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen (log [c (IGF-1)]) sowie der Linear Somatic Cell Scores (LSCS) der einzelnen Euterviertel Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>AB</sup> p < 0,001, <sup>cd</sup> p < 0,01)	56
Abbildung 4.2: Verlauf der IGF-1-Konzentration in Magermilchproben (arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler in Viertelgemelksproben der eutergesunden Kühe, Gesundheitsgruppe I) in Abhängigkeit von der Laktationswoche (n = 1288)	58
Abbildung 4.3: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) aus den drei Laktationsabschnitten von Kühen mit unterschiedlichen Laktationsnummern F-Test: p < 0,0001 LNR: Laktationsnummer, L-Tag: Laktationstag, LNR 3: Laktationsnummern 3 und größer	60
Abbildung 4.4: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) von Kühen in drei Leistungsklassen Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>AB</sup> p < 0,001)	61

	Seite
Abbildung 4.5: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 3788) von Kühen in verschiedenen Trächtigkeitsabschnitten Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant mit Ausnahme <sup>A2B</sup> n.s. ( <sup>A1C</sup> p < 0,01, <sup>ABCD</sup> p < 0,001)	63
Abbildung 4.6: Vergleichende Darstellung der Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 3788) von nicht tragenden und tragenden Kühen, aufgegliedert nach Laktationsabschnitten (LAB, LAB 1: Laktationstag 5 – 80, LAB 2: Tag 81 – 240, LAB 3: ≥ Tag 241) F-Test: p < 0,0001 Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>ab</sup> p < 0,01, <sup>CD</sup> p < 0,001)	64
Abbildung 4.7: Vergleichende Darstellung der Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 3788) von Kühen in verschiedenen Trächtigkeitsstadien, aufgegliedert nach Laktationsabschnitten (LAB, LAB 1: Laktationstag 5 – 80, LAB 2: Tag 81 – 240, LAB 3: ≥ Tag 241) F-Test: p < 0,0001	65
Abbildung 4.8: Abhängigkeit der dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen vom Linear Somatic Cell Score der Magermilchprobe (bis einschl. LSCS = 3, n = 3242)	66
Abbildung 4.9: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelgemelksproben der vier Gesundheitsgruppen (I: SCC < 100 000/ml, kein Keim, II: SCC > 100 000/ml, kein Keim, III: SCC > 100 000/ml, Keimnachweis, IV: SCC < 100 000/ml, Keimnachweis, n = 5040) Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>AB</sup> p < 0,001)	68
Abbildung 4.10: Altersstruktur der Gruppen „Kühe ohne Erregerausscheidung“ (n = 577) und „Kühe mit Erregerausscheidung“ (n = 683; LNR = Laktationsnummer, LNR 3: Laktationsnummern 3 und größer)	71
Abbildung 4.11: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) in Abhängigkeit vom Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>ab</sup> p < 0,01)	72
Abbildung 4.12: Abhängigkeit der dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen vom Linear Somatic Cell Score der Magermilchprobe (n = 5040)	73
Abbildung 4.13: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelgemelksproben mit unterschiedlichen Zellzahlen (n = 5040) Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>ABCDEF</sup> p < 0,001)	74

	Seite
Abbildung 4.14: Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelgemelksproben mit normaler Sekretion (n = 2736), deren Nachbarviertel unterschiedliche Befunde aufwiesen. Die Befunde der Nachbarviertel sind auf der x-Achse aufgetragen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>ab</sup> p < 0,05)	76
Abbildung 9.1: Stabilität von IGF-1- in Milchproben mit und ohne Konservierungsmittel bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen.	115
Abbildung 9.2: Kuh „Ubel“, rechtes Vorderviertel (VR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probennahmen)	117
Abbildung 9.3: Kuh „Ubel“, linkes Vorderviertel (VL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probennahmen)	117
Abbildung 9.4: Kuh „Ubel“, rechtes Hinterviertel (HR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probennahmen)	118
Abbildung 9.5: Kuh „Ubel“, linkes Hinterviertel (HL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probennahmen)	118
Abbildung 9.6: Kuh „Tina“, rechtes Vorderviertel (VR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)	120
Abbildung 9.7: Kuh „Tina“, linkes Vorderviertel (VL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)	120
Abbildung 9.8: Kuh „Tina“, rechtes Hinterviertel (HR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)	121
Abbildung 9.9: Kuh „Tina“, linkes Hinterviertel (HL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)	121

**Tabellenverzeichnis**

	Seite
Tabelle 2.1: Beurteilung zytologisch-mikrobieller Befunde in Viertelanfangsgemelksproben im Rahmen der Mastitisdiagnostik (nach Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1994)	4
Tabelle 3.1: Betriebe, deren Kühe zur Probengewinnung herangezogen wurden: Herdengröße und -leistung (in den Jahren 1997 und 1998), Rassenverteilung, Anzahl der gezogenen Viertelanfangsgemelksproben, Anzahl der beprobten Tiere sowie Anzahl Probennahmen pro Kuh	29
Tabelle 3.2: Einteilungskriterien für die Zuordnung einer Kuh zu einer der vier Gesundheitsgruppen (Gesundheitsgruppe Kuh)	31
Tabelle 3.3: Pipettierschema für den radioimmunologischen Nachweis von IGF-1 in Magermilch	35
Tabelle 3.4: Reproduzierbarkeit des RIA beim Nachweis von IGF-1 in Magermilch	36
Tabelle 3.5: Wiederfindung definierter IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben	37
Tabelle 3.6: Einteilung der Zellzahlklassen	46
Tabelle 3.7: Verwendete Modelle, fixe Effekte mit Effektstufen sowie die jeweilige Datengrundlage	50
Tabelle 4.1: Verteilung aller beprobten Kühe und der Viertelgemelksproben auf die vier Gesundheitsgruppen (SCC = somatic cell count)	52
Tabelle 4.2: Im F-Test ermittelte Signifikanzen der fixen Effekte	53
Tabelle 4.3: Absolute Häufigkeit und prozentuale Verteilung der statistisch ausgewerteten Kühe (n = 498) und Viertelgemelksproben (n = 5040) auf die verschiedenen Rassen	54
Tabelle 4.4: Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelanfangsgemelksproben aus unterschiedlichen Eutervierteln (n = 5040) sowie die Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>ab</sup> p < 0,05)	55
Tabelle 4.5: Absolute Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Viertelanfangsgemelksproben (n = 5040) auf Laktationsnummer und -abschnitt der beprobten Kühe	57
Tabelle 4.6: Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) aus unterschiedlichen Laktationen sowie Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>cd</sup> p < 0,01, <sup>AB</sup> p < 0,001)	58

	Seite
Tabelle 4.7: Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) aus unterschiedlichen Laktationsabschnitten sowie die Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>AB</sup> p < 0,001, <sup>cd</sup> p < 0,01).	59
Tabelle 4.8: Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben von Kühen in unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien (n = 2472) im Vergleich zu Proben nicht trächtiger Kühe (n = 1316) sowie Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>cd</sup> p < 0,01, <sup>AB, A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub></sup> p < 0,001)	62
Tabelle 4.9: Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 3242) mit unterschiedlichen somatischen Zellzahlen (SCC) sowie die Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in den unterschiedlichen Zellzahlklassen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( <sup>AB</sup> p < 0,001).	67
Tabelle 4.10: Verteilung der statistisch ausgewerteten Viertelgemelksproben (n = 5040) über die vier Gesundheitsgruppen	68
Tabelle 4.11: Häufigkeit von Keimbefunden im statistisch ausgewerteten Probenmaterial	70
Tabelle 4.12: Verteilung der erregerpositiven Viertelanfängsgemelksproben (VGP) über die einzelnen Euterviertel	70
Tabelle 4.13: Verteilung der statistisch ausgewerteten Kühe (n = 1260) über die vier Gesundheitsgruppen	75
Tabelle 4.14: Korrelationen zwischen den dekadisch logarithmierten IGF-1-Konzentrationen (log [c (IGF-1)]), dem Linear Somatic Cell Score (LSCS) und dem Vorliegen bzw. Fehlen eines Erregernachweises (Befund j/n) in der jeweiligen VGP (n = 5040)	77

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMV	automatisches Melkverfahren
B <sub>0</sub>	Leerwert
bidest.	bidestillata
bST	bovines Somatotropin
BU	bakteriologische Untersuchung
bzw.	beziehungsweise
c	concentration
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
cpm	counts per minute
CSF	colony stimulating factor
dpc	days post coitum
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
et al.	et alii
etc.	et cetera
<i>g</i>	Gravitationskonstante
g	Gramm
GA	Gesamtaktivität
GH	growth hormone
h	Stunde
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IGFBP-rP	insulin-like growth factor binding protein related protein
IL	Interleukin
ITL	Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität der Landwirtschafts- kammer Schleswig-Holstein
j/n	ja/nein
kg	Kilogramm

l	Liter
LKV	Landeskontrollverband
log	logarithmiert
LSCS	Linear Somatic Cell Score
LSM	Least-Square-Mittelwerte
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl
NAGase	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase
ng	Nanogramm
n. s.	nicht signifikant
NSAIDs	non-steroidal antiinflammatory drugs
NSB	nichtspezifische Bindung
PEG	Polyethylenglycol
PMNG	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
ppb	parts per billion
R	Rezeptor
rbST	rekombinantes bovines Somatotropin
RIA	Radioimmunoassay
s.	siehe
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>
SCC	somatic cell count
SE	Standardfehler
spp.	Species
TNF	tumor nekrosis factor
TU	Untersuchung auf Trächtigkeit
VF	Verdünnungsfaktor

VGP	Viertelanfangsgemelksprobe
VIT	Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung
WF	Wiederfindung
w. V.	wissenschaftliche Vereinigung
w/v	weight/volume
°C	Grad Celsius

## 1 Einleitung

Wegen Eutererkrankungen und Fruchtbarkeitsproblemen mußten in Schleswig-Holstein im Kontrolljahr 2001 40,5 % der Kühe aus den Milchviehherden ausscheiden (LKV, 2002). Mastitiden sind die wirtschaftlich bedeutendsten Erkrankungen der Milchkühe. Vor diesem Hintergrund ist die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten, die aus Gründen des Verbraucherschutzes im Hinblick auf die Resistenzbildungsproblematik möglichst ohne Antibiotikaeinsatz auskommen sollten, notwendig.

Dafür ist eine genaue Kenntnis der Entzündungsabläufe und deren Regulierung nötig, um Fehler durch vorschnelles Eingreifen in diese Mechanismen zu vermeiden. Einseitige Zuchtselektion auf Leichtmelkigkeit hat beispielsweise zu Kühen geführt, die aufgrund zu weiter Strichkanäle besonders anfällig für Mastitiden sind (Lacy-Hulbert und Hillerton, 1995). Die Zucht auf möglichst niedrige Zellzahlen birgt die Gefahr in sich, daß Kühe bevorzugt werden, die möglicherweise aufgrund mangelnder Immunkompetenz niedrige Zellzahlen aufweisen und deshalb besonders krankheitsanfällig sind (Dekkers et al., 1994).

An der Regulation der Entzündungsabläufe sind neben anderen Mediatoren auch Zytokine beteiligt. Über das Zytokin „insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1)“ sind in den letzten Jahren viele Untersuchungen durchgeführt worden, deren Ergebnisse aber wegen unterschiedlicher verwendeter Nachweisverfahren kaum vergleichbar und wegen der zumeist geringen Tierzahlen statistisch nur schwierig abzusichern waren. Darüber hinaus kamen die Untersuchungen zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, statistisch abgesicherte Aussagen über die Einflussfaktoren auf die IGF-1-Konzentration in der Milch machen zu können. Dafür wurden mit einer validierten Meßmethode (Radioimmuntest mit funktioneller Entstörung der IGF-Bindungsproteine) Milchproben von eutergesunden und mastitiskranken Kühen aus verschiedenen Betrieben untersucht. Mit diesen Ergebnissen sollten auch Aussagen zu Funktion und eventuell Herkunft des IGF-1 in der Milch, aber auch eine Bewertung des diagnostischen und prognostischen Nutzens dieses Zytokins möglich sein.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Mastitis**

Der Begriff „Mastitis“ bezeichnet Entzündungen der Milchdrüse. Diese Entzündungsreaktion wird in der Regel durch eine intramammäre Infektion verursacht, die meistens bakteriellen Ursprungs ist (Cullor und Tyler, 1996). Seltener sind Infektionen mit Mykoplasmen, Hefen, Pilzen oder Algen. Prädisponierend für eine intramammäre Infektion wirken zum einen mechanische, thermische oder chemische Insulte der Milchdrüse sowie suboptimale Fütterung und Haltung der Kühe. Mastitiden sind somit multifaktorielle Infektionskrankheiten, an deren Entstehung die drei Biosysteme Wirt, Erreger und Umwelt beteiligt sind (Tolle et al., 1977). Mastitis gilt als die kostspieligste Erkrankung der Milchkuh. Die Kosten für den Landwirt summieren sich aus der verminderten Milchleistung der Kühe in Verbindung mit geringerer Vergütung der Milch infolge zu hoher Milchzellgehalte. Darüber hinaus sind Milchfett- und Milchproteingehalte geringer, wegen Medikamenteneinsatz muß Milch verworfen werden und Tierarzt- und Laborkosten fallen an. Auch das vorzeitige Merzen von Kühen mit unheilbar geschädigten Eutern und Todesfälle infolge akuter Mastitiden sind zu den entstehenden materiellen Verlusten für den Landwirt zu zählen (Hurley, 2000).

#### **2.1.1 Definitionen**

Die Eutergesundheit wird entsprechend den Definitionen der International Dairy Federation (1987) wie folgt kategorisiert:

##### **Normale Sekretion**

Gesunde Euterviertel sind solche, die keine äußerlichen pathologischen Veränderungen zeigen und deren Milch keine pathogenen Mikroorganismen und einen normalen Zellgehalt aufweist.

### **Latente Infektion**

Eine latente Infektion liegt vor, wenn sich die Zellzahl in der Norm bewegt, jedoch Mastitiserreger nachgewiesen werden.

### **Unspezifische Mastitis**

Werden keine Infektionserreger nachgewiesen und liegen subklinische oder klinische Symptome vor, so spricht man von unspezifischer Mastitis.

### **Mastitis**

#### Subklinische Mastitis

Subklinische Mastitiden sind Entzündungen des Euters ohne äußerlich erkennbare Symptome. Der Zellgehalt der Milch ist jedoch erhöht. Bei zwei von drei bakteriologischen Untersuchungen (Probennahmeintervall eine Woche) können Mastitiserreger nachgewiesen werden und die chemische Zusammensetzung der Milch ist verändert.

#### Klinische Mastitis

##### *Akute Mastitis*

Eine akute Mastitis besteht bei offensichtlichen Entzündungssymptomen des Euters wie erhöhter Temperatur, Schmerzen und Schwellung. Die Milch ist makroskopisch verändert, die Tiere haben häufig Fieber. Erreger akuter Mastitiden sind u. a. *S. aureus*, *Sc. uberis*, *Sc. agalactiae* und koliforme Keime (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) (Grunert et al., 1996; Wendt et al., 1998).

##### *Subakute Mastitis*

Eine subakute Mastitis liegt vor beim Auftreten von Flocken in der Milch, insbesondere im Vorgemelk, wobei keine zusätzlichen klinischen Symptome am Euter auftreten. Als Erreger sind hier häufig Strepto- und Staphylokokken zu finden (Grunert et al., 1996; Wendt et al., 1998).

#### Chronische Mastitis

Eine chronische Mastitis ist durch zunehmende Proliferation von fibrösem Gewebe charakterisiert und kann klinisch oder subklinisch verlaufen. Häufig liegt ein längerfristiges Nichtansprechen auf therapeutische Maßnahmen vor. Betroffene Euterviertel können atrophieren oder zeitlebens anormale klinische Befunde aufweisen.

Der Modalwert der Anzahl der in der Milch gesunder Euterviertel nachweisbaren somatischen Zellen liegt zwischen 23.000 bis 50.000 Zellen pro ml Milch (Doggweiler und Hess, 1983). Die Schwankung ist begründet in rasseabhängigen und laktationsphysiologischen Einflüssen. Bereits ab einer Zellzahl von 100.000/ml Milch geht die normale zelluläre Abwehr in eine entzündliche Reaktion über (Reichmuth, 1975). Zur Beurteilung zytologisch-mikrobieller Befunde in Viertelanfangsgemelksproben wurden von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) 1994 folgende Definitionen herausgegeben (Tabelle 2.1):

**Tabelle 2.1:** Beurteilung zytologisch-mikrobieller Befunde in Viertelanfangsgemelksproben im Rahmen der Mastitisdiagnostik (nach Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1994)

Zellzahl pro ml Milch	Euterpathogene Mikroorganismen nicht nachgewiesen	Euterpathogene Mikroorganismen nachgewiesen
< 100.000	normale Sekretion	latente Infektion
> 100.000	unspezifische Mastitis	Mastitis

### 2.1.2 Mastitiserreger

Als sinnvoll und praxisrelevant hat sich die Einteilung der Mastitiserreger nach deren Übertragungsmodi erwiesen.

Zu den kontagiösen Mastitiserregern zählen die „klassischen“ Mastitiserreger *Streptococcus (Sc.) agalactiae*, *Staphylococcus (S.) aureus* und *Sc. dysgalactiae* (Grunert et al., 1996). Hierzu gehören auch die Mykoplasmen (Hurley, 2000). Die Zuordnung von *Sc. dysgalactiae* ist nicht eindeutig, da dieser Erreger in unterschiedlichen Herden sowohl umweltassoziierte als auch kontagiöse Mastitiden hervorrufen kann (Erskine et al., 1988; Smith und Hogan, 1995). Das Hauptreservoir der kontagiösen Mastitiserreger ist die infizierte Milchdrüse, die Infektion weiterer Tiere erfolgt hauptsächlich während des Melkens (Grunert et al., 1996), entweder durch fehlerhafte Melktechnik oder mangelhafte Melkhygiene. Diese Erreger verursachen meist chronische oder subklinische Mastitiden (Hurley, 2000). Betroffene Herden fallen vor allem durch hohe Tankmilchzellzahlen auf (Grunert et al., 1996).

Koliforme Keime (unter anderen *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.), Enterokokken, *Sc. uberis* sowie *Pseudomonas* spp., Prototheken und Hefen, zum Teil auch *Sc.*

*dysgalactiae*, werden zu den umweltassoziierten Mastitiserregern gerechnet (Hurley, 2000). Diese Saprophyten sind immer in der Umwelt der Tiere zu finden, sie leben auf der Euterhaut, dem Haarkleid, in der Einstreu, im Kot sowie auf Boden und Wänden von Ställen und Melkständen. Sie entfalten erst dann pathogene Wirkungen, wenn durch prädisponierende Faktoren die Abwehrkraft des Gesamtorganismus und der Milchdrüse geschwächt oder der Keimdruck in der Umgebung zu hoch wird. Die Infektion der Tiere erfolgt hier in der Zeit zwischen den Melkungen, allerdings können auch durch Fehler in der Melktechnik Keime zum Beispiel von der Zitzenhaut in den Strichkanal transportiert werden und von dort weiter vordringen. In Herden mit Problemen durch umweltassoziierte Mastitiserreger fallen weniger erhöhte Tankmilchzellzahlen auf als vielmehr häufige klinische Mastitiden (Grunert et al., 1996).

### **2.2 Immunbiologie der Milchdrüse**

Die Milchdrüse des Rindes partizipiert über die Blut- und Lymphgefäße am Immunsystem des Gesamtorganismus. Darüber hinaus ist sie durch lokale Abwehrmechanismen gegen das Eindringen von Krankheitserregern geschützt. Diese lokalen Mechanismen umfassen die Zitzenbarriere, die Blut-Euter-Schranke, zelluläre Abwehrmechanismen und die physikalisch-chemischen Einflüsse gelöster Milchinhaltsstoffe neben den Bestandteilen des humoralen Abwehrsystems in der Milch (Wendt, 1992).

Durch das Zusammenspiel von systemischen und lokalen Abwehrmechanismen soll das Eindringen von Krankheitserregern, eventuell von ihnen gebildeter Toxine und anderer Noxen verhindert und die Milchdrüse so vor Schädigung bewahrt werden. Sind dennoch Erreger in die Milchdrüse und dort in das Epithel der milchführenden oder milchbildenden Systeme vorgedrungen, so werden die Abwehrzellen im Bindegewebe aktiviert. Humorale (zum Beispiel Immunglobuline) und zelluläre Abwehrfaktoren (zum Beispiel Mikro- und Makrophagen) aus dem Abwehrsystem des Gesamtorganismus treten über die Blut- und Lymphbahnen in die Milchdrüse über, um hier gegen die Krankheitserreger wirksam zu werden (Mielke, 1994).

### 2.2.1 Anatomische Barrieren

Eine Mastitis kann entstehen, nachdem Bakterien durch den Zitzenkanal in die Milchdrüse vorgedrungen sind und sich dort vermehren. Die erste mechanische Barriere gegen das Eindringen von Keimen bildet der durch einen Schließmuskel mehr oder weniger eng verschlossene Strichkanal (Cullor und Tyler, 1996). Die Form der Zitzenkuppe, möglichst mit spitzem oder abgerundetem Ende und flacher, nicht trichterförmig eingezogener Strichkanalöffnung, wirkt hierbei unterstützend (Hurley, 2000). Zuchtselektion alleine auf Leichtmelkigkeit führt zur Selektion auf Kühe, die wegen ungenügend geschlossener Strichkanäle besonders anfällig für Mastitiden sind (Mielke, 1994).

Das nach außen gerichtete Wachstum des Zitzenkanalepithels wirkt, genau wie der zu den Melkzeiten einsetzende Spüleffekt der Milch, dem Vordringen von Keimen entgegen. Der sich im Zitzenkanal zwischen den Melkzeiten bildende Keratinpfropf aus abgeschilferten Epithelzellen, Fettsäuren und kationischen Proteinen, der auch als Lactosebum bezeichnet wird (Wendt, 1992), hat sowohl physikalische als auch chemische Abwehrwirkung. Die kationischen Proteine binden elektrostatisch an eingedrungene Mastitiserreger. Die resultierenden Veränderungen in den Zellwänden bewirken eine erhöhte Empfindlichkeit der Keime gegenüber osmotischem Druck; Lysis und Tod der Erregerzelle sind die Folgen (Sordillo et al., 1997). Der Lactosebum kann bis zu  $10^6$  Bakterien adsorbieren, die beim nächsten Melken mit den ersten Milchstrahlen wieder ausgespült werden. Die in ihm enthaltenen Fettsäuren wirken bakteriostatisch, zum Teil auch bakterizid. Es konnte gezeigt werden, daß Kühe mit größeren Anteilen der gesättigten Fettsäuren Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure im Lactosebum widerstandsfähiger gegen eindringende Keime sind als Kühe mit größeren Mengen der gesättigten Fettsäure Stearinsäure und den ungesättigten Fettsäuren Olein- und Linolsäure. Dieses Fettsäuremuster wird vererbt (Hurley, 2000). Andere Autoren allerdings weisen darauf hin, daß die in vivo vorliegenden Konzentrationen der Fettsäuren sowohl während der Laktation als auch in der Trockenstehphase nur bedingt ausreichen, um zum Beispiel *S. aureus* zu inhibieren und die Lipide somit nur eine begrenzte Bedeutung für die Abwehrmöglichkeiten des Euters gegen Mastitiserreger besitzen (Senft und Neudecker, 1991).

Der Strichkanal selbst ist nicht keimfrei, sondern besiedelt von in der Regel apathogenen Kommensalen, unter anderem koagulase-negativen Staphylokokken und *Corynebacterium*

*bovis*. Ihnen wird eine Schutzwirkung gegenüber dem Vordringen von *S. aureus* zugesprochen. Die von ihnen bewirkte Erhöhung der somatischen Zellzahl ist jedoch nicht ausgeprägt genug, um auch Schutz vor umweltassoziierten Mastitiserregern zu bieten (Cullor und Tyler, 1996). Eine zu starke und dauernde Erhöhung der Zellzahl ist zudem wegen der Anforderungen der Milchgüteverordnung problematisch.

Am Übergang zwischen Zitzenkanal und Zitzenzisterne fältelt sich die Schleimhaut zur Fürstenbergschen Rosette. Die durch die Fältelung entstehende Oberflächenvergrößerung dient zum einen als mechanische Barriere gegen vordringende Keime, daneben bietet sie auch eine größere Ausgangsbasis für Lymphozyten, die das Gewebe infiltrieren und die immunzelluläre Abwehr in Gang setzen können (Mielke, 1994). Auf der Schleimhaut sind neben Ubiquitin auch die im Lactosebum vorkommenden kationischen Proteine zu finden (Sordillo et al., 1997).

Die Bedeutung der lokalen Abwehrmechanismen der Zitze wiesen Zeconi et al. (2000) nach. Sie dokumentierten die Veränderungen des Zitzengewebes nach dem Melken, quantifiziert anhand der Dickenzunahme der Zitzen. Verbunden mit der Zunahme der Zitzendicke waren Störungen der lokalen Abwehrmechanismen. Das Infektionsrisiko für die Milchdrüse stieg dabei umso deutlicher, je stärker die gemessenen Zunahmen der Zitzendicke waren.

Die Blut-Euter-Schranke wird durch das Endothel der Blutgefäße, das intralobuläre Bindegewebe und das Epithel des milchbildenden und -ableitenden Hohlraumsystems gebildet. Schlußeisten und Desmosomen schaffen einen geschlossenen Zellverband, der allerdings auch im gesunden Euter einen gewissen Zelldurchtritt sowohl ins intralobuläre Bindegewebe als auch in die Milch gestattet. Die Schranke wirkt somit als molekularer Filter, der den Durchtritt von Arzneimitteln, Antikörpern und Stoffwechselprodukten, aber auch von Zellen reguliert (Wendt, 1992). Milchzisterne und Milchgänge sind mit einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet. Erst intensive Irritationen bewirken eine Lockerung dieser Epithelien und ermöglichen damit einen gesteigerten Übertritt von Blutzellen in die Milch als Merkmal der beginnenden Entzündung. Gleichzeitig kommt es zum Sistieren der Milchsekretion (Mielke, 1994).

### 2.2.2 Zelluläre Abwehr

Die Gesamtzahl der somatischen, also der körpereigenen Zellen in der Milch liegt bei gesunden Eutern oft unter 100.000 Zellen/ml. Diese Zellen sind in der Hauptsache polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten (PMNG), auch Mikrophagen genannt, Makrophagen, Lymphozyten und, zu einem kleinen Prozentsatz, Epithelzellen. Kommt es zu einer intramammären Infektion, kann die Zellzahl binnen weniger Stunden auf weit über 1.000.000/ml ansteigen. Manche Bakterien geben Enterotoxine oder Zellwandkomponenten ab, die als Chemoattraktant für die Leukozyten wirken (Sordillo et al., 1997).

Eine schnelle Leukozyteneinwanderung ins Euter sowie die bakterizide Aktivität der Zellen ist für Schwere und Dauer einer Mastitis von großer Bedeutung. Steigt die Zellzahl (SCC) schnell an und gelingt die Eliminierung der Keime, so geht der SCC rasch auf Normalwerte zurück. Werden die Bakterien jedoch nicht vollständig eliminiert, so kommt es zur längeren Migration der Zellen zwischen den sekretorischen Zellen hindurch zum Alveolarlumen. Die längerdauernde Diapedese führt zu Parenchymschäden, die Milchleistung sinkt. Dauer und Stärke der Entzündungsreaktionen haben somit großen Einfluß auf Menge und Qualität der produzierten Milch (Sordillo et al., 1997).

PMNG machen in reifer Milch aus gesunden Eutervierteln 12–61 % der somatischen Zellzahl aus (Mielke, 1994). In der frühen Entzündungsphase können sie bis über 90 % der Leukozytenzahl darstellen. Sie werden von Zytokinen, Komplementfaktoren und Prostaglandinen zum Übertritt aus dem Blut ins Euter veranlaßt und phagozytieren und töten die eingedrungenen Bakterien mittels sauerstoffabhängiger und -unabhängiger Mechanismen (Sordillo et al., 1997). Neben dieser unspezifischen Abwehrleistung sind sie eine Quelle für  $\beta$ -Defensine (Selsted et al., 1993).

Makrophagen liegen in reifer Milch bis zu einem Anteil von 17 % des SCC vor. Auch sie sind zu unspezifischer Phagozytose befähigt, jedoch kann ihre Phagozytoseleistung durch Immunglobuline, opsonierende Antikörper für spezifische Pathogene, gesteigert werden. Sie sind am Makrophagensystem beteiligt (Mielke, 1994) und zur Antigenpräsentierung fähig. Bakterienantigene von phagozytierten Keimen werden von ihnen neben Klasse-II-Antikörpern des „major histocompatibility complex“ (MHC) auf der Zellmembran präsentiert

(Sordillo et al., 1997). Sie sind also sowohl an der unspezifischen als auch an der spezifischen Abwehr beteiligt. Milchkarnphagen können die Proliferation von T-Zellen initiieren. Nach Kontakt mit *S. aureus* verändern sie die Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen und die Interleukin-1-Produktion, wodurch die T-Zellen zur Vermehrung angeregt werden. Allerdings ist deren Stimulation durch die Milchkarnphagen dreimal geringer als durch Blutmonozyten, was auch in weniger MHC-Klasse-II-Molekülen und geringeren IL-1-Mengen zum Ausdruck kommt (Politis et al., 1992).

Die spezifische zelluläre Immunität wird vermittelt von antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten als den einzigen Zellen, die mittels spezifischer Membranrezeptoren Antigene erkennen können (Sordillo et al., 1997). Lymphozyten aus dem Blut haben einen Anteil von 4–31 % des SCC in reifer Milch (Mielke, 1994). Sie unterteilen sich in T- und B-Lymphozyten sowie Null-Zellen.

Die T-Lymphozyten untergliedern sich in zwei Hauptgruppen,  $\alpha\beta$ -T-Zellen sowie  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Ihre prozentualen Anteile an der Gesamtlymphozytenzahl im Euter variieren je nach Laktationsabschnitt und Gewebe (Sordillo et al., 1997). Die  $\alpha\beta$ -T-Zellen umfassen die CD4+- oder T-Helferzellen sowie die CD8+- oder T-Suppressorzellen. CD4+-Zellen erkennen den von B-Lymphozyten und Makrophagen präsentierten Komplex aus Bakterienantigenen und MHC-Antikörpern. Sie produzieren und sezernieren Zytokine, die ihrerseits B- und T-Zellen sowie Makrophagen aktivieren. CD8+-Zellen enthalten abhängig vom Laktationsabschnitt mehr Interleukin-(IL)-4-mRNA oder Interferon-(IFN)- $\gamma$ -mRNA. Im postpartalen Zeitraum sind mehr Zellen mit IL4-mRNA vorhanden, die vor allem eine die Immunantwort regulierende bzw. unterdrückende Funktion ausüben. Die in der Laktationsmitte verstärkt vorhandenen Zellen mit IFN- $\gamma$ -mRNA sind zytotoxisch. Sie erkennen alte Körperzellen anhand ihres Antigen-MHC-Klasse-I-Antikörperkomplexes und töten diese ab. Das Verhältnis zwischen CD4+- und CD8+-Zellen im gesunden Euter ist gegensätzlich zu dem im Blut, die Suppressorzellen überwiegen in der Milch. Diese Tatsache wird für die schlechtere Reaktivität der Milchleukozyten verantwortlich gemacht. Die Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Sie schützen Epitheloberflächen und sind verantwortlich für den Abbau alter und eventuell veränderter Zellen. In der Milch liegen sie in höherer Zahl vor als im Blut. In Zeiten größerer Anfälligkeit des Euters ist ihr prozentualer Anteil im Parenchym vermindert (Sordillo et al., 1997).

Die großen granulierten Null-Zellen sind nichtimmunogene Lymphozyten. Fehlen MHC-Antikörper, wirken sie zytotoxisch. Über die Fc-Rezeptoren können sie jedoch auch an der

antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität partizipieren. Sie töten ihre Zielzellen mit dem in ihren Granula enthaltenen Perforin sowie mittels des Tumornekrosefaktors-(TNF)- $\alpha$  eingeleiteter Apoptose. Ihr extrazellulärer Tötungsmechanismus ist sowohl bei gram-positiven wie gram-negativen Keimen wirksam (Garcia-Peñarrubia et al., 1989). Über die Ausschüttung von Interleukin 2 aktivieren sie sowohl sich selbst als auch andere lymphoide Zellen. Damit steigt die Fähigkeit des Euters, sich gegen *S.-aureus*-Infektionen zur Wehr zu setzen (Sordillo et al., 1991).

B-Lymphozyten sind verantwortlich für die Antikörperproduktion. Sie präsentieren den T-Zellen Bakterienantigene und MHC-Klasse-II-Antikörper, die daraufhin IL2 sezernieren, was die Differenzierung der B-Zellen zu Plasma- oder Gedächtniszellen fördert. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Lymphozyten bleibt über die Laktation recht konstant zwischen 3–20 % (Mielke, 1994).

### **Unspezifische zelluläre Abwehr: Phagozytose**

Phagozytose, die aktive Aufnahme von Partikeln und Mikroorganismen in das Innere einer Zelle und ihre Verstoffwechslung, ist ein unspezifischer zellulärer Abwehrmechanismus. In der Milchdrüse sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen zur Phagozytose befähigt. Ihre Migration ins Eutergewebe stellt die erste immunologische Verteidigungslinie gegen Erreger dar, die die anatomischen Barrieren des Zitzenkanals überwunden haben (Paape und Capuco, 1997). Die Phagozytoseleistung dieser Zellen ist in Milch jedoch deutlich geringer als im Blut und fällt im peripartalen Zeitraum nochmals ab. Die Gründe dafür werden zum einen in der Milieuveränderung vermutet (geringerer Sauerstoffgehalt, geringerer pH-Wert) als auch in einem Mangel an Opsoninen und Energie in der Milch und darin, daß die Phagozytosekapazität der Zellen bereits mit der Aufnahme von Fett und Kasein erschöpft ist (Senft und Neudecker, 1991). Suriyasathaporn et al. (2000) wiesen nach, daß Leukozyten von Kühen, die an Hyperketonämie leiden, geringere Phagozytoseaktivität zeigen als Leukozyten gesunder Individuen. Zusätzlich senkt die Anwesenheit von Ketonkörpern sowohl die Phagozytoseleistung an sich als auch die Abtötungsrate der inkorporierten Partikel. Auch bei gesunden Kühen werden nicht alle inkorporierten Keime abgetötet, vor allem Staphylokokken können intrazellulär überleben. In der Phagozytosezelle sind sie geschützt, werden zum Teil auch in das interstitielle Gewebe transportiert und nach dem Tod der Milchzelle wieder freigesetzt (Hensen et al., 2000). Die Schaffung optimaler Bedingungen für eine möglichst hohe Phagozytose- und vor allem

Abtötungsrate phagozytierter Infektionserreger ist unverzichtbar für eine positive Beeinflussung der Eutergesundheit (Senft und Neudecker, 1991).

### **Spezifische zelluläre Abwehr: Immunglobulinproduktion**

Die Milchdrüse ist in der Lage, eine Antigenstimulation mit der Produktion spezifischer Antikörper zu beantworten. Diese Aufgabe erfüllen die Lymphozyten. Im Eutergewebe liegen lymphoide Follikel und Infiltrate von lymphoiden Zellen in enger Verbindung mit dem Schleimhautepithel. Besonders eng ist dieser Kontakt im Bereich der Zitze. Hier findet der erste Kontakt zwischen eingedrungenen Infektionserregern und Lymphozyten statt, die weitere Immunantwort wird ausgelöst, und die lokal produzierten Antikörper gelangen in die Milch (Senft und Neudecker, 1991).

### **2.2.3 Lösliche Abwehrmechanismen**

Die humoralen Abwehrmechanismen funktionieren im Einklang mit den zellulären Abwehrmechanismen in Milch und Gewebe, die beiden Systeme beeinflussen sich gegenseitig. Auch die löslichen Faktoren können in angeborene, unspezifische und erworbene, spezifische unterteilt werden.

### **Spezifische humorale Abwehrfaktoren**

Immunglobuline werden von durch Antigenkontakt aktivierten und nachfolgend zu Plasmazellen ausdifferenzierten B-Zellen produziert. Sie wirken als lösliche Effektoren der spezifischen humoralen Immunantwort. Die in der Milch vorkommenden Antikörper werden entweder lokal produziert oder durch selektiven Transport aus dem Blut in die Milch überführt. Wichtig für die Abwehr der Milchdrüse sind vier Klassen der Immunglobuline: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM und IgA (Mielke, 1994). Die Konzentrationen der einzelnen Klassen in der Milch variieren abhängig von Laktationsstadium und Infektionsstadium der Milchdrüse. In gesunden Eutern liegen während der Laktation niedrige Konzentrationen vor, die während der Trockenstehperiode ansteigen und während der Kolostrumbildung Höchstwerte erreichen. Hohe Konzentrationen werden aber auch während der Laktation in Milch aus entzündeten Eutern gemessen. Die Konzentrationen sind abhängig von der Durchlässigkeit des

sekretorischen Gewebes und der Zahl der Ig-produzierenden Zellen im Euter. IgG<sub>1</sub> ist der in gesunden Eutern vorliegende Antikörper. Bei einer Entzündung transportieren neutrophile Granulozyten IgG<sub>2</sub> in die Milchdrüse (Sordillo et al., 1997).

IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgM können Bakterien opsonieren und dadurch ihre Phagozytierung fördern. Sie können entweder direkt oder zusammen mit der C3b-Komponente des Komplementsystems an die Keime binden. IgA dagegen ist weder zur Interaktion mit dem Komplementsystem noch zur Opsonierung von Bakterien befähigt. Statt dessen scheint es zur Agglutination der Keime untereinander beizutragen, die Ansiedlung von Bakterien im Gewebe abzuwehren und Toxine zu neutralisieren (Senft und Neudecker, 1991).

### **Unspezifische humorale Abwehrfaktoren**

Das Komplementsystem besteht aus Proteinen, die sowohl im Serum als auch in der Milch vorkommen. Zusammen mit einem spezifischen Antikörper bewirkt es die Lyse der Bakterienzelle. Die höchsten Konzentrationen der Proteine des Komplementsystems werden während der Kolostralphase, in Sekreten entzündeter Euter und während der Euterinvolution gemessen. Während der Laktation sind nur geringe Konzentrationen nachweisbar. Deswegen wird die Rolle des Komplementsystems in der Abwehr des Euters als eher gering eingestuft. Zu den komplementsensitiven Organismen zählen jedoch unter anderem auch einige *E.-coli*-Stämme (Sordillo et al., 1997).

Die im Milchsekret gelösten antimikrobiellen Proteine sind in dreifacher Hinsicht nützlich. Sie helfen der Kuh, sich gegen eingedrungene Mastitiserreger zur Wehr zu setzen und nicht an einer Euterentzündung zu erkranken. Ferner hemmen sie die Vermehrung von Keimen in der bereits ermolkene Milch und machen sie so in gewissem Umfang haltbar. Zum dritten wird ihnen auch ein förderlicher Effekt auf das Immunsystem des Menschen nachgesagt (Hurley, 2000).

Milch von verschiedenen Spezies enthält die gelösten Proteine in unterschiedlichen Mengenverhältnissen. Während in der menschlichen Milch viel Lactoferrin und Lysozym vorhanden ist, aber wenig Lactoperoxidase, ist das Verhältnis beim Rind genau umgekehrt (Mielke, 1994).

### *Lactoperoxidase*

Das Lactoperoxidasesystem besteht aus drei Komponenten, Lactoperoxidase, Thiocyanat und Wasserstoffperoxid. Um die volle Wirksamkeit des Systems zu gewährleisten, müssen diese gleichzeitig in optimalem Verhältnis in der Milch vorhanden sein.

Das eisenhaltige Glykoprotein Lactoperoxidase ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut, die Synthese erfolgt direkt in der Milchdrüse (Mielke, 1994). Identische Enzyme sind in den Sekreten verschiedener exokriner Drüsen vorhanden, zum Beispiel in Speichel und Tränenflüssigkeit sowie in bronchialen, nasalen und intestinalen Sekreten (Hurley, 2000). Im Vergleich zu den anderen gelösten Enzymen in der Milch erreicht es die höchsten Konzentrationen, jedoch schwanken diese relativ stark in Abhängigkeit von Rasse, Jahreszeit, Fütterung und Laktationsabschnitt. In reifer Milch sind durchschnittlich 30 mg Lactoperoxidase pro Liter Milch enthalten (Hurley, 2000), doch können Konzentrationen bis zu 150 mg/l erreicht werden. Dabei sind im Kolostrum nur geringe Mengen nachweisbar. Die Konzentrationen steigen nach den ersten 4–5 Tagen der Laktation an und sind am höchsten in der Trockenstehphase. Lactoperoxidase dient im Lactoperoxidasesystem als Katalysator bei der Bildung von Hypothiocyanat. Thiocyanat stammt aus dem Blut, wo es in 10fach höherer Konzentration vorliegt als in der Milch. Fütterungsabhängig schwanken die in der Milch meßbaren Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mmol/l.

Wasserstoffperoxid, die dritte Komponente des Systems, ist normalerweise in Milch nicht nachweisbar. Selten gelingt es, in frisch ermolkener Milch durchschnittlich 2–4 mg/l zu messen. Wahrscheinlich wird Wasserstoffperoxid ständig produziert, aufgrund seiner starken zelltoxischen Eigenschaften aber sofort wieder abgebaut.

Die Wirkungsweise des Lactoperoxidasesystems besteht in der Generierung von Superoxidradikalen. Das entstehende, kurzlebige Hypothiocyanat wirkt sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid. Es hemmt Bakterien indirekt, einmal durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff, zum anderen durch Superoxid-Radikalbildung unter Beteiligung von NADPH-abhängigen Systemen. Diese beiden starken Oxidationsmittel schädigen SH-haltige Enzyme der Bakterien.

Die Wirkungsweise des Lactoperoxidasesystems ist identisch mit der des Myeloperoxidase-Halogenid-Wasserstoffperoxid-Systems der PMNG. Dieses System ist wirksam bei direktem Leukozyten-Bakterien-Kontakt, wie er bei der Phagozytose hergestellt wird. Das Lactoperoxidasesystem wirkt im gelösten Zustand in der Milch ohne Zellbeteiligung (Mielke, 1994).

### *Lactoferrin*

Beim Lactoferrin handelt es sich um ein stark positiv geladenes, eisenbindendes Glykoprotein, das in Milch, Tränenflüssigkeit, Speichel, Samen und in weißen Blutkörperchen vorkommt. Es wird sowohl von sekretorischen Drüsenepithelzellen als auch von Leukozyten gebildet. Seine Struktur weist große Homologie zu Transferrin auf. Milch unterschiedlicher Arten enthält unterschiedliche Mengen an Lactoferrin und Transferrin. Während humane Milch mit 1–6 mg/ml einen hohen Gehalt an Lacto- bei gleichzeitig geringen Konzentrationen an Transferrin enthält, beträgt die durchschnittliche Konzentration an Lactoferrin in reifer boviner Milch 0,1 mg/ml bei meßbaren Mengen an Transferrin (Baumrucker und Eröndu, 2000). In der Endphase der Trächtigkeit steigen die Konzentrationen auf 1–2 mg/ml, Kolostrum enthält 0,5–1 mg/ml. Die höchsten Konzentrationen werden mit 20–50 mg/ml während der Involutionsphase des Euters gemessen. In der Gegenwart von Bikarbonat bindet Lactoferrin in der Milch vorhandene freie Eisenionen. Die Eisensättigung des Lactoferrins in Milch beträgt 5–30 %.

Die biologische Funktionsweise des Proteins ist noch nicht vollständig geklärt. Mielke (1994) zählt drei Hypothesen auf, zum einen bakteriostatische Wirkung durch die Bindung des freien Eisens, da es das Wachstum von Staphylokokken und koliformen Bakterien, die Eisen benötigen, verhindert. Eisenmangel dieser Bakterien könnte ebenfalls die Bildung des Enzyms Dismutase stören, welches Superoxidradikale deaktiviert, und so die Phagozytierung der Keime erleichtern (Sordillo et al., 1997). Hurley (2000) berichtet von einer eisenunabhängigen bakterioziden Wirkung des Lactoferrins auf einige Streptokokken und *Vibrio cholerae*. Zum zweiten wird dem Lactoferrin eine Trägerfunktion zugeschrieben. Ein Komplex aus Lactoferrin und IgG<sub>2</sub> fördert das Andocken der Antikörper an eingedrungene Keime. Zum dritten lagert sich Lactoferrin an lysozymgeschädigte Zellen an. In vitro waren allerdings nur hohe Lactoferrinkonzentrationen wirksam (3–5 g/100ml). In der Gegenwart von Citrat, das, von den Epithelzellen gebildet, in reifer Milch in relativ hohen Konzentrationen vorliegt, entfällt die bakteriostatische Wirkung des Lactoferrins. Darüber hinaus können einige Bakterien, zum Beispiel *Sc. agalactiae*, Lactoferrin als Eisenquelle nutzen (Sordillo et al., 1997).

Nach neuen Untersuchungen spielt Lactoferrin eine wichtige Rolle bei der Regulation des IGF-Systems. Es bindet selektiv an das IGF-Bindungsprotein-3 und setzt so gebundene IGF-Moleküle frei. Während der Involutionsphase der Milchdrüse und in der unmittelbaren Präpartalphase ist die Produktionsrate des Lactoferrins erhöht, was wiederum mehr IGF-

Moleküle aus der Bindung mit IGFBP-3 löst. Über eine verstärkte Stimulation der IGF-1-Rezeptoren können so Veränderungen im Zellwachstum und der Apoptose bewirkt werden. Daneben transportiert Lactoferrin auch IGFBP-3 zum Zellkern und könnte so unabhängig vom IGF-System in die Regulierung von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose eingreifen. Die genauen Abläufe sind hier noch ungeklärt (Baumrucker und Eröndu, 2000).

### *Lysozym*

Lysozym ist in normaler reifer Kuhmilch fast unmeßbar. Seine Konzentration steigt in Milch aus mastitiskranken Vierteln mit hohen Zellzahlen. Es zerstört die Bakterienwand grampositiver Bakterien dadurch, daß es den Aufbau der Glykosidbindung zwischen den beiden Bestandteilen des Peptidoglykans verhindert. Die stärkste Wirksamkeit entfaltet es im Zusammenspiel mit Lactoferrin. In Kombination mit IgA wird es wirksam gegen *E. coli*, mit Ascorbat und Peroxid gegen *Salmonella* spp. Lysozym scheint die Immigration von PMNG zu vermindern und so antiinflammatorische Wirkung zu haben (Hurley, 2000).

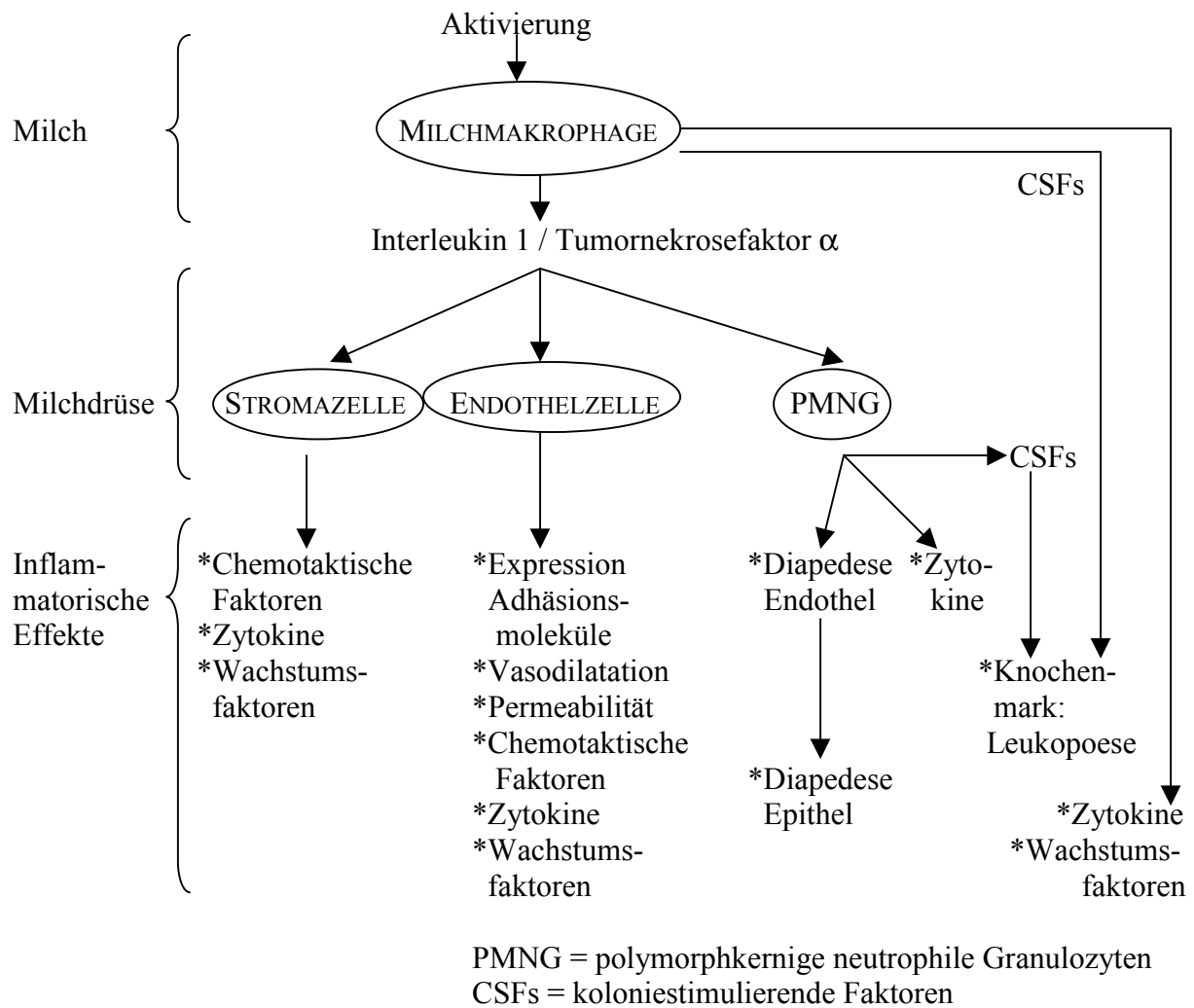
### *N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAGase)*

Das lysosomale Enzym NAGase wird sowohl während der Involution des Euters als auch während Entzündungsvorgängen in großen Mengen sezerniert. Es dient als Indikator von während Mastitiden entstandenen Gewebsschäden. Die spezifische Funktion ist unbekannt, jedoch entwickelt es zusammen mit Lactoferrin erhöhte antimikrobielle Aktivität. Eine Beziehung zwischen dem Vorhandensein von pathogenen Keimen im Euter und den gemessenen NAGase-Konzentrationen wurde nachgewiesen, der kausale Zusammenhang ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Im Uterus entwickelt es antimikrobielle Wirkung gegen *Arcantobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *S. aureus*, *Sc. agalactiae* und *Pseudomonas aeruginosa*, wirkungslos bleibt es dort jedoch gegen *E. coli* und Enterokokken. Eine direkte Übertragung dieser Ergebnisse auf die Vorgänge in der Milchdrüse ist sicher nicht möglich, doch ist eine Wirkung der NAGase gegen mastitiserregende Keime denkbar (Hurley, 2000).

### *Zytokine*

In den letzten Jahren wurde die Rolle der Zytokine bei physiologischen und pathologischen Prozessen im Euter genauer untersucht. Mit dem Vorliegen größerer Mengen rekombinanter Zytokine nehmen auch die Erkenntnisse über deren Wirkungsmechanismen zu.

Zytokine sind vor allem beteiligt an der Chemotaxis, Adhäsion und Diapedese neutrophiler Granulozyten. Sie besitzen zum Teil chemotaktische Eigenschaften, fördern Degranulation sowie Expression von Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche der Neutrophilen und fördern so deren Einwanderung in entzündetes Gewebe (Ibelgaufs, 1995). Die wichtigsten initialen Wechselwirkungen zwischen Zellen der unspezifischen Immunabwehr, dem Kapillarendothel und dem Alveolarendothel sind in Abbildung 2.1 zusammengefasst.



**Abbildung 2.1:** Vereinfachtes Schema der hypothetischen Kaskade zytokininduzierter Vorgänge bei der Auswanderung somatischer Zellen in die Milch (modifiziert nach Kehrlı und Shuster, 1994).

## **2.3 IGF-1 als Zytokin**

### **2.3.1 Definition**

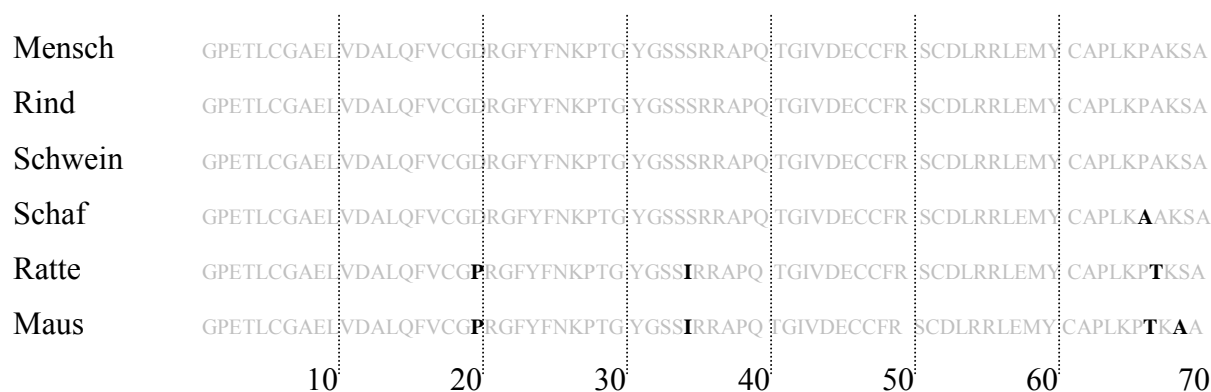
Zytokine sind hormonähnliche Peptide und Proteine mit Signalfunktion, die hauptsächlich von Zellen des Immunsystems, aber auch von anderen Zelltypen synthetisiert und ausgeschüttet werden. Sie werden als chemische Mediatoren in nano- bis picomolaren Konzentrationen auf auto-, para- oder juxtakrine Weise wirksam. Allgemein kontrollieren Zytokine Wachstum, Differenzierung und das Überleben von Zellen. Daneben sind sie an der Steuerung der Apoptose beteiligt. Ihre vielen biologischen Aufgaben lassen sich in drei Bereiche einteilen: Steuerung der Entwicklung sowie der Homöostase des Immunsystems, Kontrolle des hämatopoetischen Systems und Beteiligung an der unspezifischen Abwehr.

Die Zytokine bilden ein regulatorisches Netzwerk mit vielfältigen gegenseitigen Verknüpfungen. Die Interaktionen innerhalb dieses „Zytokin-Netzes“ sind häufig durch Zytokinkaskaden charakterisiert, wobei ein Initialzytokin die Expression anderer Faktoren verursacht und komplexe Feedback-Mechanismen in Gang setzt, die an der Feinregulierung neuroendokriner und immunologischer Vorgänge beteiligt sind (Ibelgaufts, 1995; Koolman und Röhm, 1998).

### **2.3.2 Struktur und Genlokus des IGF-1**

Die erste Isolierung sowie die Sequenzierung des IGF-1 gelang Rinderknecht und Humbel (1978). Die ausgeprägte Homologie zu Insulin deutet darauf hin, daß eine vor mindestens 600 Millionen Jahren erfolgte Genduplikation Ursprung der beiden Hormone war. Die Trennung in IGF-1 und IGF-2 erfolgte vor dem Auftreten der ersten Säugetiere (Froesch et al., 1985; McCusker, 1998).

IGF-1 ist ein einkettiges, basisches Polypeptid aus 70 Aminosäuren, die durch drei Disulfidbrückenbindungen zu ihrer räumlichen Struktur aufgefaltet werden. Die Aminosäuresequenzen des humanen, des bovinen und des porcinen IGF-1 sind identisch, zu anderen Spezies bestehen sehr ausgeprägte Übereinstimmungen (Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2:** Vergleich der Sequenzen von IGF-1 unterschiedlicher Spezies (modifiziert nach GroPep, 2001)

Beim Rind liegt der Genlocus für IGF-1 auf dem Chromosom 5 (Miller et al., 1992). Die Synthese erfolgt über die Ausbildung eines Prä-Pro-Hormons, das durch Proteolyse zum IGF-1 „reift“ (Duguay, 1999).

### 2.3.3 Das System der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren

Das IGF-System setzt sich zusammen aus den drei Liganden Insulin, IGF-1 und IGF-2, drei korrespondierenden Rezeptoren (IGF-1R, IGF-2R, Insulin-R), sechs hochaffinen Bindungsproteinen (IGFBP-1 bis -6) und neun bindungsprotein-bezogenen Proteinen, IGFBP related Proteins (IGFBP-rP-1 bis -9), die an IGF-1 und IGF-2 mit ungefähr zehnmal niedriger Affinität binden als die Bindungsproteine (Gibson et al., 1999; Baumrucker und Eröndu, 2000).

Insulin, IGF-1 und IGF-2 kommen ubiquitär im Körper vor. Sie wirken als Mediatoren für Wachstum, Entwicklung und Differenzierung ebenso wie als endokrine Faktoren, die die Apoptose von Zellen verhindern (Baumrucker und Eröndu, 2000). Dabei läßt das ubiquitäre Vorkommen eine Beteiligung des IGF-Systems an der Wachstumskoordination verschiedener Gewebe und Zelltypen vermuten (Cohick und Clemmons, 1993). Insulin und die IGFs ergänzen sich bei den Wachstums- und Stoffwechselfvorgängen. Ohne Insulin fehlen die für das Wachstum benötigten Substrate. Die IGFs haben die Regulation der langsamen Wachstumsprozesse sowie die Stimulation der Differenzierung einiger mesenchymaler Zelltypen übernommen (Froesch et al., 1985). Dabei ist IGF-2 vor allem ein Regulator des

foetalen Wachstums (Listrat et al., 1994), während IGF-1 verstärkt nach der Geburt wirksam wird.

Der Hauptsyntheseort des IGF-1 ist die Leber, daneben wird es in fast allen Geweben des Körpers synthetisiert. Seine Synthese wird sowohl vom Wachstumshormon (GH) als auch von Prolaktin und anderen Zytokinen reguliert (Sara und Hall, 1990). Zahlreiche wachstumsfördernde Effekte des GH werden durch IGF-1 vermittelt (Coleman et al., 1994), es besteht allerdings eine negative Rückkopplung zwischen IGF-1 und der GH-Ausschüttung in der Adenohypophyse (Elsaesser und Parvizi, 1996). IGF-1 besitzt eine ähnliche metabolische Wirkung wie das Insulin, es fördert die Glukoseaufnahme und senkt die Glukoseproduktion in den Hepatozyten (Sjöberg et al., 1994). Weiterhin werden Glukose- und Aminosäureaufnahme sowie die Proteinsynthese in der Muskelzelle gefördert (Froesch et al., 1985).

Neben seiner endokrinen Wirkung hat IGF-1, bedingt durch seine lokale Synthese, wichtige para- und autokrine Funktionen im Bereich der Zelldifferenzierung und der Wundheilung. Die IGFs liegen in biologischen Flüssigkeiten in der Regel gebunden an die oben erwähnten sechs Bindungsproteine vor. Neben den wahrscheinlich GH-unabhängigen Proteinen IGFBP-1, -2, -4, -5, -6 existiert ein GH-abhängigen Komplex aus IGFBP-3 und einer säurelabilen Untereinheit. Der Hauptteil der zirkulierenden IGFs ist an diesen Komplex gebunden (Rechler, 1993). Die Bindungsproteine verlängern so die Halbwertszeit der zirkulierenden IGFs, regulieren ihren Kapillaraustritt, ihren Zugang zu den Rezeptoren und dadurch ihre biologische Aktivität (Hippel et al., 1999).

Der IGF-1- und der Insulinrezeptor weisen viele strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten auf. Beide binden sowohl Insulin als auch die beiden IGFs, haben jedoch die höchste Affinität für den jeweils homologen Liganden (Cosgrove und Occhiodoro, 2000). Insulin wird am IGF-1R mit ungefähr 500–1000fach geringerer Affinität gebunden als IGF-1 und IGF-2 (Hippel et al., 1999). Die Bildung von Hybrid-Tetramer-Rezeptoren aus Insulin-R und IGF-1R-Untereinheiten ist ebenfalls möglich. Beide Rezeptoren sind involviert in Abläufe des Zellwachstums, der Transformation und der Apoptose (Cosgrove und Occhiodoro, 2000).

Die Struktur des IGF-2R ist völlig verschieden von der des IGF-1R und des Insulin-R. Sie ist jedoch identisch mit dem kation-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, der nach der Geburt als lysosomales enzymleitendes Protein fungiert. Dieser Rezeptor bindet Insulin nicht, jedoch IGF-1, allerdings mit deutlich geringerer Affinität als IGF-2 (Cohick und Clemmons, 1993).

## 2.4 Quantitativer Nachweis von IGF-1 in Milch

Das Peptidhormon IGF-1 liegt in Milch in Konzentrationen im ppb-Bereich vor (Collier et al., 1991). Der quantitative Nachweis solch geringer Mengen erfordert immunologische Meßmethoden. Diese nutzen die selektive Bindung von Antigenen bzw. gebundenen Haptenen durch Antikörper. Eine bestimmte Menge (zum Beispiel radioaktiv) markierten Hormons wird von einem in begrenzter Menge vorliegenden Antikörper gebunden. Unmarkiertes Hormon aus der zu untersuchenden Probe verdrängt markiertes Hormon aus der Bindung mit dem Antikörper. Je höher die Hormonkonzentration in der Probe ist, desto weniger Radioaktivität liegt schließlich gebunden vor. Die Empfindlichkeit von Radioimmuntests (RIA) wird durch die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Standards und durch die Spezifität des eingesetzten Antikörpers bestimmt (Cooper, 1981). Wichtig für genaue Ergebnisse ist die ungestörte Komplexbildung zwischen Antikörper und Antigen sowie die freie Gleichgewichtseinstellung der Bindung von freiem und unmarkiertem Hormon am Antikörper.

IGF-1 liegt in biologischen Flüssigkeiten wie in der Milch zum großen Teil gebunden an IGFBP vor (Schams, 1994; Baumrucker und Eröndu, 2000). Diese Bindungsproteine haben eine vergleichsweise hohe Affinität zu dem Wachstumsfaktor ( $K_d = 10^{-10}$  bis  $10^{-11}$  mol/l), die der Affinität der im RIA eingesetzten Antikörper sehr nahe kommt (Blum und Breier, 1994). Bisher ist noch kein für den Einsatz in einem RIA geeigneter Antikörper bekannt, der mit IGF-1 reagieren könnte, während es an IGFBP gebunden ist. Der Grund hierfür liegt vermutlich in einer sterischen Hinderung (Blum und Breier, 1994; Daxenberger, 1998).

Für genaue Konzentrationsergebnisse ist die Dissoziation des Komplexes aus IGF-1 und IGFBP nötig. Diese erfolgt am schnellsten im sauren Milieu bei pH-Werten  $< 3,4$ . Anschließend wurde die räumliche Abtrennung der Bindungsproteine gefordert, andere Methoden wurden für zu unzuverlässig gehalten (Daughaday et al., 1987). Gebräuchliche Extraktionsmethoden waren entweder die Extraktion an Festphasen, mit Säure-Ethanol-Gemisch bzw. Ameisensäure, oder durch Kryopräzipitierung mit Säure-Ethanol-Gemisch (Breier et al., 1991). Alle aufgeführten Methoden erreichten jedoch keine vollständige Beseitigung der Störungen durch die Bindungsproteine. Somit konnte die anschließende Messung nicht die exakten IGF-1-Konzentrationen ermitteln (Frey et al., 1994; Gutierrez et al., 1997; Shimizu et al., 2000).

Die für IGF-1-Messungen in Plasma anerkannte Methode (Bang, 1995) der Größenausschlußchromatographie unter sauren Bedingungen ist für Messungen der Konzentrationen in Milch ungeeignet. Zum einen fällt das Kasein der Milch im sauren Milieu aus, und das Präzipitat kann nicht mit auf die Säule aufgetragen werden. Die Entfernung des Kaseins ist bei dieser Methode für genaue Ergebnisse unumgänglich (Gibson et al., 1999). Zum anderen sind die in Milch vorliegenden IGF-1-Konzentrationen so gering, daß die für die Methode nötigen Verdünnungsschritte die in der Probe vorliegenden Hormonmengen häufig unter die Nachweisgrenze bringen.

Für die Messung von IGF-1 in Milchproben eignet sich die funktionelle Trennung: Nach der Dissoziation des IGF-1/IGFBP-Komplexes im sauren Milieu werden die Bindungsproteine mit einem Überschuß an IGF-2 abgesättigt. IGF-1 bleibt frei und steht für die Bindung an den Antikörper zur Verfügung. Voraussetzung für das Gelingen dieser Methode ist die Entwicklung und Verwendung eines hochspezifischen Antiserums, das nicht mit IGF-2 kreuzreagieren kann (Blum und Breier, 1994; Daxenberger et al., 1998).

## **2.5 Das IGF-System in der bovinen Milchdrüse und in der Milch**

In bovinen Mammaepithelzellen wurden der IGF-1-, der IGF-2- und der Insulin-Rezeptor nachgewiesen. Die Anzahl der IGF-1-Rezeptoren im Eutergewebe sinkt nach dem Abkalben im Verlauf der Laktation ab. Zeitgleich sinken die IGF-1-Konzentrationen im Blut (Baumrucker und Eröndu, 2000).

IGF-1 kann vor allem im Stroma von bovinem Mammagewebe nachgewiesen werden (Schams, 1994). Anfänglich wurde es erst nach einer in-vivo-Behandlung mit GH auch in den Mammaepithelzellen lokalisiert (Glimm et al., 1988). Später gelang der Nachweis von IGF-1 auch ohne Vorbehandlung in den Epithelzellen des Euters (Schams et al., 1995). Campbell et al. (1991) stellten die Synthese und Sekretion von IGF-1 und IGFBP durch bovine Milchdrüsenepithelzellen in Untersuchungen an Organkulturen fest, wobei die sekretorischen Alveolarzellen IGF-1 und IGFBP sezernieren, aber nur die Bindungsproteine synthetisieren können. Baumrucker et al. (1993) fanden keine Hinweise für eine Synthese des IGF-1 in den Epithelzellen.

Die IGF-1-Konzentration im Sekret der Milchdrüse ist beim Rind post partum sehr hoch und nimmt im Verlauf der Kolostralphase kontinuierlich ab (Malven et al., 1987; Collier et al., 1991; Dehnhard et al., 2000). IGF-1 liegt in der Milch in der Regel gebunden an Bindungsproteine und nur in geringem Maße als freies Protein vor (Campbell und Baumrucker, 1989). Nur während der ersten Gemelke post partum wiesen Schams und Einspanier (1991) den größten Teil des IGF-1 in freier Form nach.

Bovine Mammaepithelzellen synthetisieren und sezernieren vier IGF-Bindungsproteine (IGFBP-2, -3, -4, -5) (Gibson et al., 1999). Dabei ist IGFBP-3 in der bovinen Milchdrüse am stärksten vertreten (Gibson et al., 1999; Baumrucker und Erondü, 2000), wobei die Expression der Bindungsproteine speziesspezifisch ist (Flint et al., 2000). Vega et al. (1991) fanden in der bovinen Milch hauptsächlich IGFBP-2 und IGFBP-3. Das Mengenverhältnis der sezernierten IGFBP scheint dabei von der biologischen Funktionsphase der Milchdrüse und dem physiologischen Status des Tieres, insbesondere vom fütterungsbedingten Energieangebot, abhängig zu sein (Flint et al., 2000; Weber et al., 2000).

Neben der lokalen Produktion von IGF-1 durch das Eutergewebe halten Liebe und Schams (1998) auch eine Produktion durch die somatischen Milchzellen für möglich. Darüber hinaus wurde der Transport von IGF-1 aus dem Blut in die Milch nachgewiesen (Prosser et al., 1987), wobei der genaue Transportmechanismus noch ungeklärt ist. In der Diskussion sind derzeit drei Möglichkeiten. IGF-1 könnte durch die ante partum, in der Kolostralphase oder bei Entzündungsreaktionen (noch) nicht geschlossenen tight junctions zwischen den Epithelzellen aus dem Extrazellularraum in die Milch diffundieren. In der normal laktierenden Milchdrüse könnte IGF-1 entweder durch eine rezeptorvermittelte Endozytose oder durch einen Einfangmechanismus mit den in den Epithelzellen synthetisierten IGF-Bindungsproteinen in die Zelle gebracht werden (Grosvenor et al., 1993). Die großen Mengen an nachweisbarer IGF-1-mRNA im Eutergewebe (sie sind denen in der Leber vergleichbar) und die fehlende direkte Korrelation zwischen den IGF-1-Konzentrationen im Serum und in der Milch sprechen für eine ausgeprägte lokale Produktion des Wachstumsfaktors (Schams, 1994).

Bis heute gibt es wenig Beweise für einen direkten galaktopoetischen Effekt von IGF-1 (Cohick, 1998). Es fördert allerdings die Teilung der mammären Epithelzellen (McGrath und Collier, 1988; Weber et al., 2000) und verlangsamt deren Apoptose (Bauman, 1999). Diese Zellen synthetisieren und sezernieren auch IGF-Bindungsproteine (Baumrucker und Erondü, 2000). Dabei untersteht das Bindungsprotein 3 einer direkten Kontrolle durch die vorliegende

IGF-1-Konzentration. In Zellen mit viel IGFBP-3 verursacht IGF-1 eine besonders deutliche Steigerung der DNA-Synthese. IGF-1 kann also die Synthese des IGFBP-3 stimulieren, dessen Anwesenheit wiederum die Wirksamkeit des IGF-1 verstärkt. Ob dieser Mechanismus auch in der laktierenden Milchdrüse in vivo funktioniert, muß noch geklärt werden. Viel spricht dabei für endokrine Mechanismen, die Rolle des lokal gebildeten IGF-1 für die Galaktopoese ist noch unklar (Cohick, 1998).

Das in der Milch vorkommende IGF-1 hat vermutlich zu einem Teil lokale Bedeutung für regenerative und immunmodulierende Prozesse. Bei Wundheilungsprozessen sezernieren erst Makrophagen und Thrombozyten, danach auch das umliegende Gewebe den Wachstumsfaktor. Zusammen mit dem platelet-derived growth factor fördert er Zellwachstum und Matrixausscheidung und trägt so zur Geweberegeneration bei (Bird und Tyler, 1994). Tapson et al. (1988) sowie Arkins et al. (1993) vermuteten eine chemotaktische und proliferative Wirkung des IGF-1 auf neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Kelley (1989) stellte einen fördernden hämatopoetischen Effekt auf die Differenzierung neutrophiler Granulozyten in vitro fest. Zhao et al. (1992) wiesen spezifische IGF-1-Rezeptoren an bovinen Monozyten und neutrophilen Granulozyten nach, die nach Stimulation mit IGF-1 auch eine Steigerung ihrer Mitoseraten zeigen (Zhao et al., 1993). Inkubation mit IGF-1 erhöht den oxidativen Metabolismus von bovinen, porcinen und humanen Granulozyten deutlich (Fu et al., 1991, Zhao et al., 1993). Besonders effektiv scheint der Priming-Effekt von IGF-1 auf bovine Granulozyten und Makrophagen zu sein. Die Superoxidproduktion dieser Zellen nach entsprechenden Reizen wird gesteigert (Fu et al., 1991; Arkins et al., 1993).

## **2.6 Bovines Somatotropin, IGF-1 und Mastitis**

Bovines Somatotropin (bST) oder Wachstumshormon (GH) ist ein aus 190 oder 191 Aminosäuren zusammengesetztes Proteinhormon, das in der Adenohypophyse gebildet und von ihr episodisch sezerniert wird (Gluckman et al., 1987). Im Gegensatz zu IGF-1 weist das Wachstumshormon eine ausgeprägte Speziespezifität auf, auch innerhalb einer Spezies besteht eine ausgeprägte Heterogenität (Bauman, 1991).

Seine Konzentration im Blut ist abhängig von Alter, Geschlecht und Ernährungszustand des Tieres (Schams et al., 1988). bST reguliert im Sinne einer homeorhetischen Kontrolle die

Nährstoffverteilung im Körper (Peel und Bauman, 1987). Körpereigenes bST ist essentiell für normales Wachstum und die Entwicklung der Milchdrüse, wobei die genauen Wirkungsmechanismen noch ungeklärt sind (Sejrsen et al., 1999). Exogen zugeführtes bST oder rekombinantes bST (rbST) haben gleichermaßen Einfluß auf Wachstum, Nährstoffnutzung und Milchleistung (Bauman et al., 1985; Kirchgessner et al., 1987). (r)bST-Behandlung steigert die Milchmenge um bis zu 10–25 % pro Kuh und Laktation (Kronfeld, 1988), Steigerungen um bis zu 40 % sind berichtet worden (Peel und Bauman, 1987). Diese Verbesserung entspricht dem Ergebnis von 10–20 Jahren züchterischer Arbeit (Bauman, 1999). In Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation wirkt bST, zum Teil über das IGF-System, anabol auf die Milchdrüse, aber katabol auf das Fettgewebe (Karg, 1988) und begünstigt so durch das zur Verfügung gestellte Körperfett die Milchbildung.

Exogen zugeführtes bST verschiebt die Nährstoffverteilung im Körper zugunsten der Milchsynthese (Bauman, 1992). Die Milchdrüse wird stärker durchblutet und so besser mit Nährstoffen versorgt. Im Euter wirkt bST wahrscheinlich indirekt über das IGF-System. Nach einer rbST-Behandlung sind die IGF-1-Konzentrationen sowohl im Serum als auch in der Milch erhöht (Daxenberger, 1998). Die sekretorische Kapazität des Mammagewebes wird erhöht und die Lebensdauer der sekretorischen Zellen verlängert (Bauman, 1999). Es wird unter rbST-Einfluß auch über eine erhöhte Umwandlung des Schilddrüsenhormons Thyroxin zu der biologisch aktiveren Form Trijodthyronin in der Milchdrüse berichtet, was die Milchmengenmehrleistung mit vermitteln soll (Capuco et al., 1989).

Die Anwendung von rbST zur Steigerung der Milchleistung wurde 1994 in den USA zugelassen (Tucker, 2000), in Europa ist sie verboten.

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien über die Auswirkungen von bST auf die Gesundheit der Milchkühe sind widersprüchlich. Es wurden zum Teil Auswirkungen auf den Stoffwechsel, den Bewegungsapparat, die Fruchtbarkeit und die Eutergesundheit beobachtet (Ceelen, 1995). Andere Forscher konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen dem Gesundheitszustand von behandelten und unbehandelten Tieren feststellen (Peel und Bauman, 1987; Bauman, 1992).

bST beeinflusst den Stoffwechsel unter anderem über die Lipidmobilisation im Körper (Karg, 1988). Lean et al. (1994) fanden bei Kühen, die in der vorausgegangenen Laktation mit rbST behandelt worden waren, weniger ketonämische bzw. an klinischer Ketose erkrankte Tiere als bei den unbehandelten Kontrolltieren. rbST steigerte graduell die freiwillige

Futteraufnahmemenge (Bauman et al., 1985). Daneben scheinen GH-Gaben auch den oxidativen Abbau von Medikamenten zu beeinflussen (Witkamp et al., 1993).

Entzündliche Reaktionen an den Injektionsstellen sind beschrieben worden (Pell et al., 1992). In einigen Studien zeigten rbST-behandelte Kühe häufiger Entzündungen der Klauen und der Gelenke (Zhao et al., 1992; Collier et al., 2001).

Der Einfluß der rbST-Behandlung auf die Fruchtbarkeit wird widersprüchlich bewertet. Pell et al. (1992) und Collier et al. (2001) konnten keine nachteiligen Auswirkungen feststellen. Dagegen berichteten Zhao et al. (1994) von häufigerer GnRH-Therapie und längeren Rast- und Gützeiten, Oldenbroek et al. (1991) beobachteten ein um 5 % niedrigeres Geburtsgewicht bei Kälbern von Kühen, die in der vorangegangenen Laktation mit rbST behandelt worden waren.

Collier et al. (2001) und McClary et al. (1994) konnten keine signifikant erhöhte Inzidenz von Mastitiden unter rbST-Behandlung feststellen. McClary et al. (1994) beobachteten jedoch eine dosisabhängigen Trend zu steigenden Zellzahlen bei den behandelten Kühen. Diese Beobachtung wurde auch von Lissemore et al. (1991) gemacht, die auch eine dosisabhängige gesteigerte Neuinfektionsrate bei rbST-behandelten Kühen in der Hochlaktation nachwiesen. Pell et al. (1992), Zhao et al. (1994), Ceelen (1995), Judge et al. (1997) und Lean et al. (2000) berichten von einem gesteigerten Mastitisrisiko unter rbST-Behandlung. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß das Mastitisrisiko mit steigender Milchmenge zunimmt (White et al., 1994). Sie konnten eine positive lineare Abhängigkeit zwischen Milchmenge und Mastitisinzidenz ermitteln, die durch rbST nicht verändert wurde. In bezug auf den erzeugten Liter Milch sank die Mastitisrate mit steigender Leistung, ebenfalls unverändert durch rbST. Es ergab sich kein erhöhtes Mastitisrisiko bei Kühen, die eine mit Hilfe von rbST gesteigerte Milchleistung hatten im Vergleich zu Kühen, deren Milchleistung aufgrund züchterischen Fortschritts auf dem gleichen Niveau lag (White et al., 1994).

Hoeben et al. (1999a) fanden bei den rbST-behandelten Kühen einen schnelleren und höheren Anstieg der Zellzahlen, der nach der Entzündung im Gegensatz zu den Kontrolltieren allerdings nicht wieder auf die vorher gemessenen Werte zurückging. Von erhöhte Zellzahlen nach bST-Behandlung berichten auch Lissemore et al. (1991), Ceelen (1995) und Burvenich et al. (1999).

Die Behandlung mit rbST scheint positive Effekte auf die Eutergesundheit zu haben. Bei Kühen mit experimentell induzierter Mastitis kam es nach rbST-Behandlung zu einer schnelleren Erholung (Lean et al., 2000). Hoeben et al. (1999a) beobachteten bei Kühen mit

experimentell induzierter *Sc.-uberis*-Mastitis unter rbST-Schutz weniger ausgeprägte klinische Symptome, einen geringeren Milchmengenrückgang und geringere Änderungen der Milchezusammensetzung sowie eine verkürzte Rekonvaleszenzzeit. Eine Erhöhung der Serum-bST-Konzentrationen konnten Shuster et al. (1995) bei Kühen mit experimentell induzierter *E.-coli*-Mastitis während der Fieberphase nachweisen, was von Burvenich et al. (1999) bestätigt wurde. Bruckmaier et al. (1993) fanden bei mittels *E.-coli*-Endotoxin induzierter Mastitis dagegen keine Erhöhung der Serum-bST-Konzentration. Bei allen diesen Experimenten war aber eine Erhöhung der IGF-1-Konzentrationen in der Milch feststellbar (Bruckmaier et al., 1993; Shuster et al., 1995; Burvenich et al., 1999), welche nicht nur auf das entzündete Viertel in der Phase der Störung der Blut-Euter-Schranke beschränkt war. Eine Erhöhung der bST-Konzentrationen in der Milch war dagegen nur in dem entzündeten Drüsenkomplex bei durchlässiger Blut-Euter-Schranke nachweisbar (Burvenich et al., 1999). Lean et al. (2000) vermuten die Schutzwirkung des bST in einer Verbesserung der Immunantwort. Hoeben et al. (1999a) gehen davon aus, daß die Schutzwirkung von bST auf das Eutergewebe durch IGF-1 vermittelt wird, welches einen positiven Effekt auf das Zytoskelett und die tight junctions ausübt. Bruckmaier et al. (1993) konnten bei durch *E.-coli*-Endotoxin induzierten Mastitiden allerdings keinen Einfluß einer lokalen Behandlung erkrankter Viertel mit IGF-1 erkennen. Burvenich et al. (1999) berichten von einem stimulierenden Effekt von IGF-1 und bST auf Leukozyten und das Knochenmark. Auf zirkulierenden bovinen mononuklearen Zellen konnten spezifische IGF-1-Rezeptoren nachgewiesen werden. IGF-1 und bST stimulieren Erythropoese, Differenzierung und Proliferation von Granulozyten und Monozyten, Sauerstoffradikalproduktion, Phagozytose und Einwanderung der Abwehrzellen. bST und IGF-1 sind notwendig für das Überleben ruhender Leukozyten.

Bereits Selye (1955) berichtete von der starken fördernden Wirkung von GH auf das Entzündungspotential des Bindegewebes. Hoeben et al. (1999b) beobachteten bei rbST-behandelten Kühen mit experimentell induzierter *Sc.-uberis*-Mastitis eine schwächere Leukopenie als bei den Kontrollkühen. rbST schützte die erkrankten Kühe vor schweren lokalen und klinischen Symptomen und verbesserte so ihr Wohlbefinden, hatte aber keinen nachweisbaren Einfluß auf Chemilumineszenz, Diapedese und die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf zirkulierenden PMNG.

Dagegen berichtete Kelley (1990) von einer anregenden Wirkung des GH auf Leukozytenfunktionen wie Antikörpersynthese, zytolytische Aktivität der T-Lymphozyten,

Aktivität der natürlichen Killerzellen, Differenzierung der Neutrophilen, TNF $\alpha$ -Produktion und Thymulin-Synthese. Dabei wurde GH auch von Leukozyten produziert, so daß es in lymphoidem Gewebe wie ein Zytokin wirksam werden könnte.

Laktierende Kühe zeigten nach der Behandlung mit bST eine moderate Linksverschiebung der Neutrophilen und insgesamt einen Anstieg der Leukozytenzahl. Grund hierfür könnte die Wirkung von bST auf das Knochenmark sein, nämlich die Freisetzung der gespeicherten Zellen und die Aktivierung des koloniestimulierenden Faktors (CSF). Im Falle einer *E.-coli*-Mastitis, deren Ausgang von der Zahl der Neutrophilen abhängt, können GH und IGF-1 den Ausgang der Erkrankung günstig beeinflussen. Darüber hinaus ist auch die entzündete Drüse noch empfänglich für die leistungssteigernde Wirkung von bST (die wahrscheinlich von IGF-1 vermittelt wird nach denselben Mechanismen wie bei gesunden Kühen). Daneben gibt es Anlaß zur Vermutung, daß GH auch die Neutrophilenfunktionen fördert und daher die Milchdrüse sich besser verteidigen kann (Burvenich et al., 1999).

IGF-1 ist sowohl an der Entwicklung und Erhaltung der Milchdrüse beteiligt als auch an der Milchproduktion und an den Abwehrmechanismen des Euters. Die genauen Regelmechanismen sind dabei noch zum großen Teil unbekannt. Genauere Kenntnis der natürlichen Abläufe ist notwendig, um bei Krankheit, also gestörten Regelverhältnissen, erfolgsversprechend eingreifen zu können.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Rahmenprojekt**

Von Januar 1997 bis Dezember 1998 wurde in Schleswig-Holstein das Projekt „Qualitätssicherung in der Milcherzeugung durch Verbesserung der Milchqualität und der Eutergesundheit“ durchgeführt. Es stellte eine Zusammenarbeit der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein mit dem Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität (ITL) Kiel, dem Landeskontrollverband (LKV) Schleswig-Holstein, Landwirten und ihren Hoftierärzten sowie dem Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel dar.

Im Rahmen des Projektes wurden auf 15 landwirtschaftlichen Betrieben in Schleswig-Holstein einmal monatlich Viertelanfängsgemelksproben (VGP) von allen laktierenden Kühen gezogen und auf Zellzahl und Keimvorkommen untersucht. Parallel dazu wurden Daten zu Tiergesundheit, Herdenmanagement, Haltung, Fütterung sowie Melktechnik und Melkhygiene erfaßt und ausgewertet.

Voraussetzung für die Beteiligung der landwirtschaftlichen Betriebe am Projekt war die Mitgliedschaft in der Rinderspezialberatung, die regelmäßige Teilnahme an der Milchleistungsprüfung des LKV Schleswig-Holstein, regelmäßige Kontrolle der Melktechnik nach der DIN/ISO-Norm 5707 sowie die persönliche Motivation der Betriebsleiter.

#### **3.2 Probengewinnung**

##### **3.2.1 Ausgewählte Betriebe**

Die Milchproben von neun der 15 am Projekt beteiligten Betriebe wurden in die Messung der IGF-1-Konzentrationen einbezogen. Die Auswahl dieser Betriebe erfolgte anhand der Daten, die bis April 1998 erhoben worden waren. Es wurden vier Betriebe ausgewählt, in deren Tierbestand selten Probleme mit der Eutergesundheit aufgetreten waren, und vier Betriebe, deren Kühe häufig an Eutergesundheitsstörungen gelitten hatten. Zusätzlich wurden Proben von einer Herde gewonnen, die auf ein automatisches Melkverfahren (AMV) umgestellt worden war. Die Herdengröße lag zwischen 37 und 86 Tieren, die durchschnittliche Milchleistung bewegte sich zwischen 15,5 und 22,8 kg Milch pro Kuh und Tag (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1:** Betriebe, deren Kühe zur Probengewinnung herangezogen wurden: Herdengröße und -leistung (in den Jahren 1997 und 1998), Rassenverteilung, Anzahl der gezogenen Viertelanfängselproben, Anzahl der beprobten Tiere sowie Anzahl Probenahmen pro Kuh

Betrieb	Herdenleistung (in kg Milch/Kuh)	Herdengröße (laktierende Tiere)	Vertretene Rassen (Anzahl beprobter Tiere)				Gesamtzahl Viertelgemelks- proben	Anzahl beprobter Einzeltiere	Durchschnittliche Anzahl Beprobungen/Tier (min / max)
			A	RB	SB	DN			
1	20,8	38	0	147	21	0	672	45	4,0 (1 / 7)
2	21,9	44	5	17	124	6	608	60	2,6 (1 / 6)
3	22,2	79	0	9	150	8	668	78	2,2 (1 / 5)
4	21,8	59	0	0	167	0	668	63	2,6 (1 / 6)
5	19,6	51	0	148	1	10	636	60	2,7 (1 / 6)
6	22,8	61	0	21	101	0	488	67	1,8 (1 / 5)
7	15,5	86	0	140	26	0	664	72	2,4 (1 / 7)
8	17,8	81	0	158	4	2	656	71	2,4 (1 / 6)
9	20,8	84	167	0	0	0	668	55	3,1 (1 / 7)

A = Angler

RB = Deutsche Holstein der Farbrichtung Rot

SB = Deutsche Holstein der Farbrichtung Schwarz

DN = Deutsche Rotbunte, Doppelnutzung

Alle Betriebe hielten ihre Kühe in Boxenlaufställen mit Weidegang in den Sommermonaten. In acht Betrieben wurden die Tiere in Fischgrätenmelkständen gemolken, Betrieb 2 verfügte über ein automatisches Melkverfahren mit Einboxensystem.

### **3.2.2 Probennahmeregime und Milchprobenaufbereitung**

In den neun Betrieben wurden Milchproben für die Bestimmung der IGF-1-Konzentrationen von Mai bis Dezember 1998, mit Ausnahme des Monats Juli, einmal monatlich gezogen. Die Entnahme der Viertelanfangsgemelksproben erfolgte stets während des morgendlichen Melkens. Die normalerweise mit AMV gemolkenen Kühe wurden zur Probenentnahme durch einen konventionellen Melkstand getrieben. Bei der Probennahme wurde folgendes Schema eingehalten (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 2000):

- Wegmelken des Vorgemelks, Euterreinigung und -stimulation durch den Landwirt,
- Desinfektion der Zitzen mit 70 % Ethanol, danach Trocknen der Zitzen mit Einmaltüchern,
- Wegmelken von weiteren 2 bis 3 Strahlen,
- Entnahme von 30 ml Milch in sterile Milchprobenröhrchen, die je 0,18 g Borsäure in Pulverform als Stabilisator enthielten.

Maximal 3 Stunden nach Ende der Probennahme kamen die Milchproben am ITL an. Ab diesem Zeitpunkt wurden sie bis zur Magermilchgewinnung gekühlt. Vorversuche bestätigten die Stabilität des IGF-1 in gekühlten, mit Borsäure als Stabilisator versehenen Milchproben über den Bearbeitungszeitraum. Eine graphische Übersicht der Ergebnisse dieser Versuche ist im Anhang dargestellt.

Am ITL Kiel wurden von jeder Probe ca. 2 ml für die bakteriologischen Untersuchungen entnommen. Die Bestimmung der Zellzahl mittels fluoreszenzoptischer Methode (Fossomatic®) erfolgte beim LKV Kiel. Anschließend wurde am Institut für Tierzucht und Tierhaltung aus den zur IGF-1-Bestimmung vorgesehenen Proben Magermilch gewonnen. Dazu wurden diese Proben bei 4 °C und 4000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert und jeweils 4 ml der Magermilch bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

### 3.2.3 Probenauswahl für die IGF-1-Bestimmung

Alle gezogenen Milchproben wurden zytologisch und bakteriologisch untersucht. Entsprechend der Ergebnisse der zytologischen und bakteriologischen Untersuchungen der Milchproben wurde jede Kuh eines Betriebs einer der folgenden vier Gesundheitsgruppen zugeteilt (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** Einteilungskriterien für die Zuordnung einer Kuh zu einer der vier Gesundheitsgruppen (Gesundheitsgruppe Kuh)

Gruppe	Bezeichnung	Untersuchungsergebnisse der Viertelanfangsgemelksproben	
		Somatische Zellzahl (SCC)	Bakteriologische Untersuchung (BU)
I	normale Sekretion	in allen vier Vierteln < 100.000/ml	für alle vier Viertel negativ
II	unspezifische Mastitis	in mindestens einem Viertel > 100.000/ml	für alle vier Viertel negativ
III	(sub-)klinische Mastitis	in mindestens einem Viertel > 100.000/ml	für mind. dieses Viertel positiv
IV	latente Infektion	in allen vier Vierteln < 100.000/ml	für mind. ein Viertel positiv

Für die Messung der IGF-1-Konzentration wurden monatlich von jedem Betrieb, nach erfolgter Zuteilung der Kühe zu den Gruppen I – IV, aus jeder Gesundheitsgruppe zufällig sechs Tiere ausgewählt. Die Viertelanfangsgemelksproben dieser Kühe wurden zur weiteren Untersuchung vorbereitet und gelagert. Insgesamt wurde die IGF-1-Konzentration in 5728 Magermilchproben von 571 Kühen gemessen.

### 3.3 IGF-1-Radioimmuntest

#### 3.3.1 Prinzip des RIA

Das Prinzip des Radioimmuntests besteht in der spezifischen Bindung eines Antikörpers an das Antigen. Das zu bestimmende Hormon aus der Probe konkurriert mit einer definierten Menge desselben, aber radioaktiv markierten Hormons um die Bindungsstellen des Antikörpers. Dabei wird um so weniger radioaktiv markiertes IGF-1 gebunden, je höher die Konzentration des nativen Hormons in der Probe ist.

#### 3.3.2 Reagentien und Lösungen

a) Puffer A: 20 mM Phosphatpuffer (pH 2,8) zur Verdünnung der Proben und der Standardpunkte

2,59 mM	Phosphorsäure (85 %)
16,41 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O
5,00 mM	EDTA (Titriplex III)
120,00 mM	NaCl
0,20 %	BSA (RIA grade)
0,50 %	Triton X-100

b) Puffer B: 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) zur Verdünnung des Antikörpers und des Tracers

75,55 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2 H <sub>2</sub> O
24,45 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O
40,00 mM	NaCl
0,02 %	NaN <sub>3</sub>
0,20 %	BSA (RIA grade)
0,50 %	Triton X-100

c) 0,5 M Phosphorsäure zur Ansäuerung der Milchverdünnungen auf pH 2,8

d) 60 mM EDTA (Titriplex III) in Puffer A zur Komplexbildung der in der Milch enthaltenen Erdalkaliumionen

- e) IGF-2 (GroPep, Adelaide; Cat. FM001, Lots JJE-F03, JJF-F01) 2500 ng/ml Puffer A zur Absättigung der IGF-Bindungsproteine
- f) Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung (Sigma I-5006), 5 mg/ml Puffer B
- g) IGF-1-spezifischer Antikörper: Antiserum 878/4 1/35000; enthält 50 µg/ml unspezifisches Kaninchen-IgG (Prof. Breier, Neuseeland)<sup>1</sup>
- h) Unspezifischer Antikörper: Anti-Kaninchen-IgG-Serum von Schaf „Lea“ (Institut für Tierzucht und Tierhaltung der CAU Kiel), verdünnt 1:4 in Puffer B
- i) Radioaktiv markiertes IGF-1: verdünnt auf 10000 bis 13000 cpm pro 100 µl Puffer B (ICN Biomedicals Inc., Cat. 68128, Lots 2992IGF1, 9991IGF1, 1191IGF1A und Mediagnost, Tübingen, Lots 250500, 300300)
- j) Polyethylenglycol 6000 (Merck 807491): 4 % (w/v) in Aqua bidest.
- k) Referenzsubstanz: IGF-1, human, rekombinant (GroPep, Adelaide; Cat. CM001, Lot EJG-C01)
- l) Standardreihe: Verdünnungsreihe IGF-1 in Puffer A in 8 Schritten zu 1:2; 10–0,039 ng IGF-1/ml

---

<sup>1</sup> Für die Überlassung des Antikörpers danke ich Herrn Prof. Dr. Breier, University of Auckland; New Zealand

### 3.3.3 Ablauf des IGF-1-RIA

Die Bestimmung der IGF-1-Konzentrationen in Magermilch erfolgte nach Daxenberger et al. (1998), basierend auf Blum and Breier (1994).

#### *Aufarbeitung der Proben*

Die Magermilch wurde aufgetaut und 1:10 verdünnt, so daß die IGF-1-Konzentrationen im Bereich der Standardkurve lagen. Die optimale Menge IGF-2 zur funktionellen Entstörung der IGF-Bindungsproteine (IGFBP) beträgt etwa das 50fache der IGF-1-Konzentration.

Für die Routineanalyse wurde das folgende Schema verwendet:

100 µl Magermilchprobe

- + 75 µl 60 mM EDTA
- + 25 µl 0,5 M Phosphorsäure
- + 25 µl IGF-2 (2500 ng/ml)
- + 775 µl Puffer A

Ergab die Messung der aufgearbeiteten Probe eine außerhalb der Standardkurve liegende IGF-1-Konzentration, mußte eine geeignete Verdünnung hergestellt werden.

#### *Pipettierschema*

Die Gesamtaktivität (GA), der Leerwert ( $B_0$ ), die nichtspezifische Bindung (NSB) und die Standardkurve wurden dreifach, die aufgearbeiteten Proben wurden zweifach angesetzt. Tabelle 3.3 zeigt das vollständige Pipettierschema. Nach der Zugabe des spezifischen Antikörpers mußte der Testansatz gekühlt werden, das heißt, es wurde auf Eiswasser gearbeitet.

**Tabelle 3.3:** Pipettierschema für den radioimmunologischen Nachweis von IGF-1 in Magermilch

Röhrchen Nr.	Coding	Probe <sup>f</sup> / Standard ( $\mu$ l)	Puffer A ( $\mu$ l)	Puffer B ( $\mu$ l)	Spez. AK <sup>d</sup> ( $\mu$ l)	2. Inkubation (mind. 18 h bei 5 °C)		
						Tracer ( $\mu$ l)	Unspez. AK <sup>d</sup> ( $\mu$ l)	PEG <sup>e</sup> ( $\mu$ l)
1, 2, 3	GA <sup>a</sup>					100		
4, 5, 6	NSB <sup>b</sup>		100	100		100	100	1500
7, 8, 9	B <sub>0</sub> <sup>c</sup>		100		100	100	100	1500
10, 11, 12	Standard 10 ng	100			100	100	100	1500
etc.	Standard 5 ng etc.	100			100	100	100	1500
37-42	3 Kontrollen (Doppelansatz)	100			100	100	100	1500
43, 44	Probe 1	100			100	100	100	1500
etc.	Probe 2 etc.	100			100	100	100	1500
Ansatzmitte	3 Kontrollen (Doppelansatz)	100			100	100	100	1500
etc.	Proben	100			100	100	100	1500
Ansatzende	3 Kontrollen (Doppelansatz)	100			100	100	100	1500

<sup>a</sup>: Gesamtaktivität

<sup>b</sup>: nichtspezifische Bindung

<sup>c</sup>: Leerwert

<sup>d</sup>: Antikörper

<sup>e</sup>: Polyethylenglycol

<sup>f</sup>: (aufgearbeitet)

Mindestens eine Stunde nach der Zugabe des PEG wurden die Ansatzröhrchen 40 min bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen.

Die Radioaktivität jedes Präzipitats wurde eine Minute lang im Gamma-Zähler (Automatic Gamma Counter 1470 WIZARD<sup>TM</sup>, Wallac, Finnland) gemessen. Die Berechnung der

Standardkurve erfolgte mit dem Auswertungsprogramm RIA-Calculator für WIZARD, Version 3.3 (Wallac, 1996) nach dem „Spline Smoothed“-Modell.

### 3.3.4 Testvalidierung

Um die Verlässlichkeit und die Vergleichbarkeit von Analysendaten zu gewährleisten, müssen Nachweisverfahren validiert werden, das heißt, es muß sichergestellt werden, daß die ermittelten Werte genau, reproduzierbar und somit verlässlich sind.

#### *Reproduzierbarkeit*

Wichtiges Qualitätskriterium für Analysemethoden ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Sie wird durch die Berechnung der Wiederholbarkeit von Meßwerten innerhalb eines und zwischen verschiedenen Testansätzen bestimmt (Intra- bzw. Interassayvariation). Für die Berechnung der Intraassayvariationskoeffizienten wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende jedes Testansatzes Magermilchproben mit unterschiedlichen IGF-1-Konzentrationen als Kontrollproben mitgemessen. Die Interassayvariationskoeffizienten ergeben sich aus dem Vergleich der Meßergebnisse jeder der Kontrollen in den verschiedenen Testansätzen (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4:** Reproduzierbarkeit des RIA beim Nachweis von IGF-1 in Magermilch (SE = Standardfehler)

Magermilch- kontrolle	Test- ansätze	Mittelwerte ± SE (ng/ml)	Interassay- variationskoeffizient (%)	Intraassay- variationskoeffizient (%)
1	23	0,35 ± 0,05	14,6	6,1
2	7	1,75 ± 0,17	9,9	7,6
3	23	0,18 ± 0,03	16,0	4,8
4	17	1,37 ± 0,22	15,8	6,9

### Wiederfindung

Zur Prüfung auf systematische Abweichungen durch Einflüsse der Matrix oder verschiedener Verfahrensschritte wird die Wiederfindungsrate ermittelt. Der Prozentsatz, zu dem eine bekannte IGF-1-Konzentration, die dem Probenmaterial zugesetzt wurde, vom Testsystem wiedergefunden wird, ist gleichzeitig ein Maß für die Genauigkeit des Verfahrens.

Zu drei Magermilchproben mit niedriger (1,3 ng/ml  $\pm$  0,06), mittlerer (2,7 ng/ml  $\pm$  0,11) und hoher (11,0 ng/ml  $\pm$  0,65) IGF-1-Konzentration wurden je vier verschiedene Mengen IGF-1, gelöst in Puffer A, zugegeben (2, 5, 10 bzw. 20 ng IGF-1/ml Puffer A, s. Tabelle 3.5). Jede dieser Proben wurde viermal als Doppelmessung angesetzt. Die Zahl der auswertbaren Messergebnisse betrug  $n = 94$ .

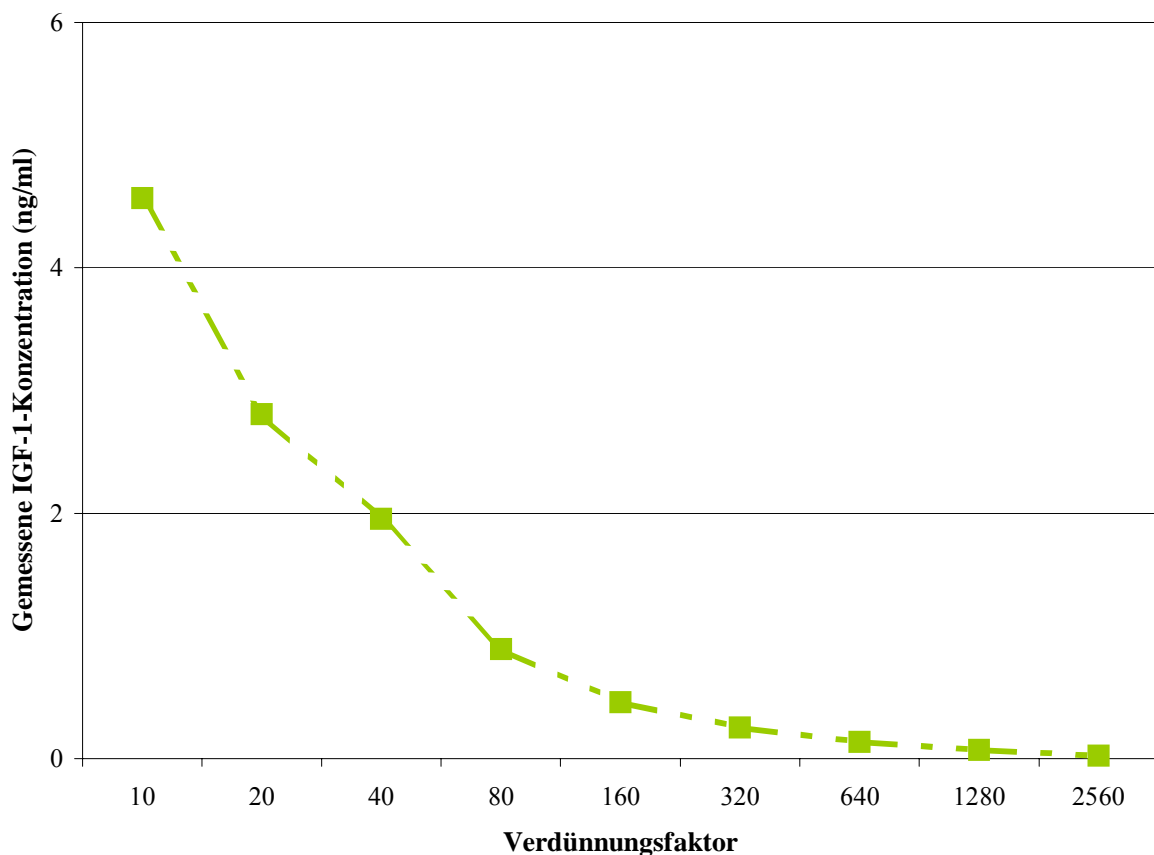
**Tabelle 3.5:** Wiederfindung definierter IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (WF = Wiederfindung, SE = Standardfehler)

Milch- probe	IGF-1- Konzentration (ng/ml) $\pm$ SE	20 ng Zugabe: WF (ng/ml) $\pm$ SE	10 ng Zugabe: WF (ng/ml) $\pm$ SE	5 ng Zugabe: WF (ng/ml) $\pm$ SE	2 ng Zugabe: WF (ng/ml) $\pm$ SE
1	1,3 $\pm$ 0,06	19,7 $\pm$ 2,15	10,9 $\pm$ 1,19	5,3 $\pm$ 0,12	2,0 $\pm$ 0,22
2	2,7 $\pm$ 0,11	22,0 $\pm$ 1,72	9,5 $\pm$ 1,44	5,0 $\pm$ 0,74	2,8 $\pm$ 1,22
3	11,0 $\pm$ 0,65	19,4 $\pm$ 1,71	10,3 $\pm$ 0,50	5,0 $\pm$ 0,52	2,3 $\pm$ 0,16

Die errechnete Wiederfindung betrug ( $\bar{x} \pm$  SE) 101,7 %  $\pm$  4,66. Weder die Ergebnisse der wiederholten Messungen der drei Magermilchproben, noch die Wiederholungsmessungen der Proben mit den unterschiedlichen IGF-1-Zugaben unterschieden sich signifikant (Bonferroni-Test,  $p > 0,1$ ). Die Wiederfindung war unabhängig sowohl von der zugesetzten Menge IGF-1 als auch von der ursprünglichen IGF-1-Konzentration der Magermilch.

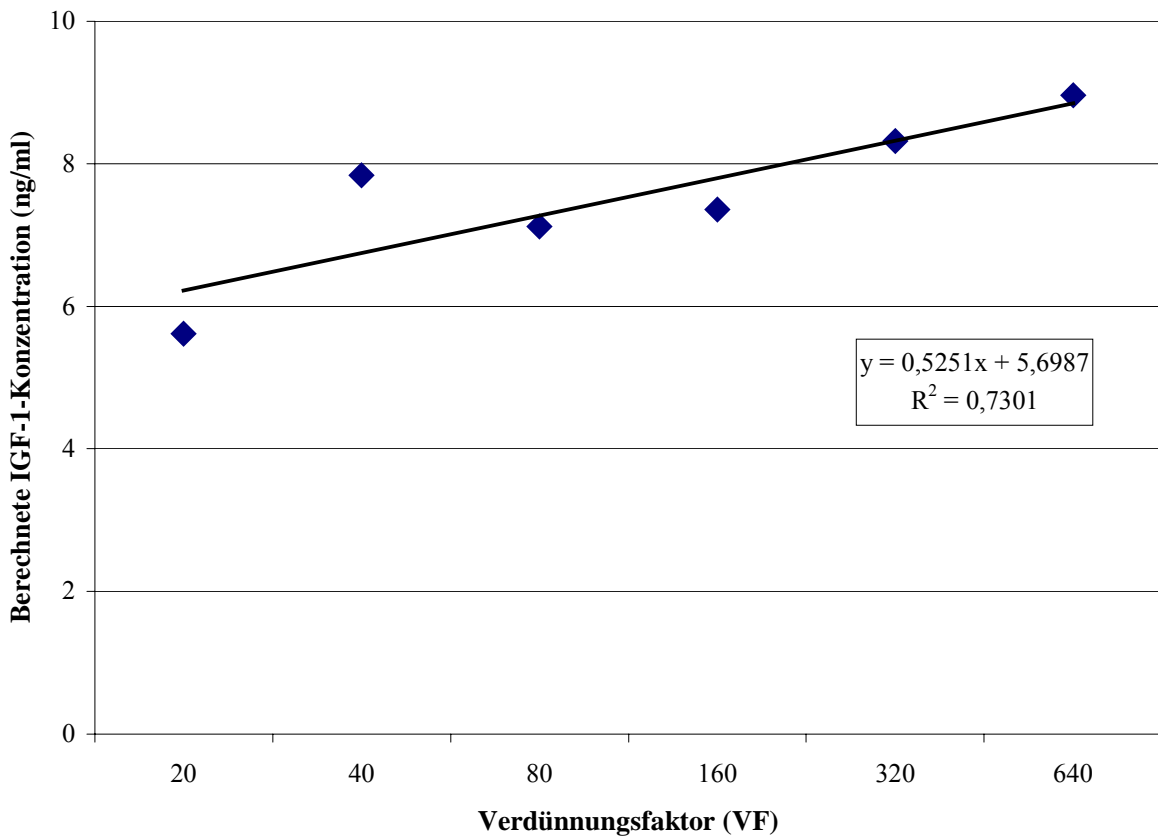
### Parallelität

Mit einer ungestörten (bio-)chemischen Analyse- bzw. Meßmethode wird im Arbeitsbereich der Standardkurve, unabhängig von der Verdünnungsstufe, ein konstanter Gehalt des Analyten ermittelt, das heißt das Produkt aus Verdünnungsfaktor und jeweils gemessener Stoffkonzentration ist konstant. Trägt man diese Produkte in ein Koordinatensystem ein, so verläuft eine durch sie gelegte Gerade im idealen, ungestörten System parallel zur Abszisse. Zur Überprüfung der Parallelität des IGF-1-RIA wurde eine Magermilchprobe mit relativ hoher IGF-1-Konzentration (45,7 ng/ml) zunächst wie für einen normalen Ansatz 1:10 verdünnt. Entsprechend dem Vorgehen beim Ansetzen der Standardkurve wurden weitere acht 1:2-Verdünnungsschritte durchgeführt und schließlich jede Verdünnungsstufe im Vierfachansatz gemessen. Abbildung 3.1 zeigt den Verlauf der Magermilchverdünnungsreihe, ausgehend von der 1:10 verdünnten Probe.



**Abbildung 3.1:** Verlauf der Magermilchverdünnungsreihe

Trägt man die gemessene IGF-1-Konzentration gegen den Verdünnungsfaktor (VF) auf, so zeigt sich, daß mit zunehmender Verdünnung steigende IGF-1-Konzentrationen gemessen werden. Die lineare Regressionsformel lautet  $c_{(IGF-1)} = 0,525 * VF + 5,6987$  ( $R^2 = 73.0 \%$ ). Die Steigung der Geraden zeigt den Störeinfluß der IGF-2-Zugabe. Sie deutet auf eine Zunahme der Störung mit steigender Verdünnung der Proben hin (Abbildung 3.2), ist aber statistisch nicht signifikant verschieden von 0 ( $p = 0,0630$ ).

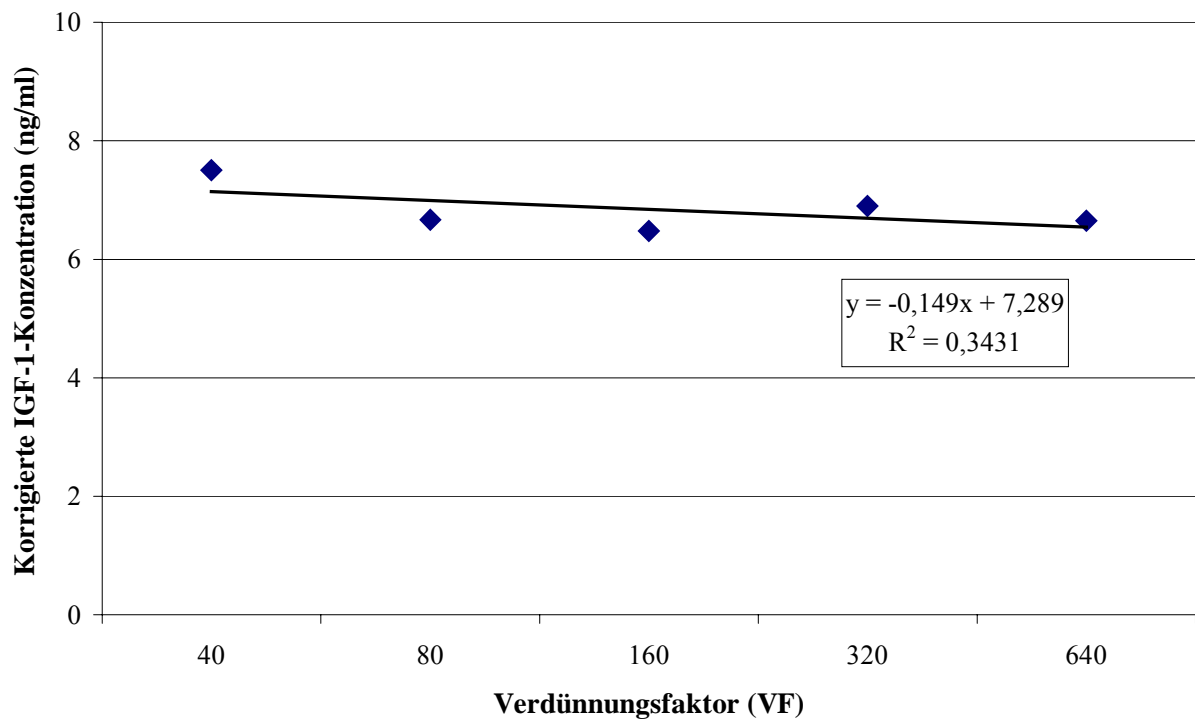


**Abbildung 3.2:** Errechnete IGF-1-Konzentration in Magermilch bei zunehmender Probenverdünnung (gemessene Konzentration x VF, ohne Korrektur des IGF-2-Störeinflusses)

Die Kreuzreaktion zu IGF-2 kann mittels exponentieller Regressionsformel erfaßt und berechnet, anschließend kann der gemessene IGF-1-Wert um den vorgetäuschten Betrag, der mit steigender Verdünnung zunimmt, korrigiert werden (Daxenberger et al., 1998). Nach der mathematischen Korrektur wird die Parallelität der IGF-1-Bestimmung deutlich (Abbildung 3.3): die errechnete Regressionsformel der Verdünnungsgeraden

$c_{(IGF-1)} = -0,1490 * VF + 7,2890$  ( $R^2 = 34,3 \%$ ) zeigt keine signifikant von 0 verschiedene Steigung ( $p = 0,5277$ ).

Bei einer IGF-2-Zugabe von 500 ng/ml Magermilch ist der IGF-1-Nachweis verdünnungsunabhängig und damit ungestört. Gemessene und korrigierte IGF-1-Konzentrationen weichen bei den verwendeten Verdünnungsstufen nicht wesentlich voneinander ab. Somit kann auf eine mathematische Korrektur der Meßwerte verzichtet werden (Daxenberger, 1998). Dies wird durch die Genauigkeit des Tests (Wiederfindung = 107 %) bestätigt.

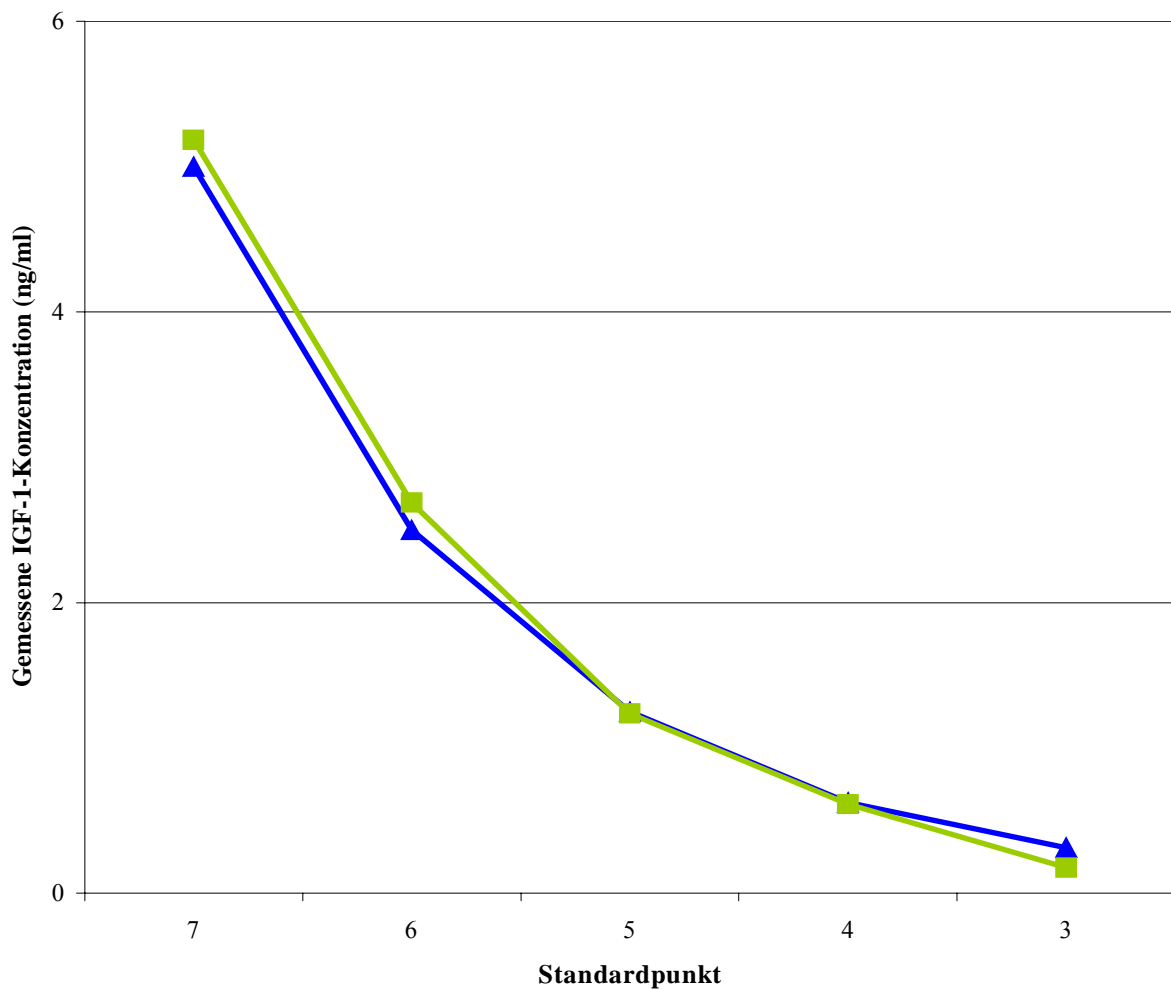


**Abbildung 3.3:** Korrigierte IGF-1-Konzentration in Magermilch bei zunehmender Probenverdünnung (gemessene Konzentration x VF, korrigiert auf den Störeinfluß des IGF-2)

*Einfluß des Konservierungsmittels Borsäure*

Die Konservierung der Milchproben erfolgte durch Zugabe von 0,18 g Borsäure zu 30 ml Milch. Um nachzuweisen, daß das Konservierungsmittel die IGF-1-Messung nicht beeinträchtigt, wurde eine Standardreihe in Puffer A angesetzt, eine zweite in Puffer A mit Borsäurezusatz (0,18 g Borsäure/30 ml Puffer A).

Die jeweils meßbaren IGF-1-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,08$ ), das Konservierungsmittel beeinträchtigte das Analyseverfahren nicht (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4:** Wiederfindung von IGF-1 in Puffer A (▲) und in Puffer A mit Borsäurezugabe (■), Arbeitsbereich der Standardkurve

### 3.4 Materialien und Geräte

#### 3.4.1 Laborgeräte

Gammazähler	1470 WIZARD™ Gamma Counter, Wallac, Finnland
Magnetheizrührer	MR 2000, Heidolph, Kelheim
pH-Meter	WTW pH 537, Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Pipetten	Reference®, Eppendorf, Hamburg Multipette® plus, Eppendorf, Hamburg
Pipettierstation	Hamilton MicroLab plus 1000, Hamilton, Darmstadt
Schüttler	SI Vortex Genie 2 TM, Heidolph, Kelheim
Waage	Sartorius BP 2100 S, Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Sigma EK 10, M. Christ, Osterode

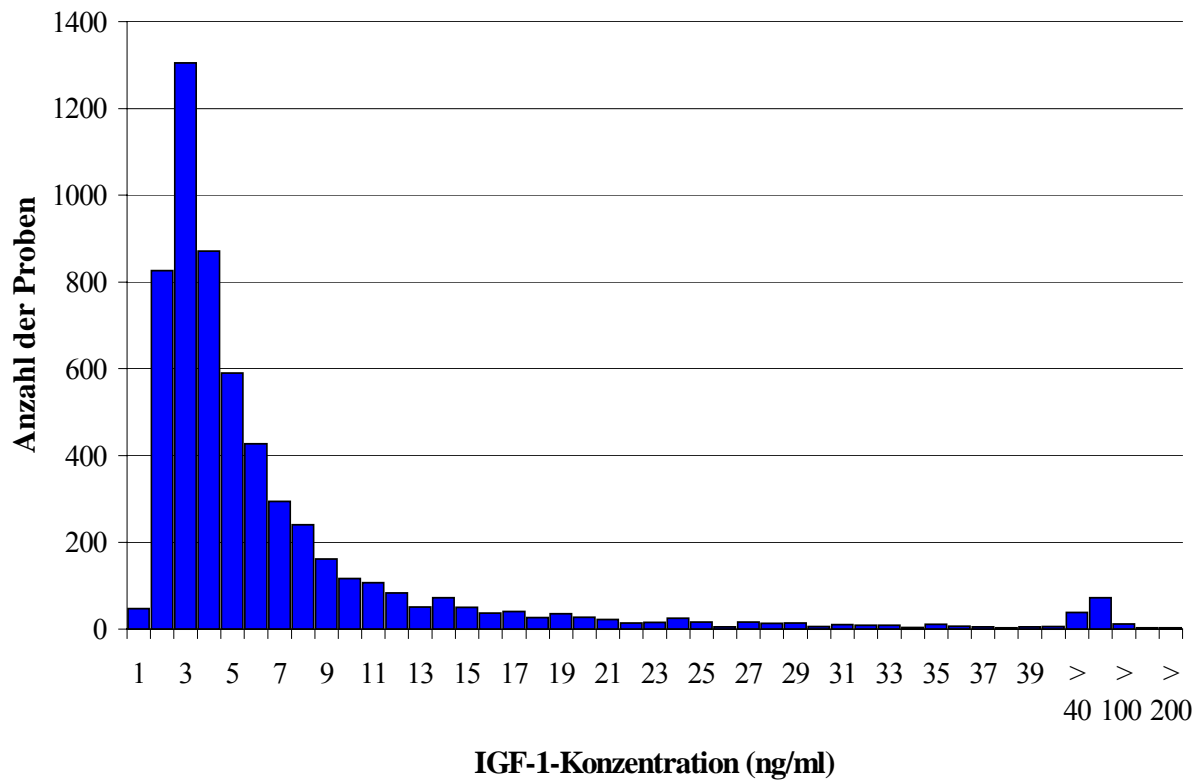
#### 3.4.2 Materialien

Ansatzröhrchen 5 ml	Sarstedt 55.525
Inkubationsröhrchen 3,5 ml	Sarstedt 55.535
Milchprobenröhrchen	Sarstedt 51.595.002

### 3.5 Statistische Auswertungen

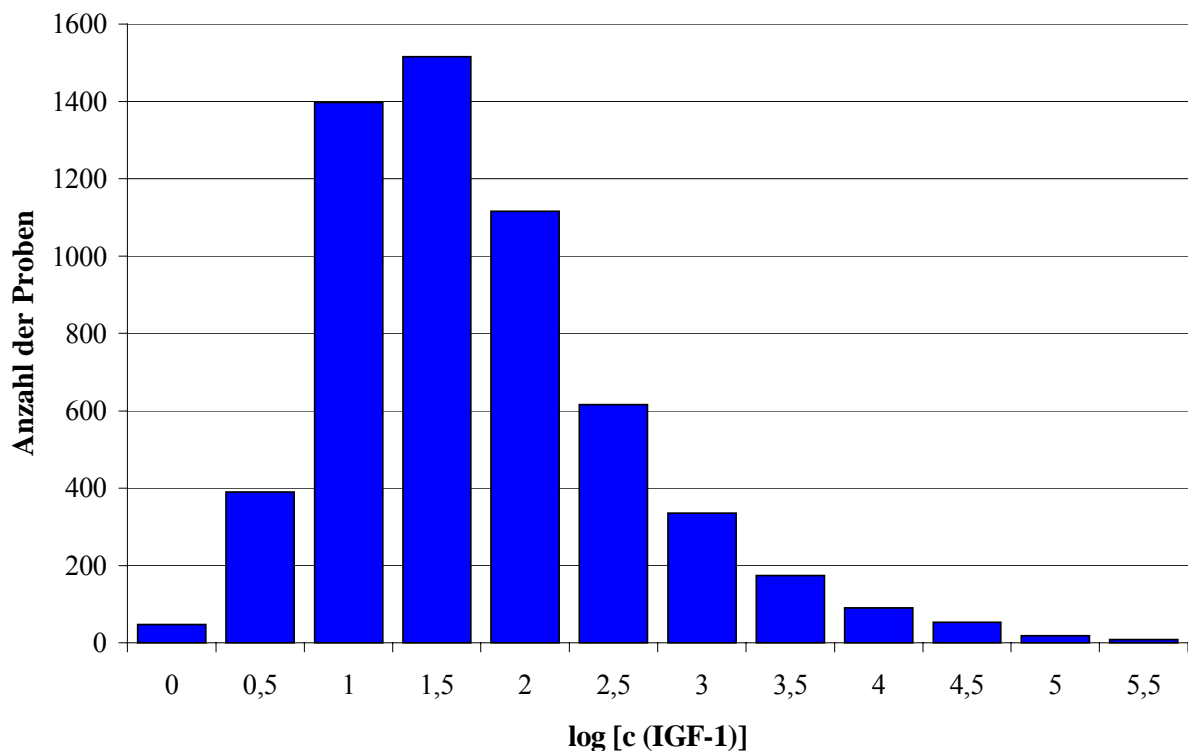
#### 3.5.1 Datenstruktur

Insgesamt wurden 5728 Viertelanfängsgemelksproben von 571 Kühen, die mindestens einmal beprobt worden waren, untersucht. Die gemessenen IGF-1-Konzentrationen wiesen eine linkssteile Häufigkeitsverteilung auf, für die nach rechts kein genauer Grenzwert angegeben werden konnte (Abbildung 3.5). Der Median der Verteilung lag bei 3,8 ng/ml, die Perzentilen für 90 und 95 % lagen bei 13,6 bzw. 22,4 ng/ml. Der arithmetische Mittelwert der in Magermilch gemessenen Konzentrationen betrug 7,0 ng/ml.



**Abbildung 3.5:** Relative Häufigkeit der in der Magermilch von Viertelanfängsgemelksproben gemessenen IGF-1-Konzentrationen (n = 5728)

Voraussetzung für die Berechnung linearer Modelle ist Varianzhomogenität, Unabhängigkeit der fixen Effekte und die Normalverteilung des zugrundeliegenden Datenmaterials. Um die gemessenen IGF-1-Konzentrationen in lineare Modelle einsetzen zu können, mußte die linkssteile Häufigkeitsverteilung soweit wie möglich einer Normalverteilung angenähert werden. Dazu wurden die gemessenen Werte logarithmisch transformiert. Die bei dieser Rechenoperation entstandenen dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen sind dimensionslose Zahlen. Die Häufigkeitsverteilung dieser Werte ist in Abbildung 3.6 dargestellt und zeigt, daß das Ziel, die Normalverteilung der Daten, soweit möglich, erreicht wurde.



**Abbildung 3.6:** Relative Häufigkeit der dekadischen Logarithmen der in der Magermilch von Viertelanfängsgemelksproben von 571 Kühen gemessenen IGF-1-Konzentrationen ( $\log [c (\text{IGF-1})]$ ,  $n = 5728$ )

Der Median der Verteilung der logarithmierten Meßwerte lag bei 1,3218, die Perzentilen für 90 und 95 % bei 2,6101 bzw. 3,1101. Der arithmetische Mittelwert der dekadischen Logarithmen lag bei 1,4742.

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen wurden nach der von den Vereinigten Informationssystemen Tierhaltung w. V. (2001) vorgeschlagenen Formel zum Linear Somatic Cell Score umgerechnet:

$$\text{LSCS} = \log_2 (\text{Zellzahl} / 100.000) + 3$$

Auch hier wurde eine annähernde Normalverteilung der Daten erreicht. Der arithmetische Mittelwert der LSCS lag bei 2,39, der Median bei 2,11, und die Perzentilen für 90 bzw. 95 % lagen bei 5,67 bzw. 6,70.

### **3.5.2 Definitionen in den statistischen Modellen**

#### *Herdensaison*

In jedem der acht Betriebe, deren Daten in die statistische Auswertung eingingen, wurden die Proben der Monate Mai–September als Proben der Sommersaison, die in den Monaten Oktober–Dezember gezogenen Proben als Proben der Wintersaison zusammengefaßt, das heißt, die Saison wurde innerhalb des Betriebs genestet. So ergaben sich in den Modellen 16 Effektstufen für die Herdensaison.

#### *Rasse*

Die Daten der Angler-Rinder konnten in die statistischen Auswertungen nicht einbezogen werden. Zur Testung des Einflusses der Rasse wurden die Proben von Doppelnutzungstieren der Gruppe der Rotbunten Kühe zugerechnet. So ergaben sich für den Einfluß der Rasse die Effektstufen „Rotbunt“ und „Schwarzbunt“.

#### *Laktationsnummer*

Die Kühe wurden anhand ihrer Laktationsnummer in drei Altersstufen eingeteilt. Stufe eins umfaßte die Erstlaktierenden, Stufe zwei die Kühe in der zweiten Laktation, Stufe drei alle Kühe mit Laktationsnummer drei und höher.

### *Laktationsabschnitt*

Die Kühe wurden anhand des Laktationstages in drei Gruppen eingeteilt. Da die IGF-1-Konzentrationen im Kolostrum extrem hohe Werte erreichen, wurden Proben von Tieren in der Kolostralphase in der Auswertung nicht berücksichtigt. In der Gruppe „Frühlaktation“ waren Tiere vom 5. bis einschließlich 80. Laktationstag. Die Gruppe „Hochlaktation“ umfaßte die Kühe vom Laktationstag 81 bis 240. Als „altmelkend“ wurden die Tiere ab dem 241. Laktationstag bezeichnet.

### *Trächtigkeitsstadium*

Alle Kühe mit gesicherten Angaben über den Trächtigkeitszustand (Kalbungs-, Besamungsdaten, Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung [TU]) wurden entsprechend der Dauer ihrer Trächtigkeit zusammengefaßt in „nicht tragend“, „tragend 1“ (Trächtigkeitstag 1–34), „tragend 2“ (Tag 35–100), „tragend 3“ (Tag 101–200) und „tragend 4“ (länger als 200 Tage trächtig). Die Einteilung der Trächtigkeit erfolgte analog zu Angaben über Veränderungen während der Trächtigkeit bei Gropp und Schuhmacher (1993), Hoffmann (1994) und Sauerwein (1994).

### *Zellzahlklasse*

Anhand der Ergebnisse der Zellzahlbestimmung wurde der Linear Somatic Cell Score (LSCS) für jede Probe berechnet, um auch die Zellzahlen möglichst einer Normalverteilung anzunähern. Nach den Ergebnissen der Umrechnung erfolgte die Einteilung in sieben Zellzahlklassen (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6:** Einteilung der Zellzahlklassen

Zellen pro ml Magermilch	Linear Somatic Cell Score, LSCS	Zellzahlklasse
≤ 25.000	-13,6–1	1
≤ 50.000	> 1–2	2
≤ 100.000	> 2–3	3
≤ 200.000	> 3–4	4
≤ 400.000	> 4–5	5
≤ 800.000	> 5–6	6
> 800.000	> 6	7

### *Befundklasse*

Um den Einfluß des bakteriologischen Befundes einer Milchprobe auf die in ihr nachweisbare IGF-1-Konzentration berechnen zu können, wurden die Viertelanfangsgemelksproben nach den Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchung eingeteilt. Es ergaben sich sieben Effektstufen:

- (1) kein pathogener Keim nachweisbar,
- (2) Nachweis von koagulase-positiven Staphylokokken,
- (3) Nachweis von koagulase-negativen Staphylokokken,
- (4) Nachweis von B-Streptokokken,
- (5) Nachweis von *Sc. uberis*,
- (6) Nachweis von *Sc. dysgalactiae*,
- (7) Mischinfektion = mehr als ein pathogener Keim nachgewiesen.

### *Leistungsklasse*

Zur Überprüfung des Effektes der Milchleistung wurden die Kühe anhand der Ergebnisse der Milchleistungsprüfung in die Gruppen „niedrige Leistung“ (bis einschl. 20 kg Milch pro Tag), „mittlere Leistung“ (20,1–30 kg pro Tag) und „hohe Leistung“ (mehr als 30 kg Milch pro Tag) eingeteilt. Die Milchleistungsprüfung fand jeweils am Tag vor der Viertelanfangsgemelksprobennahme statt.

### *Gesundheitsgruppe Euterviertel*

Entsprechend der Ergebnisse der zytologischen und bakteriologischen Untersuchungen wurden die Viertelanfangsgemelksproben in vier Gesundheitsgruppen eingeteilt:

- (1) normale Sekretion (SCC < 100.000/ml, kein Keim nachweisbar),
- (2) unspezifische Mastitis (SCC > 100.000/ml, kein Keim nachweisbar),
- (3) (sub-) klinische Mastitis (SCC > 100.000/ml, euterpathogener Keim nachgewiesen),
- (4) latente Infektion (SCC < 100.000/ml, euterpathogener Keim nachgewiesen).

### *Nachbarvierteleinfluß*

Um zu klären, ob die Erkrankung eines Nachbarviertels Einfluß auf die IGF-1-Konzentration in der Milch eines noch gesunden Euterviertels hat, wurden alle Viertelanfangsgemelksproben mit normaler Sekretion untersucht. Diese unauffälligen Proben wurden entsprechend der Gesundheitsgruppe Kuh (s. 3.2.3) unterteilt:

- (1) unauffällige Probe aus einem Euter, in dem alle anderen Viertel bei dieser Beprobung ebenfalls normale Sekretion zeigten (Kuh in Gesundheitsgruppe I, vgl. S. 31),
- (2) unauffällige Probe aus einem Euter, in dem mindestens eines der drei anderen Viertel erhöhte Zellzahlen ( $> 100.000/\text{ml}$ ) aufwies (Kuh in Gesundheitsgruppe II, vgl. S. 31),
- (3) unauffällige Probe aus einem Euter, in dem im Sekret mindestens eines der drei anderen Viertel ein euterpathogener Keim nachgewiesen wurde und die Zellzahl höher als  $100.000/\text{ml}$  war (Kuh in Gesundheitsgruppe III, vgl. S. 31),
- (4) unauffällige Probe aus einem Euter, in dem im Sekret mindestens eines der drei anderen Viertel ein euterpathogener Keim nachgewiesen wurden, ohne daß die Zellzahl erhöht war (Kuh in Gesundheitsgruppe IV, vgl. S. 31).

### **3.5.3 Statistische Modelle**

Die Signifikanzen der fixen Effekte für die IGF-1-Konzentrationen wurden mit einem linearen gemischten Modell unter Verwendung der Prozedur MIXED aus dem Programmpaket SAS (2000) ermittelt. Die Prüfung der Ergebnisse auf statistische Relevanz erfolgte mittels F-Test. Zeigte der globale F-Test für einen fixen Effekt Signifikanz an, wurde ein multipler Mittelwertvergleich für die Effektstufen der entsprechenden Einflußgröße mit Hilfe des Bonferroni-Holm-Testes durchgeführt.

In die Auswertung mittels statistischer Modelle gingen die Daten der Angler-Rinder nicht mit ein, da ein Betrieb ausschließlich Angler gehalten hatte. Für die Auswertungen standen somit die Ergebnisse von 5040 Viertelanfangsgemelksproben von 498 Kühen zur Verfügung.

Alle verwendeten Modelle basierten auf folgendem Grundschema:

$$y_{ijklmno} = \mu + HS_i + Vier_j + Lnr_k + Lab_l + kuh_m + e_{ijklmn}$$

$y_{ijklmno}$  = dekadischer Logarithmus der IGF-1-Konzentration des jeweiligen Euterviertels der m-ten Kuh ( $o = 1, \dots$ , je nach Stichprobe)

$\mu$  = allgemeines Mittel

$HS_i$  = fixer Effekt der i-ten Herdensaison ( $i = 1, \dots, 16$ )

$Vier_j$  = fixer Effekt des j-ten Euterviertels ( $j = 1, \dots, 4$ )

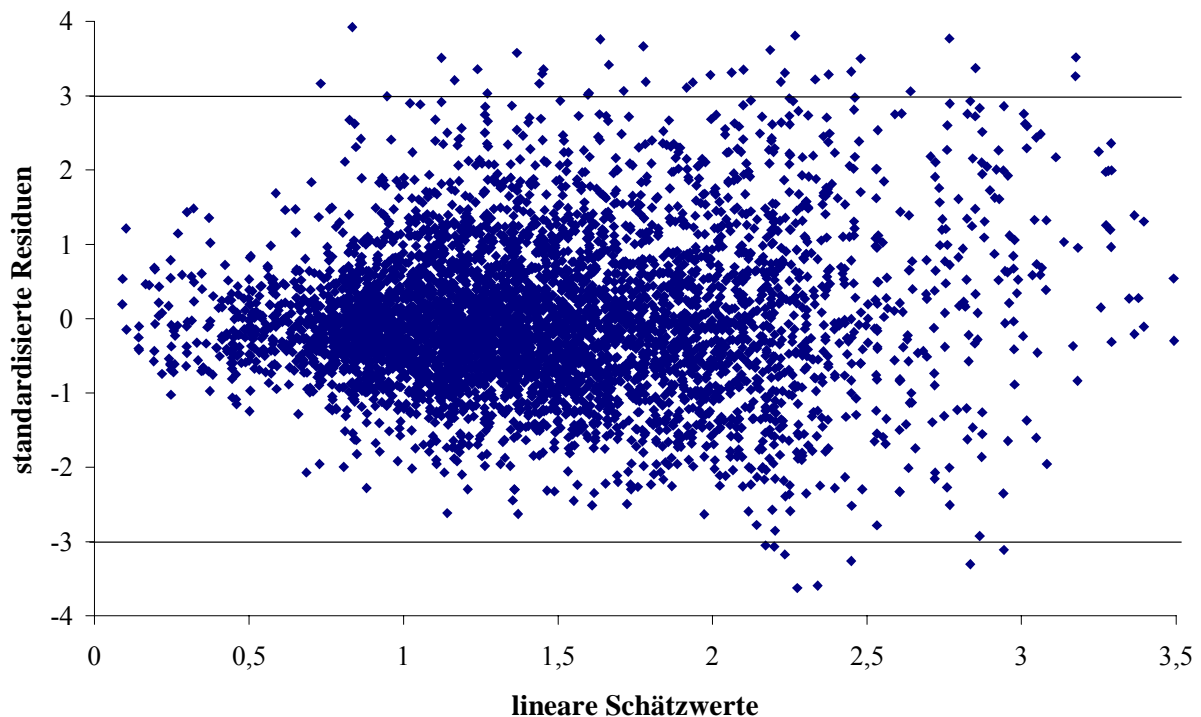
$Lnr_k$  = fixer Effekt der k-ten Laktationsnummer ( $k = 1, 2, 3$ )

$Lab_l$  = fixer Effekt des l-ten Laktationsabschnitts ( $l = 1, 2, 3$ )

$kuh_m$  = zufälliger Effekt der m-ten Kuh ( $m = 1, \dots$ , je nach Stichprobe)

$e_{ijklmn}$  = Restfehler

Beispielhaft soll der Residuenplot dieses Grundmodells als Beweis für die Varianzhomogenität gezeigt werden (Abbildung 3.7). Für jedes verwendete Modell wurde die Varianzhomogenität gesondert überprüft.



**Abbildung 3.7:** Residuenplot des Grundmodells

Auf dieser Grundlage wurden die in Tabelle 3.7 aufgeführten Modelle aufgebaut. Die Unabhängigkeit der fixen Effekte wurde für jedes Modell gesondert getestet.

**Tabelle 3.7:** Verwendete Modelle, fixe Effekte mit Effektstufen sowie die jeweilige Datengrundlage (VGP = Viertelanfangsgemelksprobe)

Modellname	Zusätzliche Effekte	Effektstufen	Anzahl der VGP	Anzahl der Kühe
Eutergesundheit	Zellzahlklasse	7	5040	498
	Befundklasse	7		
	Leistungsklasse	3		
Gesundheitsgruppe	Laktationsabschnitt innerhalb Laktationsnummer	9	5040	498
	Gesundheitsgruppe	4		
	Leistungsklasse	3		
Nachbarvierteleinfluß	Nachbarvierteleinfluß	4	2736	444
	Leistungsklasse	3		
Trächtigkeit	Zellzahlklasse	7	3788	388
	Befundklasse	7		
	Leistungsklasse	3		
	Trächtigkeitsstadium	5		
Tragend (j/n) innerhalb Laktationsabschnitt	Zellzahlklasse	7	3788	388
	Befundklasse	7		
	Leistungsklasse	3		
	Tragend (j/n) innerhalb Laktationsabschnitt	6		
Trächtigkeitsstadium innerhalb Laktationsabschnitt	Zellzahlklasse	7	3788	388
	Befundklasse	7		
	Leistungsklasse	3		
	Trächtigkeitsstadium innerhalb Laktationsabschnitt	15		

Mit der Prozedur GLM des Programmpaketes SAS (2000) wurden die Korrelationen zwischen den dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen und den Linear Somatic Cell Scores der Milchprobe, zwischen LSCS und Vorliegen eines euterpathogenen Keimes in der Probe sowie zwischen der logarithmierten IGF-1-Konzentration und dem Vorliegen eines Keimes in der Milchprobe berechnet. Dabei wurden nur die Beobachtungen in die Auswertung einbezogen, für die alle Merkmale, die das Grundmodell berücksichtigt, vollständig erfaßt waren.

$$y_{ijklmnop} = \mu + HS_i + Vier_j + Lnr_k + Lab(Lnr)_l + Milch_m + kuh_n + e_{ijklmno}$$

$y_{ijklmnop}$  = Korrelation zwischen den p-ten Beobachtungswerten der dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen und den Linear Somatic Cell Scores bzw. des positiven oder negativen Ergebnisses der bakteriologischen Untersuchung der Viertelanfangsgemelksprobe bzw. zwischen den p-ten Beobachtungswerten der Linear Somatic Cell Scores und des positiven oder negativen Ergebnisses der bakteriologischen Untersuchung der Milchprobe ( $p = 1, \dots, 5040$ )

$\mu$	=	allgemeines Mittel	
$HS_i$	=	fixer Effekt der i-ten Herdensaison	( $i = 1, \dots, 16$ )
$Vier_j$	=	fixer Effekt des j-ten Euterviertels	( $j = 1, \dots, 4$ )
$Lnr_k$	=	fixer Effekt der k-ten Laktationsnummer	( $k = 1, 2, 3$ )
$Lab(Lnr)_l$	=	fixer Effekt des l-ten Laktationsabschnitts innerhalb der k-ten Laktationsnummer	( $l = 1, \dots, 9$ )
$Milch_m$	=	fixer Effekt der m-ten Leistungsklasse	( $m = 1, 2, 3$ )
$kuh_n$	=	zufälliger Effekt der n-ten Kuh	( $n = 1, \dots, 498$ )
$e_{ijklmno}$	=	Restfehler	

## 4 Ergebnisse

Von den gesammelten Viertelanfangsgemelksproben (VGP) wurden 5728 Proben auf ihre IGF-1-Konzentration untersucht. Diese Proben stammten von 571 Kühen, die jeweils mindestens einmal beprobt worden waren. Die Probenentnahme erfolgte zwischen Mai und Dezember 1998 einmal monatlich auf neun Betrieben.

Nach den Ergebnissen der bakteriologischen und zytologischen Untersuchungen der Milchproben wurden sowohl die beprobten Kühe als auch die einzelnen VGP in Gesundheitsgruppen eingeteilt (Schema Gesundheitsgruppe Kuh s. 3.2.3). Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Verteilung der Kühe und der VGP auf die Gesundheitsgruppen.

**Tabelle 4.1:** Verteilung aller beprobten Kühe und der Viertelgemelksproben auf die vier Gesundheitsgruppen (SCC = somatic cell count)

Gesundheitsgruppe Kuh (beprobte Tiere: n = 1432)			
Gruppe	Definition	n	%
I	normale Sekretion auf allen vier Vierteln (SCC < 100.000/ml, bakteriologisch negativ)	322	22,5
II	mind. 1 Viertel mit SCC > 100.000/ml, dieses Viertel bakteriologisch negativ (unspezifische Mastitis)	334	23,3
III	mind. 1 Viertel mit SCC > 100.000/ml, dieses Viertel bakteriologisch positiv ([sub-]klinische Mastitis)	469	32,8
IV	mind. 1 Viertel mit SCC < 100.000/ml, dieses Viertel bakteriologisch positiv (latente Infektion)	307	21,4
Gesundheitsgruppe Euterviertel (untersuchte Viertelanfangsgemelksproben: n = 5728)			
Gruppe	Definition	n	%
I	normale Sekretion	3079	53,8
II	unspezifische Mastitis	1306	22,8
III	(sub-)klinische Mastitis	741	12,9
IV	latente Infektion	602	10,5

In Tabelle 4.2 sind die Signifikanzen aller mittels F-Test untersuchten fixen Effekte zusammengestellt.

**Tabelle 4.2:** Im F-Test ermittelte Signifikanzen der fixen Effekte

Effekt	Effektstufen	F-Test: p <
Herdensaison	16	0,0001
Euterviertel	4	0,01
Laktationsnummer	3	0,0001
Laktationsabschnitt	3	0,0001
Zellzahlklasse	7	0,0001
Befundklasse	7	0,001
Leistungsklasse	3	0,0001
Tragend*Laktationsabschnitt	6	0,0001
Trächtigkeitsstadium	5	0,0001
Gesundheitsgruppe	4	0,0001
Nachbarvierteleinfluß	4	0,01
Rasse	2	n. s.
Befund j/n	2	0,0001

## 4.1 Physiologische Einflußfaktoren auf die IGF-1-Konzentrationen in der Milch

### 4.1.1 Rasse

Von den untersuchten 571 Kühen waren 253 Deutsche Holsteins der Farbrichtung Schwarz, 237 Deutsche Holsteins der Farbrichtung Rot, 73 Kühe gehörten der Rasse Deutsches Rotvieh/Angler an und acht waren Deutsche Rotbunte (Doppelnutzung) (Rassenbezeichnungen nach: Deutscher Holstein Verband e.V., 2002).

Aufgrund der Verteilung der Kühe verschiedener Rassen auf den einzelnen Betrieben mußten die Ergebnisse der Proben der Angler-Rinder aus der statistischen Auswertung herausgenommen werden. Die Doppelnutzungstiere wurden den Deutschen Holsteins der Farbrichtung Rot zugerechnet. In die statistischen Auswertungen mittels Modell wurden somit die Daten von 498 mindestens einmal beprobten Kühen mit insgesamt 5040 Viertelgemelksproben einbezogen.

Tabelle 4.3 zeigt die Verteilung der untersuchten und statistisch ausgewerteten Kühe und Viertelgemelksproben auf die zwei Rassen.

**Tabelle 4.3:** Absolute Häufigkeit und prozentuale Verteilung der statistisch ausgewerteten Kühe (n = 498) und Viertelgemelksproben (n = 5040) auf die verschiedenen Rassen

Rasse	Kühe		Viertelgemelksproben	
	Anzahl (n)	%	Anzahl (n)	%
Rotbunt	245	49,2	2664	52,9
Schwarzbunt	253	50,8	2376	47,1

Tendenziell wurden bei Kühen der Rasse Deutsche Holstein, Farbrichtung Schwarz niedrigere IGF-1-Konzentrationen gemessen als bei Tieren der Farbrichtung Rot bzw. den Doppelnutzungstieren. Dieser Unterschied ließ sich anhand des vorliegenden Datenmaterials statistisch jedoch nicht absichern, der Faktor „Rasse“ hatte keinen signifikanten Einfluß auf die IGF-1-Konzentration (F-Test:  $p > 0,1$ ). In den folgenden statistischen Modellen wurde der fixe Effekt der Rasse deswegen nicht berücksichtigt.

### 4.1.2 Euterviertel

Das Euterviertel, aus dem die jeweilige Milchprobe stammte, hatte einen signifikanten Einfluß (F-Test:  $p = 0,01$ ) auf die IGF-1-Konzentration.

In Magermilchproben aus den rechten Vordervierteln wurden die niedrigsten IGF-1-Konzentrationen gemessen. Die hier ermittelten Werte unterschieden sich signifikant von den in linken Hintervierteln gemessenen Konzentrationen (Bonferroni:  $p < 0,05$ ; Tabelle 4.4). Die Unterschiede zwischen den IGF-1-Konzentrationen der Proben aus den anderen Vierteln ließen sich statistisch nicht absichern.

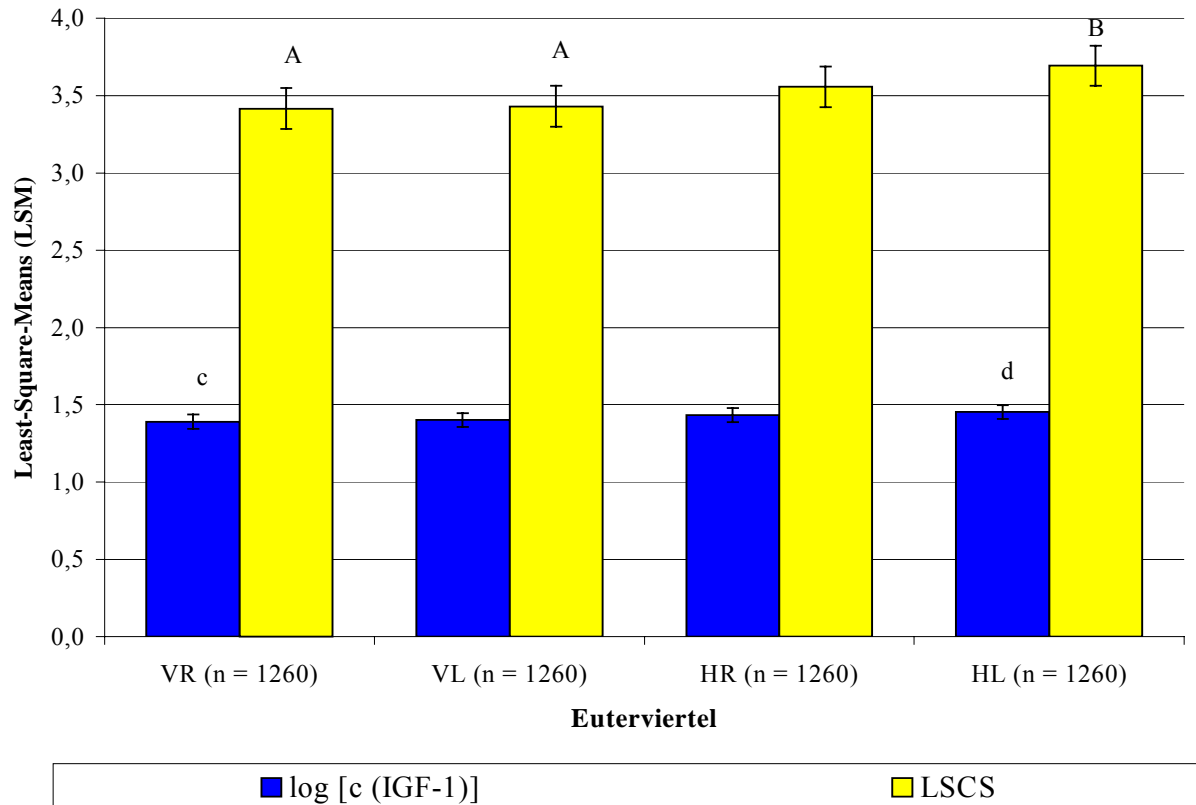
Eine Rückrechnung der logarithmierten Werte in ng/ml-Konzentrationsangaben, die zur Verbesserung der Anschaulichkeit der Gruppenvergleiche durchgeführt wurde, ergab Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben der verschiedenen Euterviertel von unter 1,1 ng/ml.

**Tabelle 4.4:** Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelanzfangsgemelksproben aus unterschiedlichen Eutervierteln ( $n = 5040$ ) sowie die Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml  
Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>ab</sup>  $p < 0,05$ )

Euterviertel	n	LSM	SE	Differenz in ng/ml
VR	1260	1,3906 <sup>a</sup>	0,0453	+ 1,06
VL	1260	1,4015	0,0457	+ 0,70
HR	1260	1,4337	0,0451	+ 0,17
HL	1260	1,4537 <sup>b</sup>	0,0449	0,00

In Abbildung 4.1 sind die Least-Square-Mittelwerte der nach den in den Milchproben der einzelnen Euterviertel gemessenen Zellzahlen errechneten Linear Somatic Cell Scores (LSCS) neben den Least-Square-Mittelwerten der dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen dargestellt. Auch die LSCS der einzelnen Euterviertel sind mit statistischem Modell berechnet und so auf die Einflüsse von Herdensaison, Laktationsabschnitt, Laktationsnummer, Befund und Leistung korrigiert. Zwischen den LSCS der Proben aus den beiden

Vordervierteln und den LSCS der Milchproben der linken Hinterviertel besteht ein statistisch signifikanter Unterschied (Bonferroni:  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 4.1:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen (log [c (IGF-1)]) sowie der Linear Somatic Cell Scores (LSCS) der einzelnen Euterviertel

Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>AB</sup>  $p < 0,001$ , <sup>cd</sup>  $p < 0,01$ )

### 4.1.3 Laktationsnummer und Laktationsabschnitt

Tabelle 4.5 zeigt die Altersstruktur in der untersuchten Stichprobe, veranschaulicht an den Laktationsnummern der Kühe, deren Milchproben untersucht wurden, sowie die Laktationsabschnitte, in denen die Viertelanfängsgemelksproben entnommen wurden.

Fast ein Drittel der untersuchten Milchproben stammte von Färsen, knapp die Hälfte der Proben von Tieren, die mindestens zum dritten Mal gekalbt hatten. Etwa ein Fünftel der Proben wurde innerhalb des Zeitraums vom fünften bis zum 80. Laktationstag entnommen, 42 % in der Hoch- und 36 % in der Spätlaktation.

**Tabelle 4.5:** Absolute Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Viertelanfängsgemelksproben (n = 5040) auf Laktationsnummer und -abschnitt der beprobten Kühe

		n	%
Laktationsnummer	1	1520	30,2
	2	1060	21,0
	≥ 3	2460	48,8
Laktationsabschnitt	Tag 5–80	1096	21,7
	Tag 81–240	2132	42,3
	≥ Tag 241	1812	36,0

Das Alter bzw. die Laktationsnummer der Kühe hatte einen signifikanten Einfluß auf die in den Magermilchproben gemessenen IGF-1-Konzentrationen (F-Test:  $p < 0,0001$ ).

Mit steigender Laktationsnummer nahm auch die IGF-1-Konzentration zu. Die in der ≥ 3. Laktation gemessenen IGF-1-Werte waren signifikant höher als die in Proben aus der ersten (Bonferroni:  $p < 0,001$ ) bzw. zweiten Laktation (Bonferroni:  $p < 0,01$ ).

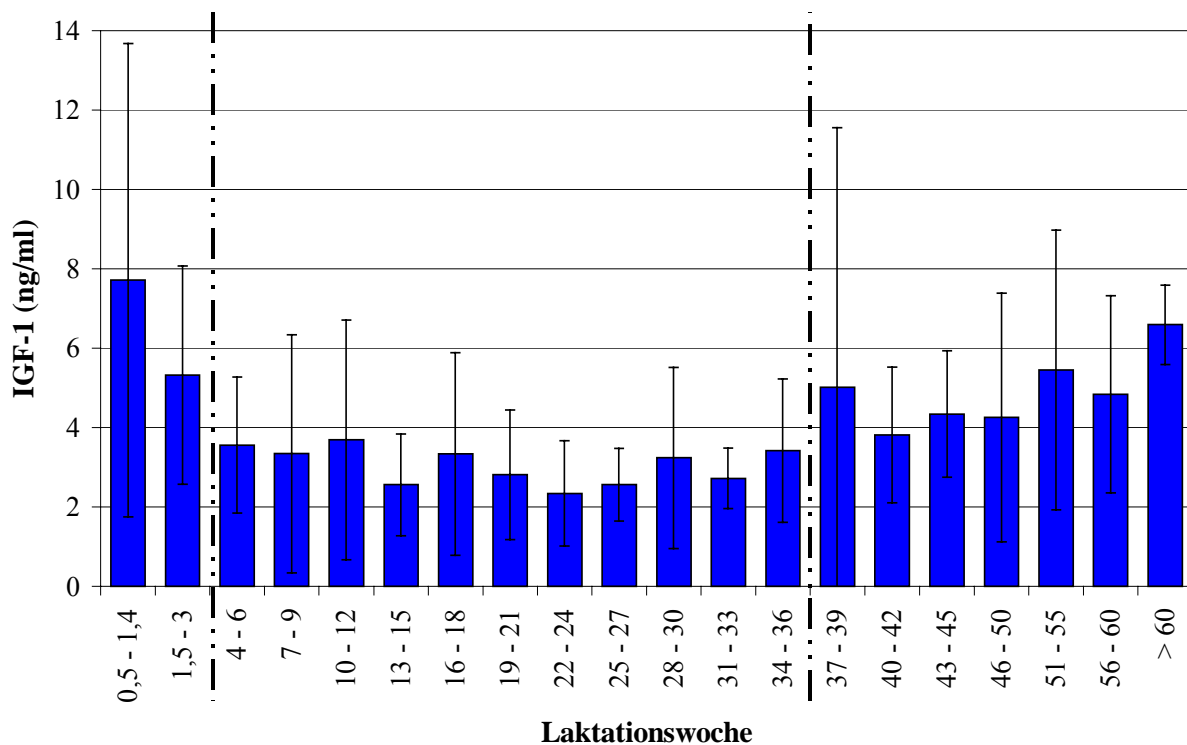
Eine Rückrechnung der logarithmierten Werte in Konzentrationsangaben (ng/ml) ergab zwischen der ersten und zweiten Laktation eine Zunahme der IGF-1-Konzentrationen um 1,26 ng/ml. Zwischen der zweiten und ≥ 3. Laktation stiegen die Konzentrationen nochmals um 2,01 ng/ml. Die Differenz zwischen den Konzentrationen in Milchproben aus der ersten und Proben aus der ≥ 3. Laktation betrug insgesamt 3,27 ng/ml (Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6:** Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) aus unterschiedlichen Laktationen sowie Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>cd</sup> p < 0,01, <sup>AB</sup> p < 0,001)

Laktationsnummer	n	LSM	SE	Differenz in ng/ml
1	1520	1,2805 <sup>cA</sup>	0,0514	- 3,27
2	1060	1,4132 <sup>d</sup>	0,0525	- 2,01
≥ 3	2460	1,5660 <sup>cB</sup>	0,0471	0,00

Der Laktationsabschnitt, in dem sich die Kuh am Tag der Probennahme befand, übte ebenfalls einen signifikanten Einfluß auf die IGF-1-Konzentration aus (F-Test: p < 0,0001).

Die unlogarithmierten IGF-1-Konzentrationen in den Viertelanfängsgemelksproben (n = 1288) der 202 z. T. mehrmals beprobten Kühe der Gesundheitsgruppe I (eutergesund), sind in Abbildung 4.2 über den Verlauf der Laktation dargestellt.



**Abbildung 4.2:** Verlauf der IGF-1-Konzentration in Magermilchproben (arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler in Viertelgemelksproben der eutergesunden Kühe, Gesundheitsgruppe I) in Abhängigkeit von der Laktationswoche (n = 1288)

Nach der Kolostralphase (ab dem fünften Laktationstag) enthielten die Magermilchproben noch bis zu 14 ng/ml IGF-1. Zwischen der 4. bis zur 36. Laktationswoche sanken die Konzentrationen auf ein Plateau bei durchschnittlich  $< 4$  ng/ml. In der Spätlaktation stiegen die IGF-1-Konzentrationen zum Trockenstellen hin wieder an. Hier wurden Werte bis zu 12 ng/ml gemessen.

Die IGF-1-Konzentrationen in Milchproben mit unphysiologischer Zellzahl und/oder Keimbefall waren stark verändert. Deswegen wurde auf die Darstellung der unlogarithmierten und nicht statistisch auf pathologische Einflüsse korrigierten IGF-1-Werte in Proben von Kühen der Gesundheitsgruppen II – IV verzichtet.

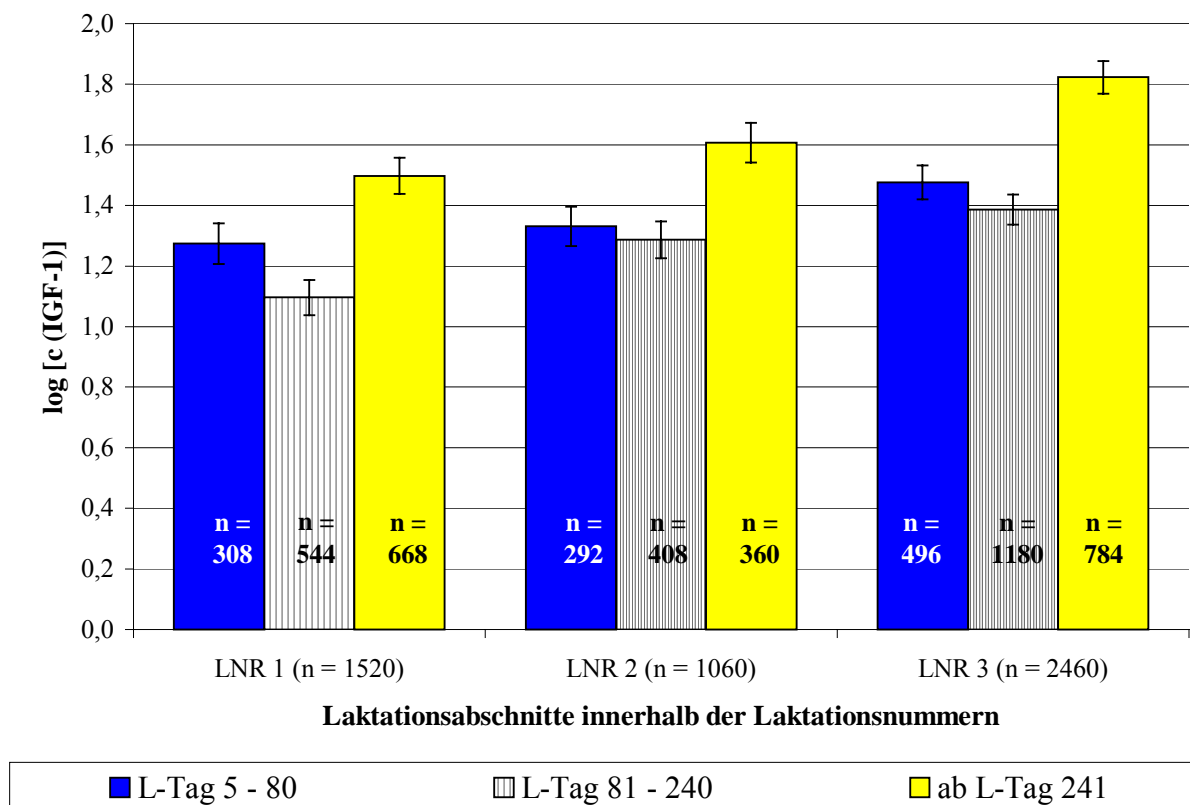
Im statistischen Modell ergab die Auswertung der Ergebnisse aller 5040 VGP signifikante Unterschiede (Bonferroni:  $p < 0,001$ ) zwischen den IGF-1-Konzentrationen in den Magermilchproben der früh- bzw. hochlaktierenden Tiere und den in der Spätlaktation gewonnenen Proben. Die IGF-1-Konzentrationen in der Milch der Frühlaktierenden unterschieden sich signifikant (Bonferroni:  $p < 0,01$ ) von den Konzentrationen in der Milch der Tiere in Hochlaktation. Von der Früh- zur Hochlaktation fielen die Konzentrationen um 0,73 ng/ml ab, um nach der Hochlaktation wieder um 4,09 ng/ml anzusteigen.

Tabelle 4.7 gibt einen Überblick über die Least-Square-Mittelwerte der dekadischen Logarithmen der in den einzelnen Laktationsabschnitten gemessenen IGF-1-Konzentrationen sowie die Differenzen zwischen den Laktationsabschnitten in ng/ml.

**Tabelle 4.7:** Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben ( $n = 5040$ ) aus unterschiedlichen Laktationsabschnitten sowie die Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml  
Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>AB</sup>  $p < 0,001$ , <sup>cd</sup>  $p < 0,01$ ).

Laktationsabschnitt	n	LSM	SE	Differenz in ng/ml
Tag 5–80	1096	1,3561 <sup>Ac</sup>	0,0485	- 3,36
Tag 81–240	2132	1,2510 <sup>Ad</sup>	0,0450	- 4,09
≥ Tag 241	1812	1,6525 <sup>B</sup>	0,0481	0,00

In Abbildung 4.3 sind die Least-Square-Mittelwerte der IGF-1-Konzentrationen für die Kühe der drei Altersklassen vergleichend nebeneinander dargestellt. Jede Altersklasse wurde nochmals unterteilt in die drei Laktationsabschnitte. Dabei ist zum einen der Anstieg der Konzentrationen mit steigendem Alter (steigender Laktationsnummer) ersichtlich, zum anderen der Kurvenverlauf der IGF-1-Werte über die Laktationsabschnitte, der schon bei der Betrachtung der unlogarithmierten Mittelwerte deutlich wurde (F-Test:  $p < 0,0001$ ). Es ergeben sich im paarweisen Vergleich signifikante Unterschiede zwischen den IGF-1-Konzentrationen in Milch von Tieren mit der LNR 1, Hoch- und Spätlaktation sowie zwischen den Proben der hochlaktierenden Kühe mit den LNR 1 und 3 (Bonferroni:  $p < 0,001$ ).

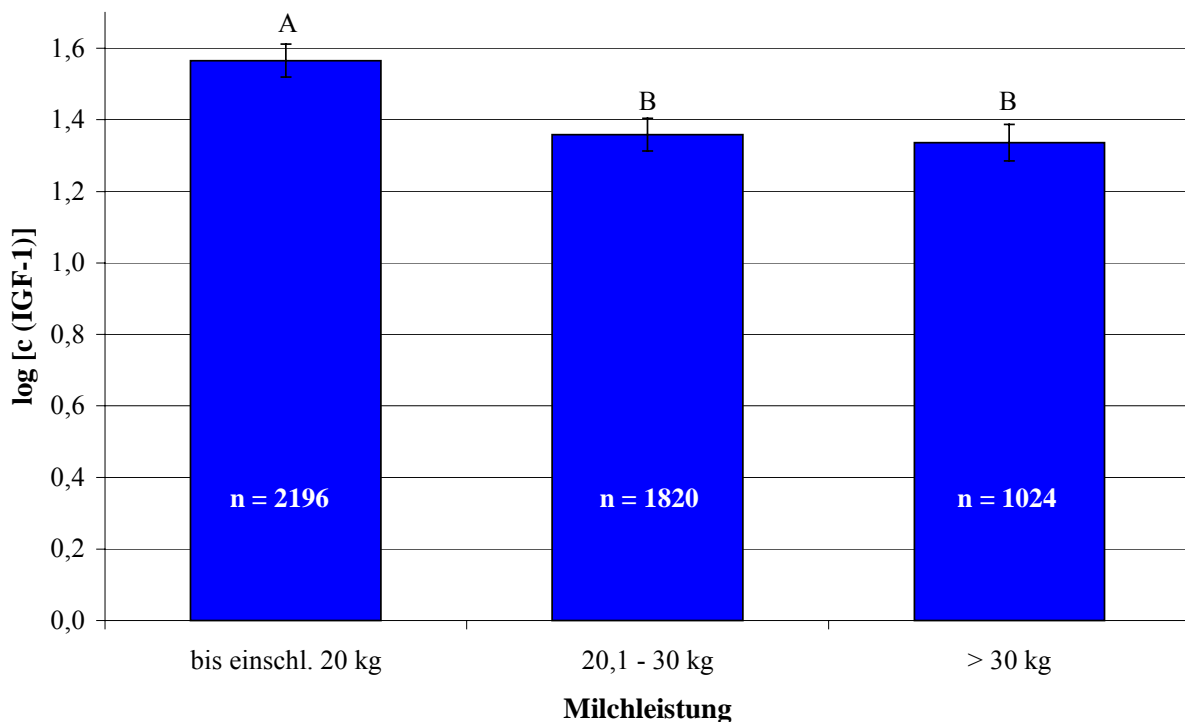


**Abbildung 4.3:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) aus den drei Laktationsabschnitten von Kühen mit unterschiedlichen Laktationsnummern  
F-Test:  $p < 0,0001$   
LNR: Laktationsnummer, L-Tag: Laktationstag, LNR 3: Laktationsnummern 3 und größer

#### 4.1.4 Milchleistung

Die Milchleistung der beprobten Kühe, die anhand der im Rahmen der Milchleistungsprüfung erfaßten Daten berechnet wurde, lag bei durchschnittlich 22,8 kg Milch pro Tag mit 4,4 % Fett und 3,6 % Eiweiß. Die Milchleistung der Kühe hatte einen signifikanten Einfluß auf die IGF-1-Konzentration (F-Test:  $p < 0,0001$ ). Je höher die Leistungsklasse, desto niedriger waren die gemessenen IGF-1-Konzentrationen (Abbildung 4.4).

Bei Kühen, deren Milchleistung unter 20 kg lag, waren die Least-Square-Mittelwerte der IGF-1-Konzentrationen signifikant höher als bei den Kühen der beiden höheren Leistungsklassen (Bonferroni:  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 4.4:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben ( $n = 5040$ ) von Kühen in drei Leistungsklassen  
Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>AB</sup>  $p < 0,001$ )

Zwischen den IGF-1-Konzentrationen, die in Proben von Kühen der niedrigsten Leistungsklasse gemessen wurden (Tagesleistung  $\leq 20$  kg), und den Konzentrationen in Proben der Kühe mit einer Tagesleistung zwischen 20,1 und 30 kg Milch wurde eine Differenz von  $-4,71$  ng/ml berechnet. In der Milch der Kühe mit einer Leistung von über 30 kg Milch pro Tag lagen die IGF-1-Werte nochmal um  $0,36$  ng/ml niedriger als in der Leistungsklasse 20,1 bis 30 kg.

#### 4.1.5 Trächtigkeit

Das Stadium der Trächtigkeit, in dem sich eine Kuh zum Zeitpunkt der Probennahme befand, hatte einen signifikanten Einfluß auf die in den Viertelanfangsgemelksproben gemessenen IGF-1-Konzentrationen (F-Test:  $p < 0,0001$ ). In die statistische Auswertung des Einflusses der Trächtigkeit wurden nur die Proben von Kühen mit gesicherten Angaben über den Trächtigkeitzzustand einbezogen (Kühe:  $n = 388$ , VGP:  $n = 3788$ ).

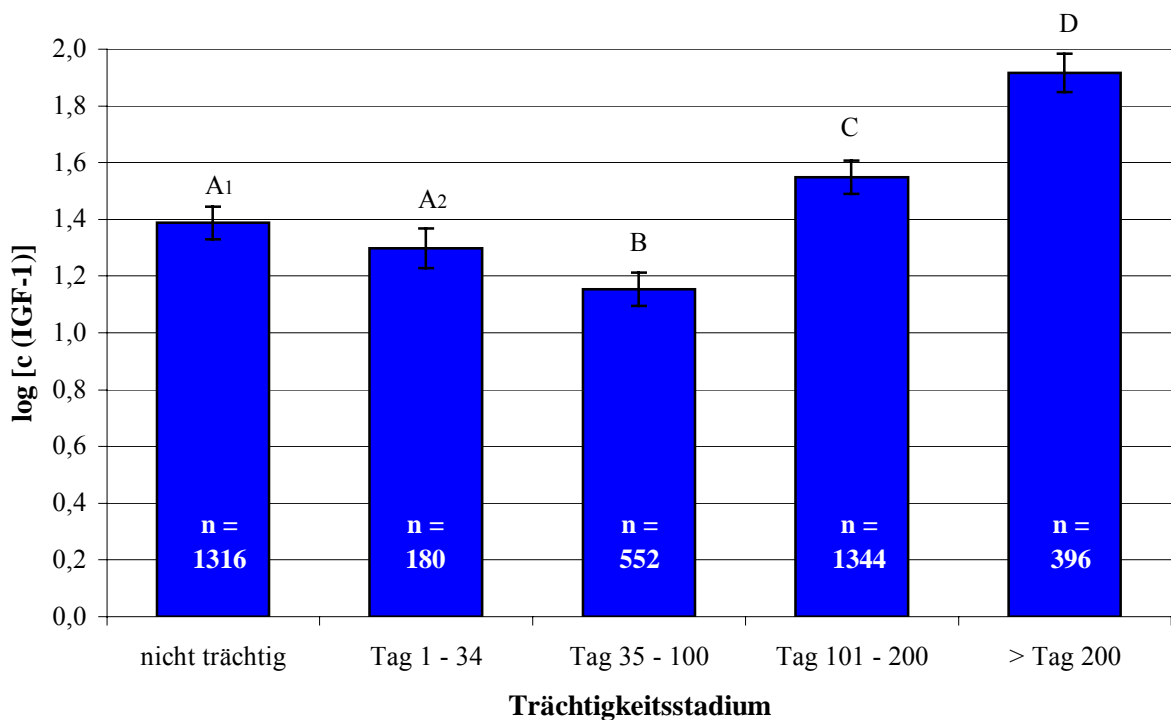
In Tabelle 4.8 sind die Least-Square-Mittelwerte mit Standardfehler, die Signifikanzen und die zwischen den Trächtigkeitsstufen errechneten Differenzen der IGF-1-Konzentrationen dargestellt.

**Tabelle 4.8:** Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben von Kühen in unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien ( $n = 2472$ ) im Vergleich zu Proben nicht trächtiger Kühe ( $n = 1316$ ) sowie Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant mit Ausnahme <sup>A<sub>2</sub>B</sup> n.s. (<sup>A<sub>1</sub>C</sup>  $p < 0,01$ , <sup>ABCD</sup>  $p < 0,001$ )

Trächtigkeitsstadium	n	LSM	SE	Differenz in ng/ml
nicht tragend	1316	1,3877 <sup>A<sub>1</sub></sup>	0,0578	- 5,23
Tag 1–34	180	1,2989 <sup>A<sub>2</sub></sup>	0,0701	- 5,63
Tag 35–100	552	1,1535 <sup>B</sup>	0,0597	- 6,14
Tag 101–200	1344	1,5478 <sup>C</sup>	0,0584	- 4,25
> Tag 200	396	1,9171 <sup>D</sup>	0,0673	0,00

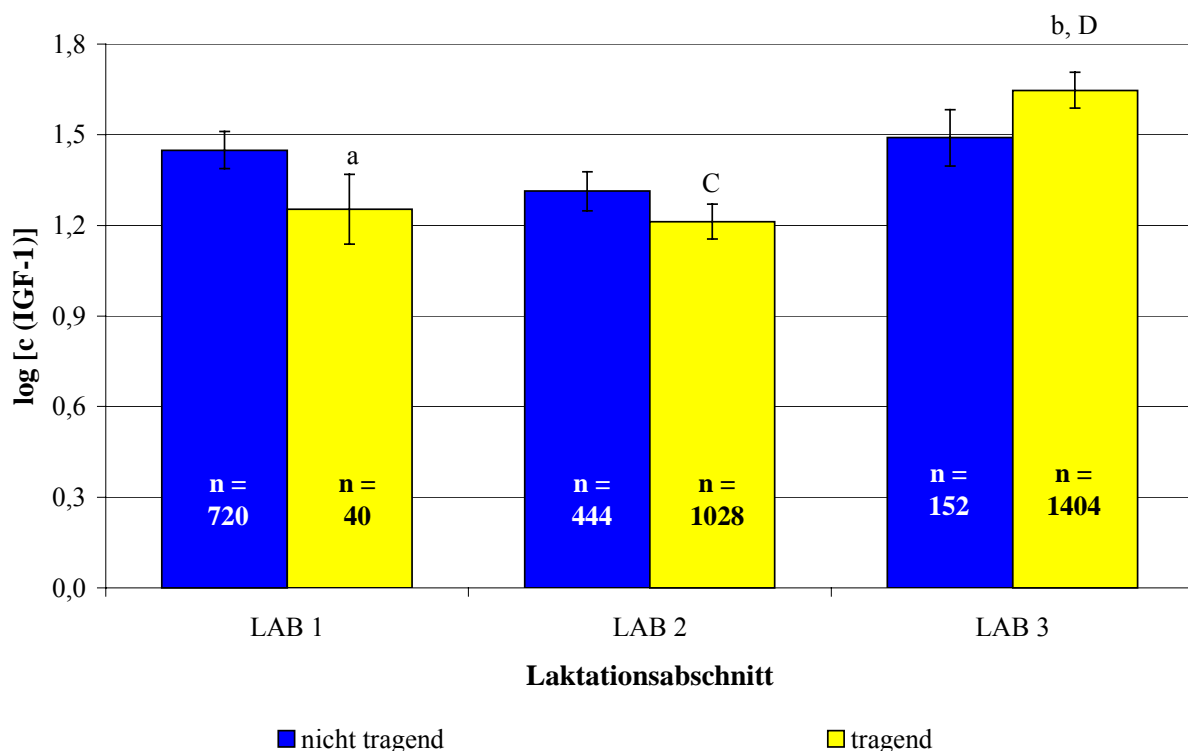
Die IGF-1-Konzentrationen in der Milch hochtragender Kühe (ab Trächtigkeitstag 200) waren signifikant höher (Bonferroni:  $p < 0,001$ ) als die in der Milch nicht tragender Tiere beziehungsweise in der Milch von Kühen in den frühen Trächtigkeitsstadien gemessenen Werte (Abbildung 4.5).

Nicht tragende Kühe hatten signifikant höhere IGF-1-Konzentrationen in der Milch als Tiere zwischen dem 35. und 100. Trächtigkeitstag (Bonferroni:  $p < 0,001$ ). Die IGF-1-Konzentrationen fielen von den in den ersten 34 Trächtigkeitstagen gemessenen Werten um eine errechnete Differenz von  $-0,51$  ng/ml auf die zwischen dem 35. und 100. Tag nachweisbaren Konzentrationen ab. Die zwischen dem 101. und 200. Trächtigkeitstag gemessenen Werte lagen um  $1,89$  ng/ml höher, nach dem 200. Trächtigkeitstag stiegen sie nochmals um  $4,25$  ng/ml.



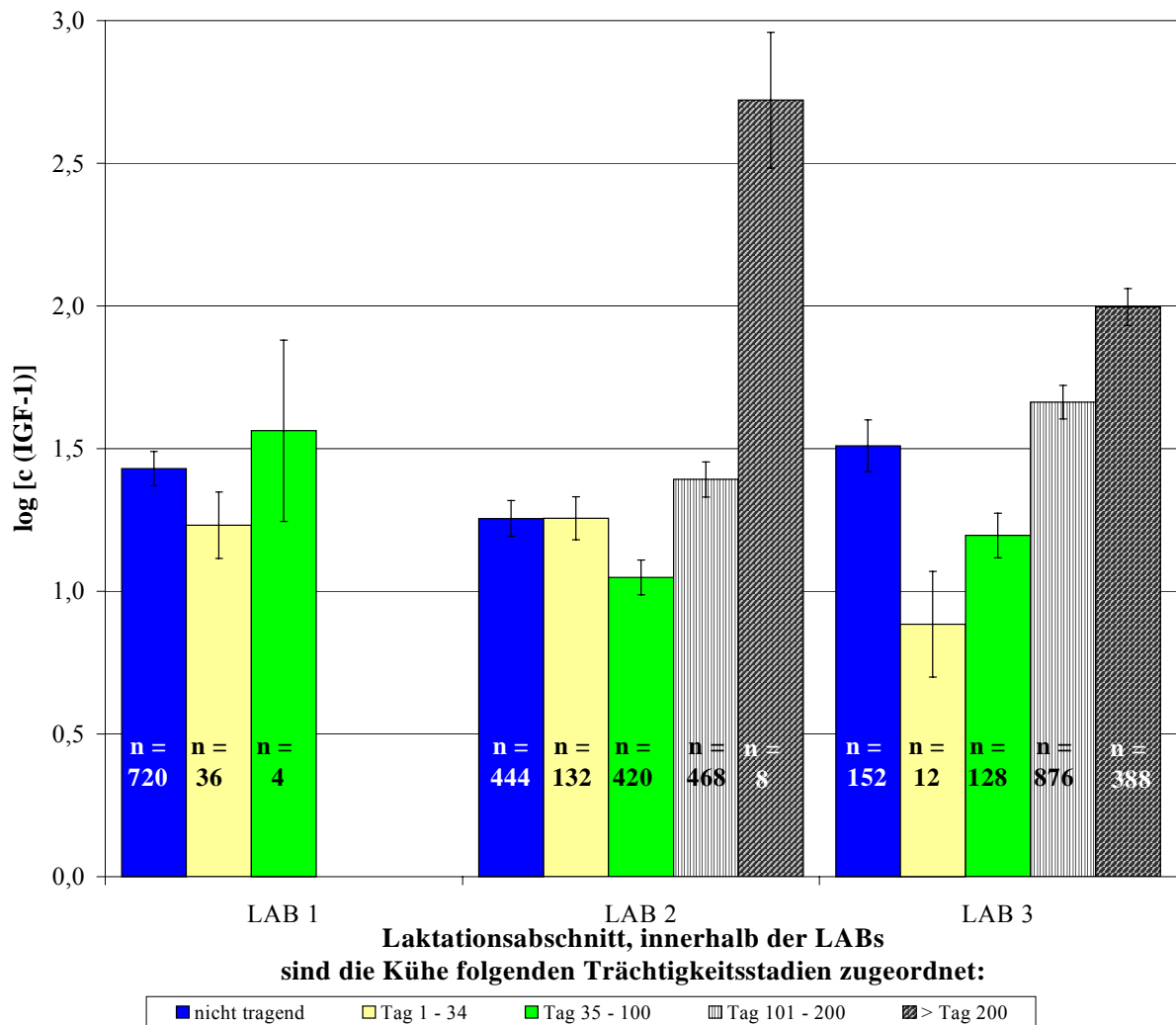
**Abbildung 4.5:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben ( $n = 3788$ ) von Kühen in verschiedenen Trächtigungsabschnitten  
Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant mit Ausnahme <sup>A2B</sup> n.s. (<sup>A1C</sup>  $p < 0,01$ , <sup>ABCD</sup>  $p < 0,001$ )

Der Vergleich der IGF-1-Konzentrationen in der Milch nicht tragender mit den Werten in der Milch tragender Kühe, aufgegliedert in die drei Laktationsabschnitte (LAB), ergibt für Proben aus der Früh- und der Hochlaktation tendenziell niedrigere Werte bei den tragenden Tieren als bei den nicht-tragenden Tieren desselben Laktationsabschnitts (Abbildung 4.6). Nach dem 240. Laktationstag hingegen wurden in Milchproben trächtiger Kühe höhere IGF-1-Konzentrationen gemessen als bei nichttragenden Tieren. Die Unterschiede zwischen trächtigen und nicht trächtigen Tieren konnten mit dem vorliegenden Datenmaterial im paarweisen Vergleich statistisch nicht abgesichert werden (Bonferroni:  $p > 0,5$ ). Statistisch absicherbar war der Unterschied zwischen den IGF-1-Konzentrationen in der Milch trächtiger Kühe in der Spätlaktation verglichen mit den in Früh- und Hochlaktation gemessenen Werten (Bonferroni:  $p \leq 0,05$ ).



**Abbildung 4.6:** Vergleichende Darstellung der Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben ( $n = 3788$ ) von nicht tragenden und tragenden Kühen, aufgegliedert nach Laktationsabschnitten (LAB, LAB 1: Laktationstag 5–80, LAB 2: Tag 81–240, LAB 3:  $\geq$  Tag 241)  
 F-Test:  $p < 0,0001$   
 Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>ab</sup>  $p < 0,01$ , <sup>CD</sup>  $p < 0,001$ )

Der Anstieg der IGF-1-Konzentrationen zum Ende der Trächtigkeit hin bleibt sichtbar, wenn die logarithmierten Werte der in den Milchproben aus den fünf definierten Trächtigkeitsstadien gemessenen IGF-1-Konzentrationen über die drei Laktationsabschnitte dargestellt werden (F-Test:  $p < 0,0001$ ; Abbildung 4.7).

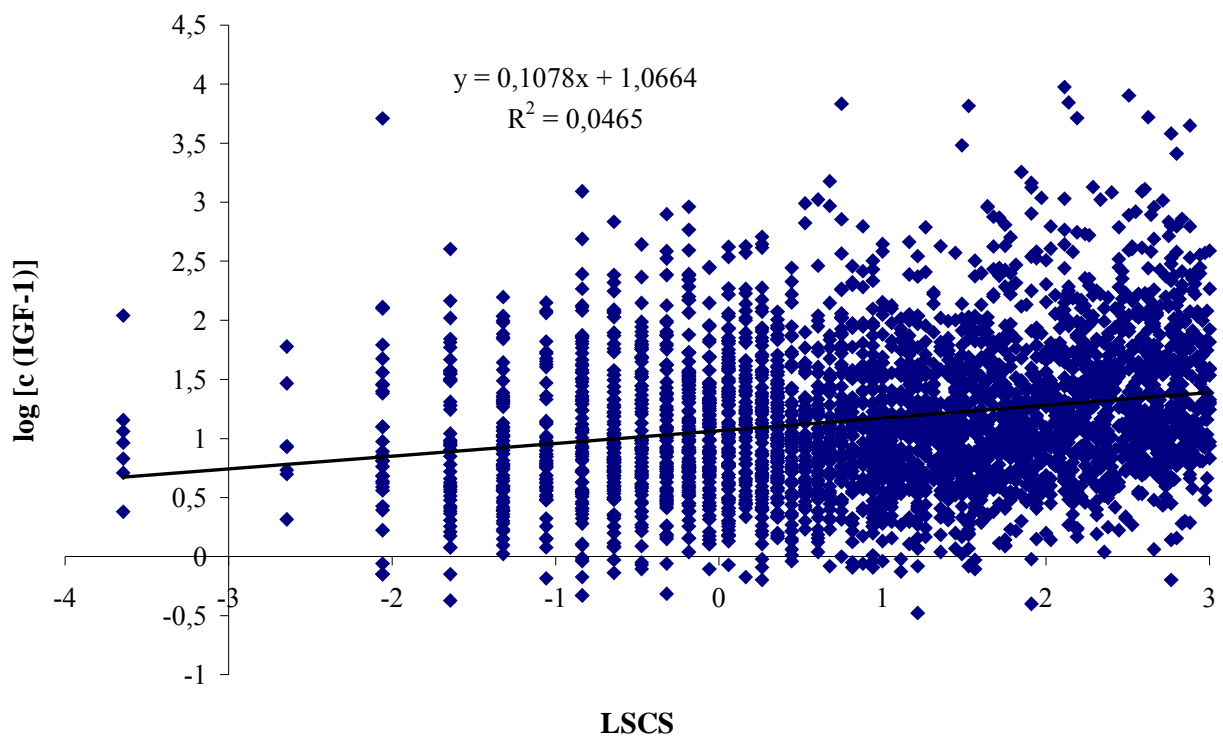


**Abbildung 4.7:** Vergleichende Darstellung der Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben ( $n = 3788$ ) von Kühen in verschiedenen Trächtigkeitsstadien, aufgegliedert nach Laktationsabschnitten (LAB, LAB 1: Laktationstag 5–80, LAB 2: Tag 81–240, LAB 3:  $\geq$  Tag 241)  
F-Test:  $p < 0,0001$

#### 4.1.6 Physiologische Zellzahl

Viertelanfangsgemelksproben aus gesunden Eutervierteln enthalten definitionsgemäß bis zu 100.000 somatische Zellen pro ml Milch. Ausgedrückt als Linear Somatic Cell Score ergibt dies LSCS-Werte für unauffällige Milchproben von 1–3 (vgl. 3.5.3).

In diesem physiologischen Bereich ließ sich eine lineare Abhängigkeit zwischen den dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen und den Linear Somatic Cell Scores der Viertelgemelke feststellen, die mit der Gleichung  $\log [c(\text{IGF-1})] = 0,1078 * \text{LSCS} + 1,0664$  beschrieben werden kann ( $R^2 = 4,7 \%$ , Abbildung 4.8). Mit zunehmender Zellzahl stieg die IGF-1-Konzentration. Im F-Test erwies sich der Effekt „Zellzahl“ als signifikant ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 4.8:** Abhängigkeit der dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen vom Linear Somatic Cell Score der Magermilchprobe (bis einschl. LSCS = 3, n = 3242)

Die IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben mit Zellzahlen  $\leq 25.000/\text{ml}$  unterschieden sich nicht signifikant (Bonferroni:  $p > 0,5$ ) von den Konzentrationen in Proben mit  $25.001\text{--}50.000$  Zellen/ml. Die errechnete Differenz zwischen den IGF-1-Konzentrationen in den Proben dieser beiden Klassen betrug  $0,08$  ng/ml. Proben mit Zellzahlen  $> 50.000$  und  $\leq 100.000$  Zellen/ml unterschieden sich in ihren IGF-1-Konzentrationen signifikant sowohl von Proben mit Zellzahlen bis  $25.000/\text{ml}$  als auch von Proben mit Zellzahlen zwischen  $25.001$  und  $50.000/\text{ml}$  (Bonferroni:  $p < 0,001$ ). Die errechneten Differenzen betragen hier  $0,30$  bzw.  $0,22$  ng/ml (Tabelle 4.9).

**Tabelle 4.9:** Least-Square-Mittelwerte (LSM) und Standardfehler (SE) der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben ( $n = 3242$ ) mit unterschiedlichen somatischen Zellzahlen (SCC) sowie die Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in den unterschiedlichen Zellzahlklassen in ng/ml Meßdaten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>AB</sup>  $p < 0,001$ ).

SCC	n	LSM	SE	Differenz in ng/ml
$\leq 25.000/\text{ml}$	1628	$0,9863^A$	0,0466	- 0,30
$> 25.000$ und $\leq 50.000/\text{ml}$	830	$1,0374^A$	0,0484	- 0,22
$> 50.000$ und $\leq 100.000/\text{ml}$	784	$1,1725^B$	0,0484	0,00

## 4.2 Pathologische Einflußfaktoren auf die IGF-1-Konzentrationen in der Milch

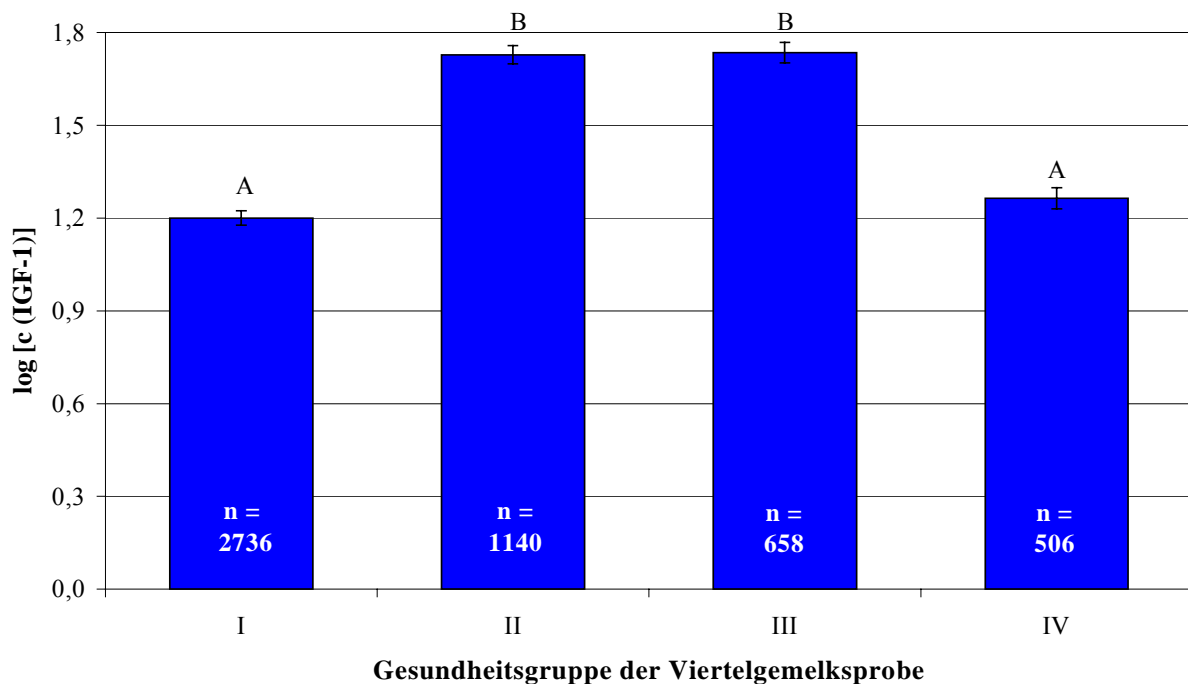
### 4.2.1 Gesundheitsgruppe Euterviertel

Die Viertelanfangsgemelksproben wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse der zytologischen und der bakteriologischen Untersuchungen in vier Gesundheitsgruppen eingeteilt (Tabelle 4.10, vgl. 3.2.3).

**Tabelle 4.10:** Verteilung der statistisch ausgewerteten Viertelgemelksproben (n = 5040) über die vier Gesundheitsgruppen

Ausgewertete Viertelgemelksproben (n = 5040)			
Gruppe	Definition	n	%
I	normale Sekretion	2736	54,3
II	unspezifische Mastitis	1140	22,6
III	(sub-)klinische Mastitis	658	13,1
IV	latente Infektion	506	10,0

Die Gesundheitsgruppe Euterviertel hatte einen signifikanten Einfluß (F-Test:  $p < 0,0001$ ) auf die in den Proben meßbaren IGF-1-Konzentrationen (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelgemelksproben der vier Gesundheitsgruppen (I: SCC < 100.000/ml, kein Keim, II: SCC > 100.000/ml, kein Keim, III: SCC > 100.000/ml, Keimnachweis, IV: SCC < 100.000/ml, Keimnachweis, n = 5040)  
Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>AB</sup>  $p < 0,001$ )

Die logarithmierten IGF-1-Werte, die für die Viertelanfangsgemelksproben der Gruppe I, „Gesund“ errechnet wurden (LSM = 1,2000) und die in der Gruppe IV, „SCC < 100.000/ml, Keimnachweis“ errechneten Werte (LSM = 1,2649) unterschieden sich signifikant von den dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen, die in den Gruppen II, „SCC > 100.000/ml, kein Keim“ und Gruppe III, „SCC > 100.000/ml, Keimnachweis“ gemessen wurden (Bonferroni:  $p < 0,001$ ). Dabei betrug die errechnete Konzentrationsdifferenz zwischen den Proben „gesunder“ Viertel und Proben mit erhöhter Zellzahl 13,93 ng/ml. Proben mit erhöhter Zellzahl und gleichzeitigem Nachweis eines Mastitiserregers hatten um 14,09 ng/ml höhere IGF-1-Konzentrationen, während in Proben, in denen zwar Mastitiserreger nachgewiesen wurden, jedoch keine Zellzahlerhöhung vorlag, die IGF-1-Konzentrationen nur um 0,94 ng/ml höher lagen als in Proben „gesunder“ Viertel.

#### **4.2.2 Bakteriologischer Befund**

Von den insgesamt 5040 ausgewerteten Viertelanfangsgemelksproben wurden in 23,1 % (n = 1164) Erreger nachgewiesen. Dabei lag in 57 Proben, entsprechend 4,9 % der erregerpositiven VGP, eine Mischinfektion mit mindestens zwei unterschiedlichen Keimen vor.

Tabelle 4.11 gibt einen Überblick über das Vorkommen der verschiedenen Mastitiserreger im statistisch ausgewerteten Untersuchungsmaterial.

Am häufigsten waren koagulase-negative Staphylokokken in 70,8 % der Milchproben, gefolgt von *Sc. uberis* in 16,6 % und koagulase-positiven Staphylokokken in 8,3 % der Proben. *Sc. dysgalactiae* und *Sc. agalactiae* kamen im ausgewerteten Material nur in 2,9 beziehungsweise 1,4 % der Proben vor. *Corynebacterium bovis*, koliforme Keime, Hefen oder Pilze wurden in den untersuchten und statistisch ausgewerteten Proben nicht nachgewiesen.

**Tabelle 4.11:** Häufigkeit von Keimbefunden im statistisch ausgewerteten Probenmaterial

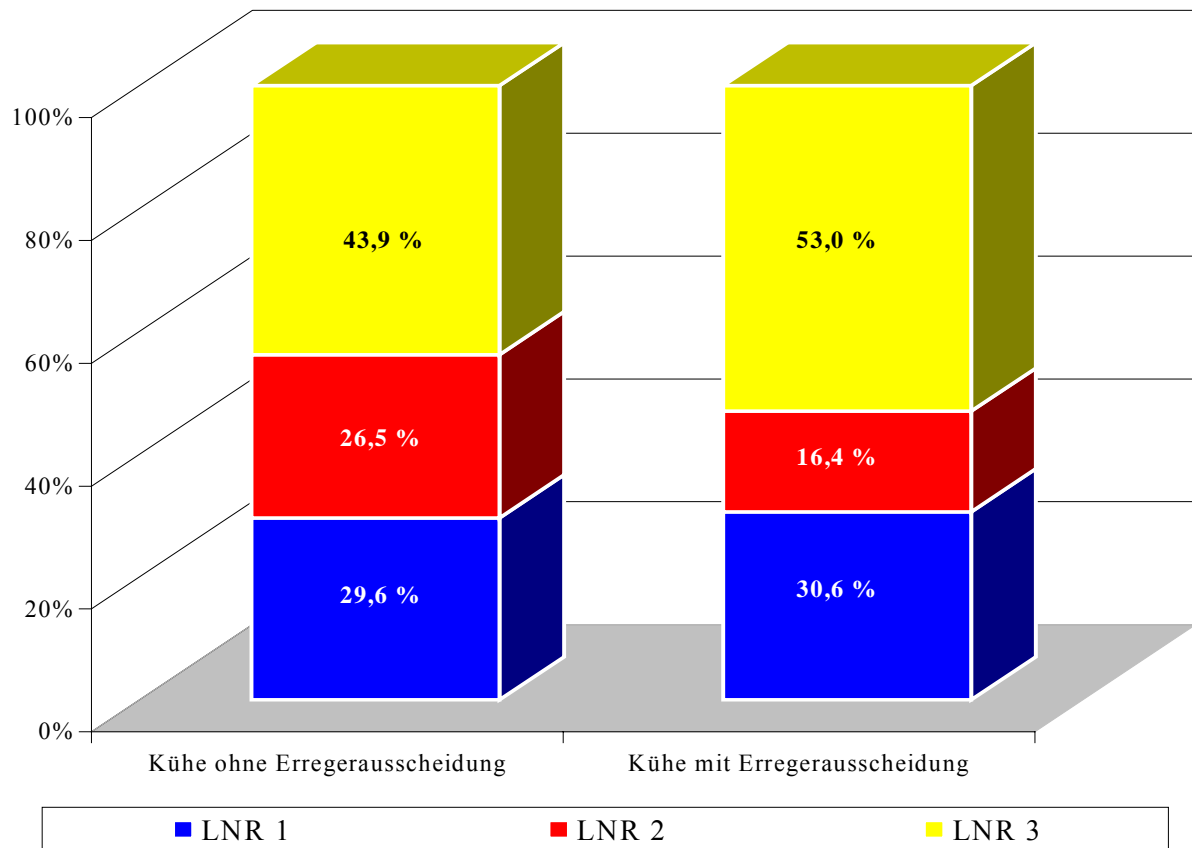
bakteriologischer Befund	n	%
koagulase-negative Staphylokokken (CNS)	865	70,8
<i>Streptococcus uberis</i>	203	16,6
koagulase-positive Staphylokokken (CPS)	102	8,3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	35	2,9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	17	1,4
Anzahl der bakteriologischen Befunde	1222	100,0

Milchproben aus den beiden Vordervierteln waren tendenziell seltener erregerspezifisch als Proben aus den Hintervierteln (Tabelle 4.12). Zwischen dem Vorkommen von Keimen in Proben aus gleichseitigen Vierteln ließ sich kein Unterschied ausmachen.

**Tabelle 4.12:** Verteilung der erregerspezifischen Viertelanfangsgemelksproben (VGP) über die einzelnen Euterviertel

Euterviertel	n	erregerspezifische VGP	
		n	%
VR	1260	282	22,4
VL	1260	253	20,1
HR	1260	312	24,8
HL	1260	317	25,2

In den Gruppen der Kühe mit Erregerspezifischer Ausscheidung waren prozentual mehr ältere Tiere (Laktationsnummer 3 und größer) vertreten als in den Gruppen der Tiere, in deren Milchproben keine Erreger nachgewiesen werden konnten. Abbildung 4.10 verdeutlicht die Altersstrukturen der Kühe ohne bzw. mit Erregerspezifischer Ausscheidung.



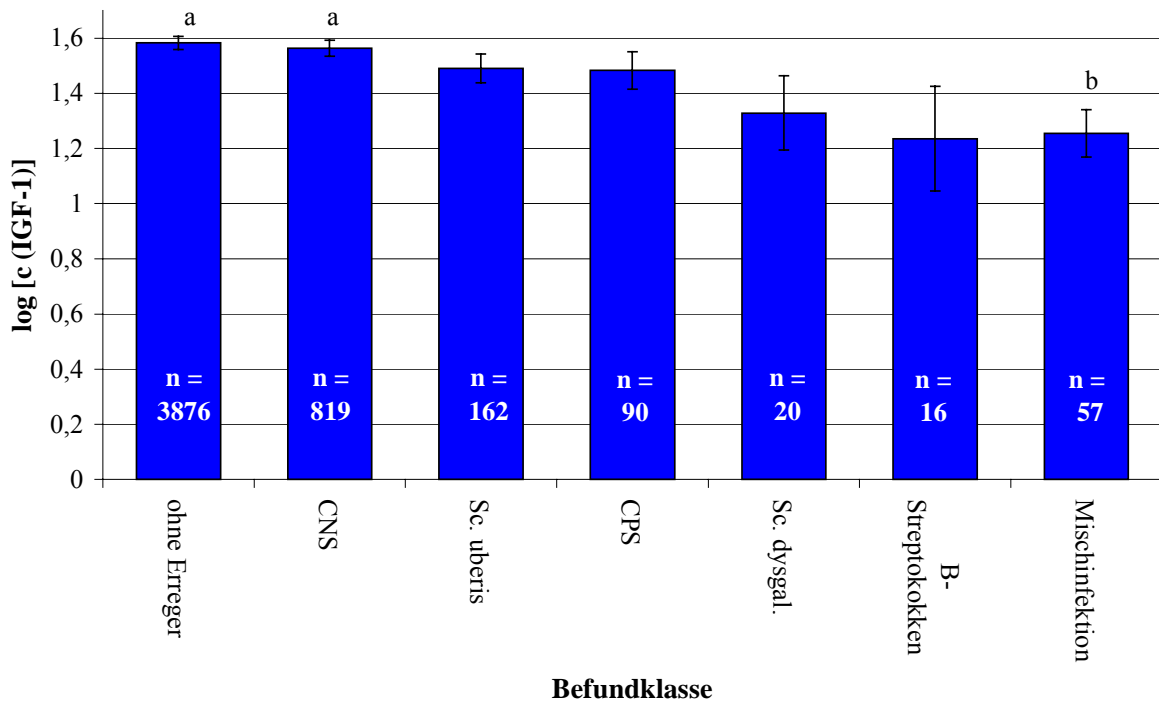
**Abbildung 4.10:** Altersstruktur der Gruppen „Kühe ohne Erregerausscheidung“ (n = 577) und „Kühe mit Erregerausscheidung“ (n = 683; LNR = Laktationsnummer, LNR 3: Laktationsnummern 3 und größer)

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung wurden in sieben Klassen unterteilt (siehe 3.5.2).

Für die Befundklasse wurde ein signifikanter Einfluß auf die IGF-1-Konzentrationen berechnet (F-Test:  $p < 0,001$ ). In Proben ohne Erregernachweis und in Proben mit koagulase-negativen Staphylokokken wurden die höchsten IGF-1-Konzentrationen gemessen (LSM = 1,5828 bzw. 1,5636). Milchproben, in denen mehr als ein Erreger nachgewiesen wurde, zeigten nach den Milchproben mit B-Streptokokkennachweis (LSM = 1,2360) die geringsten IGF-1-Konzentrationen (LSM = 1,2546). Sie unterschieden sich signifikant (Bonferroni:  $p < 0,01$ ) von den Werten in erregerefreien Proben bzw. von Proben mit CNS-Nachweis (Abbildung 4.11).

Die Differenzen zwischen den IGF-1-Konzentrationen in erregerefreier Magermilch und Magermilch mit *Sc. uberis*- bzw. CPS-Nachweis (LSM = 1,4904 bzw. 1,4831) betrugen -2,77 bzw. -2,96 ng/ml. Die in Magermilchproben mit *Sc. dysgalactiae* gemessenen

Werte (LSM = 1,3287) lagen um 6,39 ng/ml unter den Konzentrationen in erregersfreier Magermilch, Proben mit B-Streptokokkennachweis enthielten um 7,54 ng/ml niedrigere Konzentrationen.

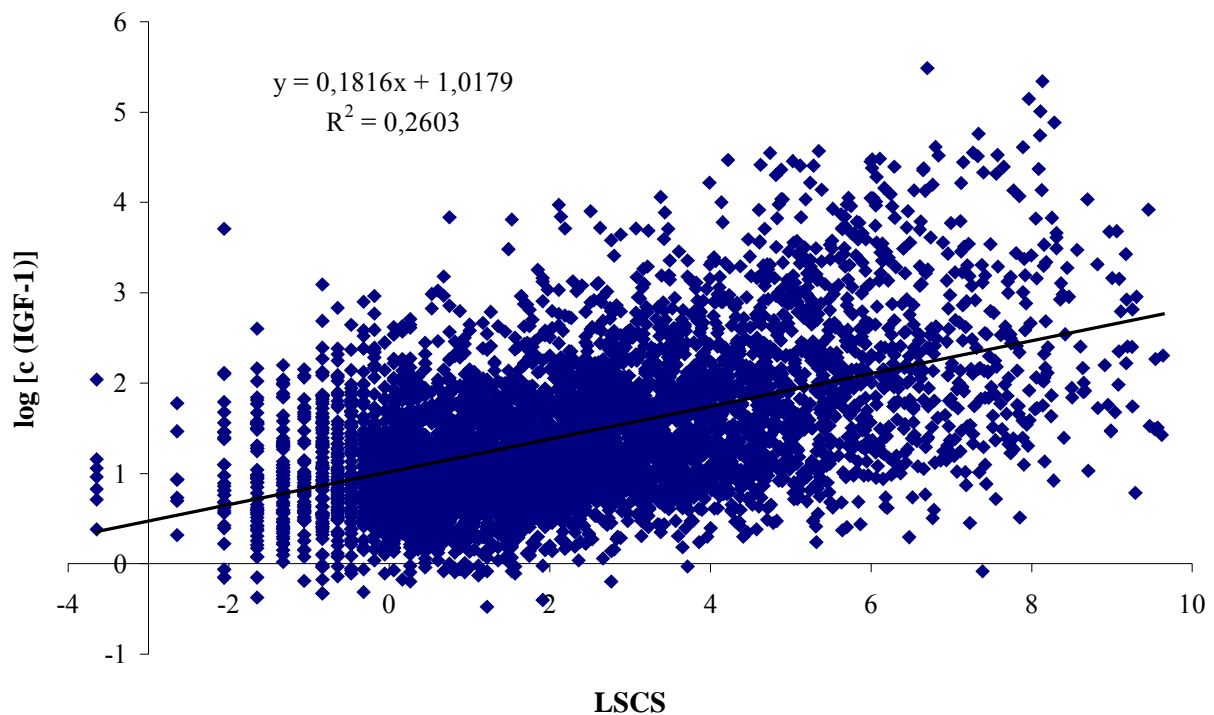


**Abbildung 4.11:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben (n = 5040) in Abhängigkeit vom Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung  
Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>ab</sup> p < 0,01)  
CNS: koagulase-negative Staphylokokken  
CPS: koagulase-positive Staphylokokken

### 4.2.3 Pathologische Zellzahl

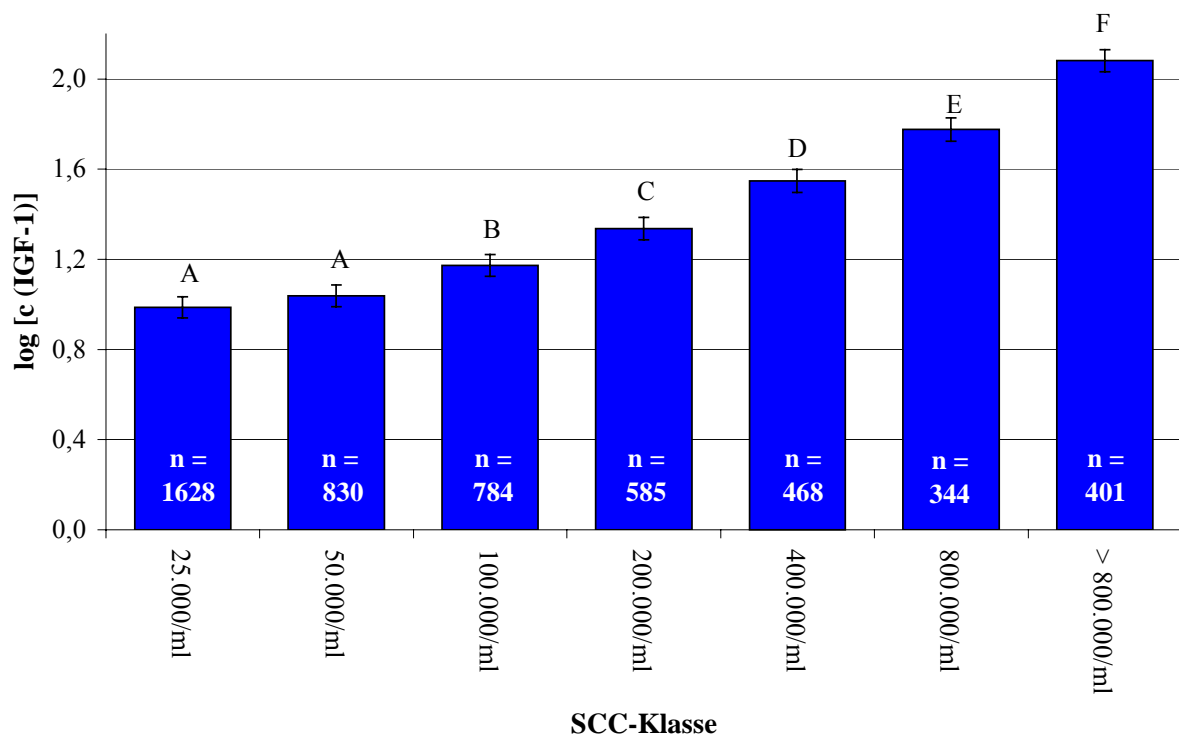
Zellzahlen über 100.000 pro ml Milch in Viertelanfangsgemelksproben gelten als pathologisch. Die lineare Abhängigkeit, die sich im physiologischen Bereich bei Zellzahlen bis 100.000/ml zwischen Zellzahl und IGF-1-Konzentration nachweisen ließ, war auch bei Milchproben mit höheren Zellzahlen augenfällig. In diesen Magermilchproben waren höhere IGF-1-Konzentrationen nachweisbar (F-Test:  $p < 0,0001$ ).

Die lineare Abhängigkeit zwischen den dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen und den Linear Somatic Cell Scores der Viertelgemelke ließ sich, bei Betrachtung aller Zellgehalte, mit der Gleichung  $\log [c \text{ (IGF-1)}] = 0,182 * \text{LSCS} + 1,0179$  beschreiben mit  $R^2 = 26,0 \%$  (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12:** Abhängigkeit der dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen vom Linear Somatic Cell Score (LSCS) der Magermilchprobe (n = 5040)

Die dekadischen Logarithmen der IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben in den unterschiedlichen Zellzahlklassen mit Zellzahlen > 100.000 pro ml Milch unterschieden sich signifikant (Bonferroni:  $p < 0,001$ ). Abbildung 4.13 verdeutlicht die Zunahme der IGF-1-Konzentration mit steigender Zellzahl, wobei die Ergebnisse der Proben mit Zellzahlen unter 100.000 Zellen pro ml Milch mit dargestellt sind.



**Abbildung 4.13:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelgemelksproben mit unterschiedlichen Zellzahlen (n = 5040)  
Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>ABCDEF</sup>  $p < 0,001$ )

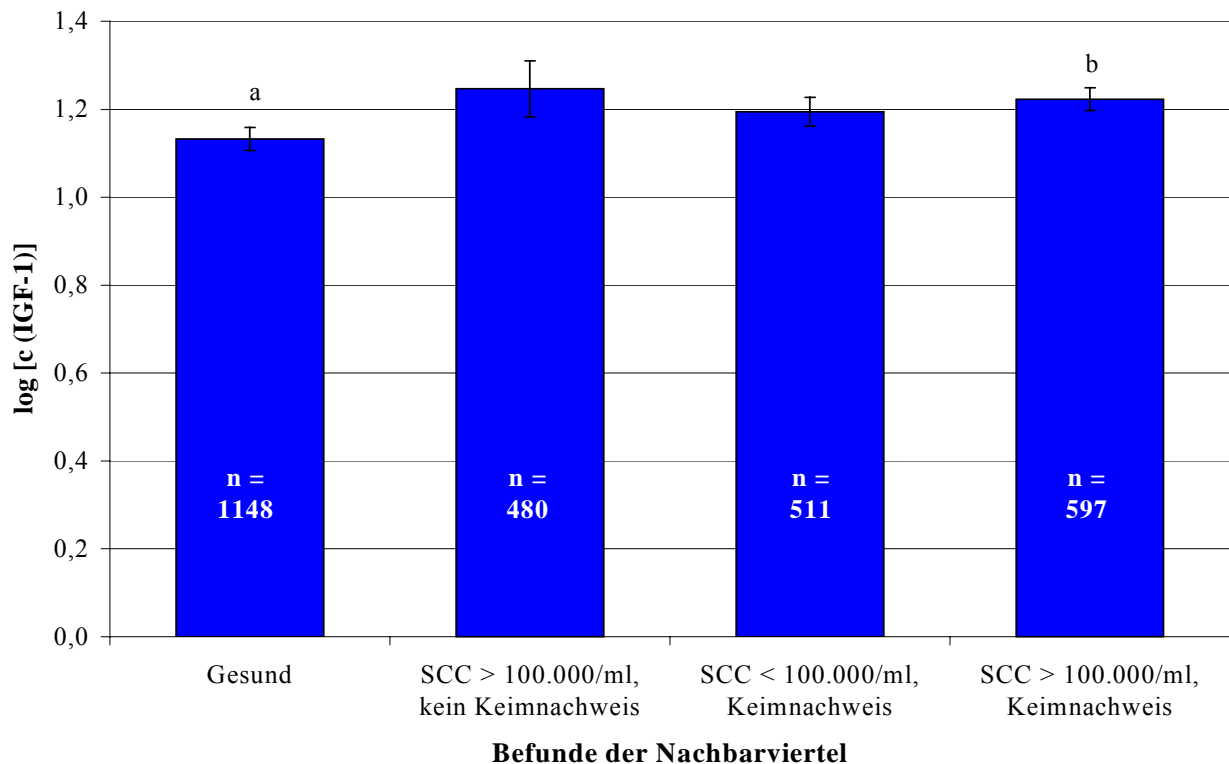
#### 4.2.4 Erkrankungen der Nachbarviertel

Von den 5040 ausgewerteten Viertelgemelksproben waren 2736 Proben normaler Sekretion (SCC < 100.000/ml, kein euterpathogener Keim nachweisbar). Diese Proben wurden unterteilt in solche aus vollständig gesunden Eutern (vier unauffällige Euterviiertel) und in solche, die aus Eutern stammten, in denen mindestens ein anderes Viertel erhöhte Zellzahlen und/oder bakteriologische Befunde aufwies. Entsprechend der Euterbefunde wurden die Kühe in die vier Gesundheitsgruppen eingeteilt (Tabelle 4.13).

**Tabelle 4.13:** Verteilung der statistisch ausgewerteten Kühe (n = 1260) über die vier Gesundheitsgruppen

Beprobte und statistisch ausgewertete Tiere (n = 1260)			
Gruppe	Definition	n	%
I	normale Sekretion auf allen vier Vierteln (SCC < 100.000/ml, bakteriologisch negativ)	287	22,8
II	mind. 1 Viertel mit SCC > 100.000/ml, dieses Viertel bakteriologisch negativ (unspezifische Mastitis)	290	23,0
III	mind. 1 Viertel mit SCC > 100.000/ml, dieses Viertel bakteriologisch positiv ([sub-]klinische Mastitis)	418	33,2
IV	mind. 1 Viertel mit SCC < 100.000/ml, dieses Viertel bakteriologisch positiv (latente Infektion)	265	21,0

Der Einfluß des Vorliegens pathologischer Befunde auf mindestens einem Viertel eines Euters auf die IGF-1-Konzentrationen in den gesunden Vierteln wurde untersucht und erwies sich als signifikant (F-Test:  $p = 0,01$ , Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14:** Least-Square-Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten IGF-1-Konzentrationen in Viertelgemelksproben mit normaler Sekretion ( $n = 2736$ ), deren Nachbarviertel unterschiedliche Befunde aufwiesen. Die Befunde der Nachbarviertel sind auf der x-Achse aufgetragen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (<sup>ab</sup>  $p < 0,05$ )

Unauffällige Magermilchproben, die aus Eutern stammten, deren andere Viertel ebenfalls unauffällige Sekretion aufwiesen, hatten die niedrigsten IGF-1-Werte (LSM = 1,1321). Waren in der Sekretion eines Euterviartels Mastitiserreger nachweisbar, ohne daß gleichzeitig erhöhte Zellzahlen vorlagen, so zeigten die gesunden Viertel leicht erhöhte IGF-1-Werte (LSM = 1,1943). Die höchsten IGF-1-Werte lagen in Proben vor, die aus Eutern stammten, in denen in mindestens einem Viertel erhöhte Zellzahlen nachweisbar waren (LSM = 1,2466). Da hier, der geringen Probenanzahl wegen, ein relativ großer Standardfehler vorlag, war diese Differenz statistisch nicht absicherbar. Signifikant war dagegen der Unterschied zwischen Proben aus unauffälligen Eutern und Proben aus Eutern, in denen auf einem Viertel sowohl Mastitiserreger nachweisbar waren als auch die Zellzahl über 100.000/ml lag (LSM = 1,2232) (Bonferroni:  $p < 0,05$ ).

### 4.3 Korrelationen

Die höchste Korrelation wurde mit 0,41 zwischen den dekadisch logarithmierten IGF-1-Konzentrationen und dem Linear Somatic Cell Score der in der jeweiligen Viertelanfangsgemelksprobe gemessenen Zellzahl errechnet. Ob in einer Magermilchprobe ein Mastitiserreger nachgewiesen wurde oder nicht, korrelierte mit der logarithmierten IGF-1-Konzentration nur mit 0,11. Dagegen betrug die Korrelation zwischen Linear Somatic Cell Score und nachgewiesenem bzw. nicht vorliegendem Mastitiserreger 0,33 (Tabelle 4.14).

**Tabelle 4.14:** Korrelationen zwischen den dekadisch logarithmierten IGF-1-Konzentrationen ( $\log [c \text{ (IGF-1)}]$ ), dem Linear Somatic Cell Score (LSCS) und dem Vorliegen bzw. Fehlen eines Erregernachweises (Befund j/n) in der jeweiligen Viertelanfangsgemelksprobe (n = 5040)

	$\log [c \text{ (IGF-1)}]$	LSCS	Befund j/n
$\log [c \text{ (IGF-1)}]$		0,41 (p < 0,0001)	0,11 (p < 0,0001)
LSCS			0,33 (p < 0,0001)
Befund j/n			

Die in den Auswertungen dargestellten IGF-1-Mittelwerte sind Berechnungsgrößen, in denen jeweils die Meßwerte der Proben aller Kühe einer statistischen Gruppe zusammengefaßt sind. Um einen besseren Eindruck der individuellen Schwankungen der IGF-1-Konzentrationen in Magermilchproben einzelner Kühe zu geben, sind im Anhang die Einzelmeßwerte von zwei Kühen graphisch dargestellt.

## 5 Diskussion

### 5.1 IGF-1-Konzentrationen in Milch

Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Meßwerte der IGF-1-Konzentrationen in Magermilch sind mit Ergebnissen anderer Studien vergleichbar. Auch Collier et al. (1991) und Daxenberger (1998) fanden eine linkssteile Häufigkeitsverteilung der Meßwerte.

Dabei sind die von Collier et al. (1991) angegebenen Werte niedriger (Median 1,9 ng/ml) als die bei Daxenberger (1998) (Median 4,4 ng/ml) und in der vorliegenden Arbeit (Median 3,8 ng/ml). Diese Werte stimmen gut mit den von Hammond et al. (1990) bei nicht bST-behandelten Kühen ermittelten Konzentrationen von 3,0–4,7 ng/ml überein, ebenso wie mit den in den Studien von Zhao et al. (1994) und von Prosser et al. (1989) ermittelten durchschnittlichen Werten von 4,3 ng/ml beziehungsweise von 3,4 ng/ml. Nicht bestätigt werden konnten die Ergebnisse von Schams (1989) mit IGF-1-Konzentrationen in reifer Milch zwischen 26 und 33 ng/ml und von Campbell und Baumrucker (1989), die am Tag 7 nach der Kalbung durchschnittlich 34,4–38,2 ng/ml messen konnten. Bis auf die Untersuchung von Daxenberger (1998) stützen sich die Ergebnisse der genannten Arbeiten auf die Auswertung kleinerer Milchprobenzahlen, und es wurden andere Testsysteme verwendet.

Für die unterschiedlichen IGF-1-Konzentrationen, die in verschiedenen Studien gemessen wurden, könnten die verwendeten Testsysteme verantwortlich sein, vor allem die unterschiedlichen Ansätze zur Beseitigung der durch die IGFBP verursachten Störungen. Extraktionsmethoden beinhalten das grundsätzliche Problem mangelnder Vollständigkeit, was zu verminderten Wiederfindungsraten führt. Die nach unvollständiger räumlicher Abtrennung im Testansatz noch vorhandenen IGFBP könnten durch Bindung des markierten IGF-1 höhere Gehalte an IGF-1 im Probenmaterial vortäuschen.

Der in dieser Arbeit beschriebene Testansatz verzichtet auf Extraktion und räumliche Trennung von IGF-1 und IGFBP und bedient sich statt dessen einer funktionalen Trennung. IGF-2, das ebenfalls an die Bindungsproteine bindet, von dem eingesetzten hochspezifischen IGF-1-Antiserum aber nicht gebunden wird, wird im Überschuß zugegeben. Die Validität dieser Vorgehensweise wird bestätigt durch die Genauigkeit (Wiederfindung  $101,7 \pm 4,7 \%$ )

und insbesondere durch die Parallelität der Bestimmung, die keine Störung des Testansatzes erkennen lassen.

## **5.2 Einflüsse auf die IGF-1-Mittelwerte**

### **5.2.1 Rasse**

Tendenziell wurden in den Magermilchproben von Rindern der Rasse Deutsche Holsteins, Farbrichtung Schwarz, in dieser Untersuchung niedrigere IGF-1-Konzentrationen gemessen als in Proben von Deutschen Holsteins der Farbrichtung Rot einschließlich der Deutschen Rotbunten (Doppelnutzung). Der Einfluß der Rasse auf die IGF-1-Mittelwerte war jedoch statistisch nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu konnte Daxenberger (1998) einen statistisch signifikanten Einfluß der Rasse auf die IGF-1-Konzentrationen in Gesamtgemelksproben nachweisen. Er maß in der Milch von schwarzbunten Kühen höhere IGF-1-Gehalte als in Proben von Kühen der Rassen Fleck- und Braunvieh bzw. deren Kreuzungen.

Zwischen den IGF-1-Konzentrationen im Blut unterschiedlicher Rassen bestehen statistisch signifikante Unterschiede. Bei dem Vergleich der IGF-1-Konzentrationen im Blutplasma von Kühen einer milchleistungsbetonten Rasse (Deutsche Schwarzbunte) mit den Werten im Plasma von Tieren einer Doppelnutzungsrasse (Fleckvieh) stellten Schams et al. (1991b) einen signifikanten Unterschied fest. Sie wiesen im Blut der Doppelnutzungstiere signifikant mehr IGF-1 nach als im Blut der Schwarzbunten. In einer anderen Untersuchung konnten sie die höheren IGF-1-Werte bei Fleckvieh bestätigen, Blutproben von Rindern der Rasse Brown Swiss hatten niedrigere IGF-1-Konzentrationen als schwarzbunte Rinder (Schams et al., 1991a).

Der nicht signifikante Einfluß der Rasse auf die IGF-1-Mittelwerte in der vorliegenden Untersuchung könnte in der Tatsache begründet sein, daß die untersuchten Tiere alle milchleistungsbetonten Rassen angehören. Die Zahl der zu den Tieren der Farbrichtung Rot gezählten Doppelnutzungstiere war verhältnismäßig zu gering, um einen merklichen Unterschied zu verursachen. In den oben angeführten Untersuchungen werden stets milchbetonte mit Doppelnutzungs- bzw. fleischbetonten Rassen verglichen.

### 5.2.2 Euterviertel

In Milchproben aus den beiden Hintervierteln lagen höhere IGF-1-Mittelwerte vor als in Proben, die aus den Vordervierteln stammten. Dieser Unterschied war zwischen Proben aus dem rechten Vorder- und dem linken Hinterviertel statistisch signifikant.

Auch in den Untersuchungen von Liebe (1996) fanden sich unterschiedliche IGF-1-Konzentrationen in Vorder- und Hintervierteln. Grund hierfür war die Reihenfolge der Probennahme, die nach einem genauen Schema vor Stimulation des Euters durchgeführt wurde, wodurch es durch das Einschließen der Milch während der Probennahme zu einem Drifteffekt kam. Nach der Umstellung der Probennahme war dieser Effekt verschwunden. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Probennahme erst nach der vollständigen Stimulation des Euters und dem Wegmelken der Zisternenmilch durchgeführt, so daß ein Drifteffekt ausgeschlossen werden kann.

Mehrere Untersuchungen haben nachgewiesen, daß die Zellzahlmittelwerte in den hinteren Eutervierteln höher sind als in den Vordervierteln, ohne daß zwischen den Vierteln einer Euterhälfte ein statistisch absicherbarer Unterschied ausgemacht werden kann (Scheppers et al., 1997; Klaas, 2000). Studien über das Vorkommen von Mastitiden von Gonzalez et al. (1990) und Lancelot et al. (1997) ergaben für die Hinter- höhere Erkrankungsraten als für die Vorderviertel.

Die Hinterviertel des Euters sind gegenüber Umwelteinflüssen stärker exponiert als die Vorderviertel. Kot, Urin und Vaginalausfluß stellen eine ständige Verschmutzungsgefahr und Keimquelle dar. Die Euterhinterviertel müssen sich häufiger mit eindringenden Keimen oder mit Reizungen auseinandersetzen als die Vorderviertel.

Nach der Diapedese von Abwehrzellen durch die Euterschranke ist ihre Aktivität nach den Ergebnissen von Smits et al. (1999) deutlich verringert. IGF-1 regt die Abwehrleistungen der Leukozyten an und verbessert sie nachweislich (Balteskard et al., 1998).

Höhere IGF-1-Mittelwerte in den stärker exponierten Hintervierteln können ein Hinweis darauf sein, daß IGF-1 für die Aufrechterhaltung und Verbesserung der Funktionen der Abwehrzellen in der Milch notwendig ist.

### 5.2.3 Laktationsnummer und Laktationsabschnitt

Die IGF-1-Konzentration in der Milch verändert sich im Laufe der Laktation. Aus der Literatur ist bekannt, daß im Kolostrum extrem hohe IGF-1-Konzentrationen vorliegen, die schnell absinken (Malven et al, 1987; Schams und Einspanier, 1991; Grosvenor et al., 1993). Der Einfluß des Laktationsabschnitts wurde auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Die IGF-1-Mittelwerte in der frühen Laktation (Tag 5–80) waren höher als in der Hochlaktation (Tag 81–240). Für die Spätlaktation (ab Tag 241) wurden die höchsten Werte berechnet. Mit zunehmendem Alter der Kuh, ausgedrückt durch ihre Laktationsnummer, stiegen die IGF-1-Konzentrationen an.

Die nachgewiesene deutliche Abhängigkeit der IGF-1-Konzentrationen vom Laktationsabschnitt und der Kurvenverlauf über die Laktation stimmen mit Literaturangaben überein (Collier et al., 1991; Zhao et al., 1994). Campbell und Baumrucker (1989) bestimmten im Kolostrum von multiparen Kühen höhere IGF-1-Werte als in der Milch von primiparen Tieren. Dieser Unterschied blieb im Laufe der Laktation allerdings nicht bestehen. Die vorliegenden Berechnungen, die für Tiere mit höheren Laktationsnummern über die gesamte Laktation höhere IGF-1-Werte ergaben, decken sich mit den Beobachtungen von Collier et al. (1991). Sie stellten ebenfalls keine Interaktion zwischen Laktationsnummer und Laktationsabschnitt fest, das heißt, daß die Konzentrationsdifferenzen zwischen den Milchproben von multi- und primiparen Kühen über den gesamten Laktationsverlauf erhalten blieben.

Der Konzentrationsabfall zum Ende der Kolostralphase hin ist von vielen Hormonen und Wachstumsfaktoren, aber auch von anderen Proteinen wie zum Beispiel den Immunglobulinen in der Milch bekannt, die in der Versorgung des Neonaten eine Rolle spielen. Auch IGF-1 wird von den Neonaten aus dem Kolostrum aufgenommen (Hammon et al., 2000). Für das Zytokin werden Aufgaben bei der Initialisierung von Wachstumsprozessen (Ronge und Blum, 1988) und bei der Entwicklung des Magen-Darm-Traktes (Burrin, 1997) diskutiert. Hierin könnte die Begründung für die extrem hohen Konzentrationen im Kolostrum liegen, die nach dieser Phase auf das für die Erhaltung der Milchdrüse notwendige Maß zurückgehen.

Daxenberger (1998) sieht den Grund für den Anstieg der Konzentrationen zum Ende der Laktation hin in der Veränderung des Hormonhaushaltes im Laufe der Trächtigkeit. In der

vorliegenden Untersuchung wurde dieser Anstieg aber auch bei nicht tragenden Tieren beobachtet, so daß der Einfluß des Laktationsabschnittes auf die IGF-1-Mittelwerte unabhängig vom Trächtigkeitsstatus erhalten blieb. IGF-1 könnte bei der Verhinderung der Involution der Euterzellen eine Rolle spielen. Erste Erkenntnisse darüber wurden in Untersuchungen an Mäusemodellen gewonnen (Neuenschwander et al., 1996). Inwieweit diese jedoch auf die Verhältnisse im Rindereuter übertragbar sind, bleibt zu klären.

### 5.2.4 Milchleistung

In den Milchproben von Kühen mit einer Milchleistung von weniger als 20 kg/Tag lagen signifikant höhere IGF-1-Mittelwerte vor als in der Milch von Kühen mit höherer Tagesleistung. Da für diese Berechnungen die Daten der am Tag vor der Probennahme durchgeführten Milchleistungsprüfung herangezogen wurden, wurde auf eine genauere Korrelationsberechnung verzichtet. Die Ergebnisse für die Leistungsklassen lassen aber auf eine negative Korrelation zwischen IGF-1-Konzentration und Milchleistung schließen.

Collier et al. (1991) berechneten zwischen der IGF-1-Konzentration in der Milch und der Milchmenge des gleichen Tages eine negative Korrelation von  $r = -0,15$ . Bei der Auswertung der Meßdaten von 13 Kühen fand Theyerl-Abele (1990) eine negative Korrelation zwischen den IGF-1-Plasmakonzentrationen und der Milchleistung der Tiere. Ronge et al. (1988) wiesen ebenfalls auf den gegensätzlichen Verlauf der IGF-1-Werte im Blut und der Milchleistung hin. Allerdings sind Rückschlüsse zwischen den Konzentrationen des zirkulierenden und des lokal vorhandenen IGF-1 sehr schwierig zu ziehen und sehr vorsichtig zu bewerten, da diese Konzentrationen nicht korreliert sind (Baumrucker und Eröndu, 2000).

Houben et al. (1993) und Klaas (2000) wiesen in ihren Studien ein steigendes Mastitisrisiko mit zunehmender Milchleistung nach. Die niedrigeren IGF-1-Konzentrationen in der Milch von Tieren mit hoher Tagesleistung könnten ein Hinweis darauf sein, daß IGF-1 eine Schutzfunktion für das Euter ausübt. Jedoch konnte mit den hier vorliegenden Daten keine Berechnung über die Beziehung des IGF-1-Gehaltes mit der Gesamtleistung der Kuh durchgeführt werden. Collier et al. (1991) konnten keine Korrelation des IGF-1-Gehaltes in der Milch mit der 305-Tage-Leistung nachweisen. Niedrigere IGF-1-Werte bei höherer Milchmenge könnten auch auf einen Verdünnungseffekt hindeuten.

Daxenberger (1998) fand bei der Auswertung der Daten von 26 Kühen mittels linearer Regression keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem IGF-1-Gehalt der Milch und der Milchmenge. Nach einer bST-Behandlung allerdings stiegen die IGF-1-Werte in der Milch vor der Milchleistung an und es bestand eine ausgeprägte positive Korrelation zwischen dem relativen Anstieg des IGF-1-Werts und der zusätzlichen Milchmenge. Dieser Hinweis auf die zentrale Rolle des IGF-1 in der Vermittlung der milchmengensteigernden Wirkung des GH steht aber nicht grundsätzlich im Widerspruch zu den obigen Ergebnissen.

### 5.2.5 Trächtigkeit

Die Einflüsse von Laktationsstadium und Trächtigkeitsstadium auf die IGF-1-Konzentration lassen sich nur unter Schwierigkeiten, wenn überhaupt, genau voneinander abgrenzen. Die IGF-1-Mittelwerte in der Milch der nicht trächtigen und der tragenden Tiere unterschieden sich nicht signifikant. Unterteilt in die drei Laktationsabschnitte, ergaben sich für die tragenden Tiere in der Früh- und Hochlaktation tendenziell niedrigere Werte als für die nicht tragenden, in der Spätlaktation war die Situation umgekehrt. Insgesamt blieb sowohl bei tragenden als auch bei nicht trächtigen Tieren der typische Kurvenverlauf der IGF-1-Konzentrationen über die Laktation uneingeschränkt erhalten.

Bei der Betrachtung der IGF-1-Werte im Verlauf der Trächtigkeit ergab sich zum Ende der Trächtigkeit ein signifikanter Anstieg. Aus der Literatur ist bekannt, daß im Trockenstehersekret zwei Wochen ante partum die höchsten IGF-1-Konzentrationen gemessen werden (Vega et al., 1991). Der Anstieg der IGF-1-Konzentrationen im Verlauf der Trächtigkeit wird auch deutlich, wenn die Kühe innerhalb der Laktationsabschnitte miteinander verglichen werden. Dabei gibt es natürlich in der Früh- und Hochlaktation keine hochtragenden Tiere. Insgesamt ist wegen der unterschiedlichen Gruppengrößen (es liegen zum Teil sehr kleine Gruppen vor, die zwangsläufig einen hohen Standardfehler aufweisen) eine statistische Absicherung schwierig. Trotzdem ist ein Einfluß des Trächtigkeitsstadiums sichtbar.

Daxenberger (1998) vermutete den Grund für den Anstieg der gemessenen, statistisch unkorrigierten IGF-1-Konzentrationen in der Milch zum Ende der Laktation, also normalerweise bei fortgeschrittener Trächtigkeit, im Anstieg der plazentären

Östrogensekretion im zweiten Gestationstrimester. Röpke (1993) stellte ab der 10. Woche ante partum einen Abfall der IGF-1-Konzentrationen im Blut fest. Die Ursache dafür vermutete er in einer erhöhten Aufnahme des IGF-1 ins Euter.

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, daß der Anstieg der IGF-1-Mittelwerte zum Ende der Laktation auch bei nicht tragenden Tieren stattfindet. Der Grund für den Anstieg der IGF-1-Werte in der Milch trächtiger Tiere ab dem 200. Graviditätstag kann zumindest nicht allein in den oben erwähnten Veränderungen des Hormonhaushaltes liegen.

Für den IGF-1-Rezeptor ist eine Beeinflussung durch die Trächtigkeit nachgewiesen. Hadsell et al. (1990) konnten zeigen, daß seine Expression im Lauf der Laktation abnimmt, wobei die Zahl der Rezeptoren im Euter bei bestehender Trächtigkeit ansteigt (Baumrucker, 1986; Forsyth, 1989; Oka et al., 1991). Baumrucker und Eröndu (2000) warnen davor, die Bedeutung von Veränderungen in der Konzentration von Rezeptoren zu überschätzen. So ist zum Beispiel für den Insulinrezeptor nachgewiesen, daß schon eine Sättigung von 5 % der vorhandenen Rezeptoren für die maximale Wirkung ausreicht. Beim IGF-1-Rezeptor ist jedoch für maximale Wirkung die Absättigung aller Rezeptormoleküle nötig. Veränderungen in der Rezeptorenexpression ziehen hier auch Veränderungen in der Wirkung nach sich. Ein Absinken der Zahl der IGF-1-Rezeptoren bewirkt weniger Euterwachstum und ausgeprägtere Zelldifferenzierung (Neuenschwander et al., 1995). Eine Beteiligung von IGF-1 ist dabei sowohl an Mitose- als auch an Differenzierungsvorgängen nachgewiesen (Froesch et al., 1985).

Unterschiedliche Verhältnisse sind bei den IGF-Bindungsproteinen (IGFBP-2, IGFBP-3) nicht nur zwischen tragenden und nicht tragenden, sondern auch zwischen nicht tragenden Tieren zu finden, je nachdem ob sie trächtig werden oder nicht. Mit Eintritt der Trächtigkeit sinken die IGFBP-Konzentrationen im Euter ab. Diese Veränderung ist unabhängig von den im Serum vorliegenden Konzentrationen, also ein Ergebnis einer Modulation in der Synthesetätigkeit des Euters durch die Trächtigkeit und/oder durch laktationsinduzierte Faktoren (Baumrucker und Eröndu, 2000). Besnard et al. (1997) gelang bei Mensch und Nager der Nachweis von trächtigkeitspezifischen Proteasen.

Die Schwierigkeit einer Abgrenzung der Einflüsse von Laktationsabschnitt und Trächtigkeitsstadium auf die IGF-1-Konzentration liegt in dem engen Zusammenhang dieser Einflussfaktoren, gerade bei der Hochleistungskuh, begründet. Sowohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als auch die Hinweise auf eindeutig trächtigkeitsabhängige Veränderungen bei einzelnen Komponenten des IGF-Systems sprechen aber für einen Einfluß

der Trächtigkeit auf die IGF-1-Konzentrationen in der Milch. Dessen Bedeutung ist wahrscheinlich in der Vorbereitung des Euters auf die nächste Laktation zu sehen. Eventuell könnte IGF-1 aber auch eine Schutzfunktion auf die Zellen ausüben in einer Phase, in der die Nährstoffe nicht mehr uneingeschränkt dem Euter zugeführt werden, sondern in steigendem Maße von der wachsenden Frucht benötigt werden.

Nach der Geburt scheinen die hohen IGF-1-Konzentrationen im Kolostrum für die Entwicklung des Gastrointestinaltraktes des Neonaten von Bedeutung zu sein (Ślebodziński, 1994).

### 5.2.6 Zellzahl

Zwischen dem Linear Somatic Cell Score (LSCS) als Maß für den Zellgehalt einer Milchprobe und den IGF-1-Mittelwerten konnte eine positive Korrelation von  $r = +0,41$  berechnet werden. Die IGF-1-Meßwerte nahmen mit steigender Zellzahlklasse zu. Dabei waren die Unterschiede zwischen den Klassen bereits ab einer Zellzahl von 50.000/ml, also noch im physiologischen Bereich, statistisch signifikant.

Die Korrelation zwischen LSCS und dem Vorliegen bzw. Nichtvorliegen eines euterpathogenen Keimes in einer Milchprobe wurde mit  $r = +0,33$  berechnet. Eine Beeinflussung der Zellzahl durch Mastitiserreger ist aus der Literatur bekannt (de Vries, 1975; Labohm et al., 1998).

Daxenberger (1998) konnte eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen Zellzahl und IGF-1-Konzentration in Gesamtgemelksproben nachweisen. Liebe und Schams (1998) berechneten für Viertelvorgemelke eine stärker ausgeprägte Korrelation ( $r = +0,6$ ). Die Ursache für diesen Zusammenhang sehen sie in der Produktion von IGF-1 durch Leukozyten, die den Hauptanteil der somatischen Milchzellen ausmachen. Bei Entzündungen spielen sie eine wichtige Rolle im Abwehrsystem der Milchdrüse, die zum großen Teil durch Zytokine als Entzündungsmediatoren reguliert wird.

Bruckmaier et al. (1993) stellten bei experimentellen *E.-coli*-Endotoxinmastitiden einen Anstieg der IGF-1-Konzentrationen in der Milch fest, der dem Anstieg der Zellzahlen vorausging. Auch Harmon (1994) postulierte die Funktion des IGF-1 als Chemoattraktant für das Einströmen der Leukozyten in das Euter.

Sowohl Bensinger (1997) als auch Liebe (1996) fanden in einigen Milchproben Erhöhungen der Zellzahl ohne gleichzeitig angestiegene IGF-1-Konzentrationen. Bensinger zog daraus den Schluß, daß IGF-1-Werte und SCC nicht miteinander korreliert sind. Somit könnte die IGF-1-Konzentration zur genaueren Bewertung des SCC einer Milchprobe dienen, der je nach dem Zeitpunkt der Probennahme im Tagesverlauf größeren Schwankungen unterworfen ist.

Die nachgewiesene Produktion von IGF-1 durch Leukozyten (Baxter et al., 1991) und die für eine große Probenzahl sowohl für Gesamtgemelke (Daxenberger, 1998) als auch in der vorliegenden Arbeit für Viertelvorgemelksproben berechnete deutliche Korrelation zwischen IGF-1-Wert und SCC lassen IGF-1 als keine geeignete Größe erscheinen, um daraus weitere Informationen zur Beurteilung des SCC einer Milchprobe zu gewinnen.

### **5.2.7 Gesundheitsgruppe**

Sowohl Milchproben aus gesunden Eutervierteln als auch Milchproben mit unauffälliger Zellzahl, aber dem Nachweis eines Mastitiserregers hatten signifikant niedrigere IGF-1-Mittelwerte als Milchproben mit hoher Zellzahl, unabhängig davon, ob gleichzeitig ein euterpathogener Keim nachgewiesen wurde oder nicht.

Der Einfluß der Zellzahl auf die IGF-1-Konzentration ist somit größer als der Einfluß eines Mastitiserregers. Dies drückt sich auch in den berechneten Korrelationen aus. Zwischen den IGF-1-Mittelwerten und dem LSCS ließ sich eine positive Korrelation von  $r = +0,41$  berechnen. Zwischen den IGF-1-Mittelwerten und dem Vorhandensein beziehungsweise Nichtvorhandensein eines euterpathogenen Keimes in der Milchprobe betrug sie nur  $r = +0,11$ , die Korrelation zwischen LSCS und dem positiven oder negativen Keimnachweis betrug  $r = +0,33$ . Alle Korrelationen waren hochsignifikant.

### 5.2.8 Bakteriologischer Befund

In den bakteriologisch positiven Proben wurden vor allem Staphylokokken nachgewiesen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Wilson et al. (1997) und Klaas (2000) überein. Die Differenzierung mittels Clumping-Factor-Tests ergab einen überwiegenden Anteil von koagulase-negativen Staphylokokken (CNS). Koagulase-positive Staphylokokken (CPS), zu denen auch *S. aureus* gehört, waren nur in 8,3 % der bakteriologisch positiven Proben nachzuweisen. Den größten Teil der Streptokokken machte *Sc. uberis* aus, gefolgt von *Sc. dysgalactiae* und *Sc. agalactiae*.

Tendenziell waren mehr aus den Hintervierteln stammende Proben bakteriologisch positiv sowie Proben, die von älteren Tieren stammten. Dies entspricht den Beobachtungen von Gonzalez et al. (1990) und Lancelot et al. (1997) beziehungsweise von Jayarao et al. (1999).

In Proben, in denen kein euterpathogener Keim gefunden wurde, und in Proben, in denen CNS nachweisbar waren, lagen die höchsten IGF-1-Mittelwerte vor. Für Proben mit mehr als einem euterpathogenen Keim wurden signifikant niedrigere IGF-1-Mittelwerte berechnet. Nach Untersuchungen von Fenlon et al. (1995), Wilson et al. (1997) und Labohm et al. (1998), weisen Milchproben mit negativem bakteriologischen Untersuchungsergebnis die niedrigsten Zellzahlmittelwerte auf. Proben mit CNS-Nachweis haben im Vergleich deutlich erhöhte Zellzahlen, die aber noch unter den Zellzahlen liegen, die in Proben mit CPS gemessen werden. *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis* verursachen höhere Zellzahlen als Staphylokokken. Nach den vorliegenden Ergebnissen sind die IGF-1-Mittelwerte in Milchproben, die mit Keimen befallen sind, die eine besonders deutliche Zellzahlerhöhung verursachen, tendenziell niedriger als in Proben ohne Erregernachweis beziehungsweise in Proben, in denen sogenannte „minor pathogens“ nachgewiesen wurden.

Ein Erklärungsansatz wäre in der vermuteten Schutzfunktion des IGF-1 (Fukushima et al., 1999) zu suchen: Euterviertel, in denen eine bestimmte Menge IGF-1 biologisch aktiv ist, können sich gegen das Eindringen von euterpathogenen Keimen zur Wehr setzen beziehungsweise es liegen nur solche Keime vor, die keine heftige Erkrankung nach sich ziehen. Viertel, in denen weniger IGF-1 vorhanden ist, können sich gegen das Eindringen von pathogenen Keimen, die starke Entzündungsvorgänge auslösen, nicht mehr wehren.

In Einklang mit dieser These stehen die Beobachtungen von Bensinger (1997), die im Sekret von Kühen mit Kolimastitiden nur niedrige IGF-1-Konzentrationen nachwies. Bei Kühen mit

experimentell induzierter *E.-coli*-Endotoxinmastitis mit geringer ausgeprägten Symptomen waren höhere IGF-1-Werte zu beobachten.

Ein anderer Erklärungsansatz gründet darauf, daß der jeweilige Erreger die Dynamik der verursachten Entzündungsabläufe beeinflusst (Bramley, 1992). So könnte es, abhängig vom durch den jeweiligen Erreger ausgelösten Entzündungstyp, im Zuge der Abwehrreaktionen zur Ausbildung unterschiedlicher Zytokinprofile kommen.

### 5.2.9 Erkrankungen der Nachbarviertel

Statistisch abgesichert werden konnte ein Unterschied zwischen den IGF-1-Mittelwerten in Viertelproben aus vollständig gesunden Eutern und Proben mit normalem Sekret aus Eutern, in denen mindestens ein Viertel bakteriologisch positiv war und gleichzeitig erhöhte Zellzahlen aufwies. In diesen Proben waren die Werte signifikant erhöht. Auch in Proben mit Nachbarvierteln, die entweder erhöhte Zellzahlen oder aber Keimbefall aufwiesen, lagen erhöhte IGF-1-Werte vor, ohne daß sich dies allerdings statistisch absichern ließ.

Diesen Zusammenhang zwischen den IGF-1-Konzentrationen in Nachbarvierteln konnten Bruckmaier et al. (1993) und Bensinger (1997) nicht erkennen. Bei Tieren mit experimentell induzierter *E.-coli*-Endotoxinmastitis stiegen die IGF-1-Konzentrationen auch beim Vorliegen systemischer Reaktionen nur im Sekret der endotoxinbehandelten Viertel. Sie gingen deshalb von einer lokalen Bildung des IGF-1 im infizierten Viertel oder einer Diffusion des IGF-1 aus der Zirkulation durch die geschädigte Blut-Euter-Schranke in das betroffene Viertel. Bensinger (1997) konnte auch bei anderen Mastitismodellen (*S.-aureus*-Exotoxin) keinen Anstieg der IGF-1-Konzentrationen in den unbehandelten Vierteln erkennen.

Liebe und Schams (1998) dagegen stellten bei der Untersuchung von Milchproben von Kühen mit akuter oder chronischer subklinischer Mastitis in der Milch aus den unauffälligen Vierteln ebenfalls erhöhte IGF-1-Konzentrationen fest, ohne dies, der geringen Probenanzahl wegen, jedoch statistisch absichern zu können. Den SCC dieser als gesund eingestuften Viertel hatten sie allerdings nicht gemessen. Shuster et al. (1995) fanden im Sekret der Nachbarviertel von mit *E. coli* infizierten Vierteln einen Anstieg der BSA- und IGF-1-Konzentrationen. Sheffield

(1997) wies in den Nachbarvierteln von Vierteln, die mit *Sc. agalactiae* infiziert waren, signifikant erhöhte Mengen IGF-1-mRNA nach.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die bei Mastitis entstehenden Veränderungen nicht auf ein Viertel begrenzt sind. IGF-1 steigt in Geweben nach der Einwirkung unterschiedlicher Stressoren, wie zum Beispiel Hitze, Infektion oder oxidativem Streß, und im Zuge der Wundheilung, an. Es ist also entweder beteiligt an der Reparatur des zerstörten Gewebes oder aber am Schutz der noch unversehrten Zellverbände vor Zerstörung und vor dem Eindringen und der Vermehrung von Erregern. So fanden Fukushima et al. (1999) bei Mäusen, die mit IGF-1 und GH vorbehandelt waren, nach großflächigen Verbrennungen signifikant erhöhte Überlebensraten. Der Zellverband im Darmzottenepithel war stabiler als bei unbehandelten Kontrolltieren, und die Ausbreitung der Bakterien im Körper verlief langsamer. In Zellkulturen verhinderte IGF-1 in physiologischen Konzentrationen die Vermehrung des AIDS-Virus (Germinario et al., 1995).

Bruckmaier et al. (1993) konnten dagegen keine therapeutische Wirkung von intramammären IGF-1-Infusionen bei *E.-coli*-Endotoxin-Mastitiden feststellen. Es wäre analog zu den Mausversuchen von Fukushima et al. (1999) zu überprüfen, ob eine Behandlung mit IGF-1 vor der Infektion einen Schutzeffekt hat. Momentan kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nur vermutet werden, daß die erhöhten IGF-1-Konzentrationen in den an mastitiskranke Viertel angrenzenden Drüsenkomplexen eine Schutzwirkung auf die Zellen dieser Viertel ausüben könnten.

### 5.3 Schlußfolgerung

Das in der Milch nachweisbare IGF-1 stammt in wechselnden Anteilen aus dem Blut (Prosser et al., 1987) und aus lokaler Produktion im Eutergewebe (Campbell et al., 1991). Darüber hinaus scheint es von den Leukozyten im Euter und in der Milch produziert zu werden (Liebe und Schams, 1998).

Ein schützender Einfluß von IGF-1 auf Zellverbände wurde von Fukushima et al. (1999) bei Mäusen nachgewiesen. Die erhöhten IGF-1-Mittelwerte in Vierteln, die besonders exponiert gegenüber Umweltreizen sind (Hinter- und einem entzündeten benachbarte Euterviertel) beziehungsweise zu Zeiten erhöhter Belastung für das Euter oder den Gesamtorganismus (gegen Ende der Laktation und der Trächtigkeit) sprechen für eine Schutzfunktion des IGF-1 auch im Euter und/oder eine Beteiligung an Heilungsprozessen im Gewebe. Fraglich ist, ob die für Milchproben mit euterpathogenen Keimen errechneten niedrigen Mittelwerte eine Voraussetzung oder eine Folge dieser Besiedlung sind, wobei ersteres ein weiterer Hinweis auf die Schutzfunktion dieses Zytokins wäre.

Aufgrund der nachgewiesenen zahlreichen Einflußfaktoren auf die IGF-1-Konzentrationen ist deren individuelle Schwankungsbreite sehr groß. Absolute Grenzwerte zwischen „physiologischen“ und „pathologischen“ Konzentrationen werden kaum bestimmbar sein, der diagnostische und prognostische Wert dieses Wachstumsfaktors ist deswegen äußerst vorsichtig zu beurteilen.

Die weitere Überprüfung des Schutzpotentials des IGF-1 erscheint trotzdem weiterhin lohnend. Auch neue Erkenntnisse über die IGFBP und die stattfindenden Interaktionen ermöglichen immer genauere Einblicke in die vielfältigen Funktionen dieses Zytokins und geben Aufschluß über die entscheidenden Vorgänge und Regelungen im Verlaufe einer Euterentzündung.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Ermittlung der IGF-1-Konzentrationen in der Milch eutergesunder und mastitiskranker Kühe aus unterschiedlichen Herden mit einem validierten Meßverfahren (Radioimmunist mit funktioneller Abtrennung der IGF-Bindungsproteine), um eine Datengrundlage über IGF-1-Werte in der Kuhmilch zu erarbeiten. Anschließend sollte der Einfluß physiologischer sowie pathologischer Faktoren auf die IGF-1-Konzentration in der Milch untersucht werden.

Dazu wurden die Daten von 5040 Viertelanfangsgemelksproben von 498 Kühen statistisch ausgewertet. Die Proben waren im Rahmen einer Feldstudie von Mai–Dezember 1998 auf acht landwirtschaftlichen Betrieben in Schleswig-Holstein gezogen worden. Dabei wurden gleichzeitig Daten über das Herdenmanagement und die Gesundheit der Tiere gesammelt.

2664 Proben stammten von rotbunten, 2376 von schwarzbunten Kühen. Der Einfluß der Rasse auf die IGF-1-Konzentration erwies sich als nicht signifikant (F-Test:  $p > 0,1$ ). Statistisch signifikant war der Einfluß der physiologischen Faktoren Herdensaison, Euterviertel, Laktationsnummer und -abschnitt, somatische Zellzahl, Leistungsklasse und Trächtigkeitsstadium. Als pathologische Faktoren übten erhöhte Zellzahlen und bakteriologischer Befund signifikante Einflüsse aus.

In der Früh-laktation (Laktationstag 5 bis 80) wurden signifikant höhere IGF-1-Konzentrationen gemessen als in der Hochlaktation. In der Spät-laktation (ab Laktationstag 241) stiegen sie wieder signifikant an. Dabei nahmen die IGF-1-Mittelwerte mit steigendem Alter, ausgedrückt durch die Laktationsnummer der Kühe (Laktationsnummer 1, 2 und  $\geq 3$ ), signifikant zu.

Für Proben von Kühen mit einer durchschnittlichen Milchleistung über 20 kg/Tag wurden signifikant niedrigere IGF-1-Mittelwerte berechnet als für Proben von Kühen, die bis zu 20 kg Milch pro Tag gaben.

Von 388 Kühen lagen gesicherte Angaben über ihren Trächtigkeitszustand vor. In Proben von Kühen, die länger als 200 Tage tragend waren, wurden signifikant höhere IGF-1-Konzentrationen gemessen als in Proben von nicht oder kürzer tragenden Tieren. Die niedrigsten Werte fanden sich in Milchproben von Kühen zwischen dem 35. und 100. Tag der Trächtigkeit, sie waren auch im Vergleich zu nicht tragenden Tieren signifikant erniedrigt.

In 23,1 % der ausgewerteten Milchproben konnten euterpathogene Keime nachgewiesen werden. Koagulase-negative Staphylokokken lagen in 70,8 % der bakteriologisch positiven Proben vor, in 16,6 % *Sc. uberis*, 8,3 % enthielten koagulase-positive Staphylokokken, 2,9 % *Sc. dysgalactiae* und 1,4 % *Sc. agalactiae*. Proben, die mit mehr als einem euterpathogenen Keim infiziert waren, wiesen signifikant niedrigere IGF-1-Mittelwerte auf als Proben ohne Infektion beziehungsweise Proben mit koagulase-negativen Staphylokokken. Die Korrelation zwischen den IGF-1-Mittelwerten und dem Vorliegen beziehungsweise nicht Vorliegen eines euterpathogenen Keimes in der Probe betrug  $r = +0,11$ .

Zwischen IGF-1-Konzentration und Zellzahl einer Milchprobe konnte ein linearer Zusammenhang nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen logarithmierten IGF-1-Werten und LSCS wurde mit  $r = +0,41$  berechnet. Beim Vergleich der Mittelwerte der unterschiedlichen Zellzahlklassen fanden sich statistisch signifikante Unterschiede bereits ab einer Zellzahl von 50.000/ml, also noch im physiologischen Bereich.

Der Gesundheitszustand der anderen Viertel eines Euters beeinflusste die in einem gesunden Viertel meßbaren IGF-1-Konzentrationen signifikant. Die niedrigsten IGF-1-Mittelwerte wurden für gesunde Viertel in gesunden Eutern berechnet. Wurde in einem der Viertel eines Euters erhöhte Zellzahlen in Kombination mit einer Infektion mit einem Mastitiserreger nachgewiesen, so waren die IGF-1-Mittelwerte der Milchproben aus den noch gesunden Viertel dieses Euters signifikant erhöht.

Die erhöhten IGF-1-Mittelwerte, die in besonders exponierten Vierteln oder zu Zeiten erhöhter Belastungen für den Gesamtorganismus nachweisbar sind, lassen neben einer Beteiligung an Heilungsprozessen eine Schutzfunktion des IGF-1 für das Eutergewebe vermuten.

## 7 Summary

### **Influences on the concentrations of IGF-1 in bovine milk – a field study**

A thoroughly validated radioimmunoassay with functional separation of IGF-1 from IGFBP was used to measure IGF-1 concentrations in quarter foremilk samples, which had been collected monthly on eight farms in Schleswig-Holstein, Germany, from May to December 1998. Data concerning herd management and health status had been collected as well.

The objective of the investigation was to determine IGF-1 concentrations in milk samples of cows from different herds, and of different health status of the udder. The resulting data pool, containing the results of 5040 milk samples from 498 cows, made it possible to identify physiological and pathological parameters affecting the IGF-1 content of milk.

2664 milk samples were from Red Holstein, 2376 from Holstein cows. The influence of breed on the IGF-1 content was not significant (F-Test:  $p > 0,1$ ). The physiological parameters herd x season, quarter of the udder, number and stage of lactation, somatic cell count, class of milk yield and stage of gestation had a significant influence on the concentration of IGF-1 in milk. The pathological parameters that had a significant influence were high somatic cell counts and bacteriological status.

In early lactation (day five to eighty) the measured IGF-1 contents were significantly higher than in the middle of lactation and rose again significantly in late lactation, which is after day 240.

Milk of primiparous cows had the lowest IGF-1 contents. The contents rose significantly with the number of lactation (1, 2,  $\geq 3$ ).

Cows with a mean milk yield of more than 20 kg/day had significantly lower IGF-1-concentrations than cows whose mean daily milk yield was less than 20 kg.

Milk IGF-1 levels were also shown to depend on the stage of pregnancy. Among a total of 388 cows, which were verified to be pregnant during sampling, the lowest IGF-1 levels were found in cows 35 to 100 days post coitum (dpc), even compared to non-pregnant cows. Milk of cows more than 200 dpc contained significantly more IGF-1 than milk of cows less than 200 dpc and of non-pregnant cows. Further, an interaction between the state of pregnancy and the state of lactation could be demonstrated.

Mastitis pathogens were found in 23.1 % of samples. 70.8 % of positive samples contained coagulase-negative staphylococci, 16.6 % were infected with *Sc. uberis*, 8.3 % with coagulase-positive staphylococci, 2.9 % *Sc. dysgalactiae*, 1.4 % *Sc. agalactiae*. Samples that were infected with more than one mastitis pathogen had significantly lower IGF-1 contents than samples with no bacterial infection or samples with coagulase-negative staphylococci.

A linear correlation of  $r = +0.41$  could be shown between IGF-1 concentration and somatic cell count.

Health status of the adjacent udder quarters had a significant influence on the IGF-1 content of samples collected from healthy quarters. If one of the quarters of an udder had a SCC greater than 100.000/ml in combination with an infection with a mastitis pathogen, IGF-1 contents rose significantly in the milk of still healthy quarters of this udder. Lowest IGF-1 contents were measured in samples of healthy quarters from healthy udders.

In quarters that were especially exponents to environmental stress as well as during times of risen demands on the cow's organism, higher IGF-1 contents had been measured in the milk. This points to a protective function of IGF-1 in the udder as well as to the participation of IGF-1 in healing processes.

## 8 Literaturverzeichnis

ARKINS, S., DANTZER, R., KELLEY, K.W. (1993):

Somatolactogens, somatomedins, and immunity.

J. Dairy Sci. 76, 2437-2450.

BALTESKARD, L., UNNEBERG, K., HALVORSEN, D., HANSEN, J.B., REVHAUG, A. (1998):

Effects of insulin-like growth factor 1 on neutrophil and monocyte functions in normal and septic states.

J. Parenter. Enteral Nutr. 22, 127-135.

BANG, P. (1995):

Valid measurements of total IGF concentrations in biological fluids. Recommendations from the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Insulin-like Growth Factors.

Growth Regul. 5, 66-67.

BAUMAN, D.E. (1992):

Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology.

J. Dairy Sci. 75, 3432-3451.

BAUMAN, D.E. (1999):

Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application.

Dom. Anim. Endocr. 17, 101-116.

BAUMAN, D.E., EPPARD, P.J., DEGEETER, M.J., LANZA, G.M. (1985):

Response of high-producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin.

J. Dairy Sci. 68, 1352-1362.

BAUMAN, G. (1991):

Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins.

Endocrine Reviews 12, 424-449.

BAUMRUCKER, C.R. (1986):

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue explants obtained from pregnant cows.

J. Dairy Sci. 69 (Suppl. 1), 120.

BAUMRUCKER, C.R., ERONDU, N.E. (2000):

Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk.  
J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 5, 53-64.

BAUMRUCKER, C.R., CAMPANA, W.M., GIBSON, C.A., KERR, D.E. (1993):

Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in milk: sources and functions.  
Endocrine Regul. 27, 157-172.

BAXTER, J.B., BLALOCK, J.E., WEIGENT, D.A. (1991):

Characterization of immunoreactive insulin-like growth factor-I from leucocytes and its regulation by growth hormone.  
Endocrinology 129, 1727-1734.

BENSINGER, K. (1997):

Mögliche Wechselbeziehungen zwischen somatischen Zellen und Wachstumsfaktoren in der Rindermilch.  
Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

BESNARD, N., PISSELET, C., MONNIAUX, D., MONGET, P. (1997):

Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary.  
Biol. Reprod. 56, 1050-1058.

BIRD, J.L., TYLER, J.A. (1994):

Dexamethasone potentiates the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on collagen production in cultured human fibroblasts.  
J. Endocrinol. 142, 571-579.

BLUM, W.F., BREIER, B.H. (1994):

Radioimmunoassays for IGFs and IGFbps.  
Growth Regulation 4, 11-19.

BRAMLEY, A.J. (1992):

Mastitis and machine milking.  
In: Bramley, A.J., Dodd, F.H. (Hrsg.): Machine Milking and Lactation. Insight Books, Newbury, England; Vermont, USA.

- BREIER, B.H., GALLAHER, B.W., GLUCKMAN, P.D. (1991):  
Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls.  
J. Endocrinol. 128, 347-357.
- BRUCKMAIER, R.M., SCHÄLLIBAUM, M., BLUM, J.W. (1993):  
Escherichia coli endotoxin-induced mastitis in dairy cows: changes and importance of insulin-like growth factor I and oxytocin.  
Milchwissenschaft 48, 374-378.
- BURRIN, D.G. (1997):  
Is milk-borne insulin-like growth factor-1 essential for neonatal development?  
J. Nutrition 127, 975-979.
- BURVENICH, C., PAAPE, M.J., HOEBEN, D., DOSOGNE, H., MASSART-LEËN, A.M., BLUM, J. (1999):  
Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone.  
Dom. Anim. Endocr. 17, 149-159.
- CAMPBELL, P.G., BAUMRUCKER, C.R. (1989):  
Insulin-like growth factor-I and its association with binding proteins in bovine milk.  
J. Endocrinol. 120, 21-29.
- CAMPBELL, P.G., SKAAR, T.C., VEGA, J.R., BAUMRUCKER, C.R. (1991):  
Secretion of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding proteins from bovine mammary tissue in vitro.  
J. Endocrinol. 128, 219-228.
- CAPUCO, A.V., KEYS, J.E., SMITH, J.J. (1989):  
Somatotrophin increases thyroxine-5'-monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow.  
J. Endocrinology 121, 205-211.
- CEELEN, H.J. (1995):  
Bovine somatotropin and cow health – what are the facts?  
Can. Vet. J. 36, 25-27.
- COHICK, W.S. (1998):  
Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation.  
J. Dairy Sci. 81, 1769-1777.

- COHICK, W.S., CLEMMONS, D.R. (1993):  
The insulin-like growth factors.  
Annu. Rev. Physiol. 55, 131-153.
- COLEMAN, M.E., RUSSELL, L., ETHERTON, T.D. (1994):  
Porcine somatotropin (pST) increases IGF-I mRNA abundance in liver and subcutaneous adipose tissue but not in skeletal muscle of growing pigs.  
J. Anim. Sci. 72, 918-924.
- COLLIER, R.J., MILLER, M.A., HILDEBRANDT, J.R., TORKELSON, A.R., WHITE, T.C., MADSEN, K.S., VICINI, J.L., EPPARD, P.J., LANZA, G.M. (1991):  
Factors affecting insulin-like growth factor-I concentration in bovine milk.  
J. Dairy Sci. 74, 2905-2911.
- COLLIER, R.J., BYATT, J.C., DENHAM, S.C., EPPARD, P.J., FABELLAR, A.C., HINTZ, R.L., MCGRATH, M.F., MCLAUGHLIN, C.L., SHEARER, J.K., VEENHIZEN, J.J., VICINI, J.L. (2001):  
Effects of sustained release bovine somatotropin (Sometribove) on animal health in commercial dairy herds.  
J. Dairy Sci. 84, 1098-1108.
- COOPER, T.G. (1981):  
Immunchemie.  
In: Cooper, T.G., übersetzt und bearbeitet von Neumeier, R., Maurer, H.R.:  
Biochemische Arbeitsmethoden. De Gruyter, Berlin, New York, 242-288.
- COSGROVE, L., OCCHIODORO, F. (2000):  
The type 1 IGF receptor and the insulin receptor.  
GroPep Technical Bulletin No. 7.  
<http://www2.gropep.com.au/site/restrict/tb7.pdf>
- CULLOR, J.S., TYLER, J.W. (1996):  
Mammary gland health and disorders.  
In: Smith, B.P. (Hrsg.): Large Animal Internal Medicine. Second edition. Mosby, St. Louis, Missouri, 1177-1197.
- DAXENBERGER, A. (1998):  
Analytische Untersuchungen zum Nachweis der Behandlung von Kühen mit rekombinantem bovinen Somatotropin (bST) anhand von Milchproben.  
Dissertation, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München-Weihenstephan.

DAXENBERGER, A., BREIER, B.H., SAUERWEIN, H. (1998):

Increased milk levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) for the identification of bovine somatotropin (bST) treated cows.

Analyst 123, 2429-2435.

DAUGHADAY, W.H., KAPADIA, M., MARIZ, I. (1987):

Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay.

J. Lab. Clin. Med. 109, 355-363.

DEHNHARD, M., CLAUS, R., MUNZ, O., WEILER, U. (2000):

Course of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I (IGF-I) in mammary secretions of the goat during end-pregnancy and early lactation.

J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med. 47, 533-540.

DEKKER, J.C., MALLARD, B.A., LESLIE, K.E. (1994):

Workshop: genetic improvement of resistance to mastitis of dairy cattle with special emphasis on somatic cell count.

J. Dairy Sci. 77, 616-618.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT E.V., DVG (1994):

Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem.

Sachverständigenausschuß „Subklinische Mastitis“ des Arbeitskreises Eutergesundheit der Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitskreises Lebensmittelhygiene, 3. Auflage, Gießen.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT E.V., DVG (2000):

Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter aseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern.

Sachverständigenausschuß „Subklinische Mastitis“ des Arbeitskreises Eutergesundheit der Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Gießen.

DEUTSCHER HOLSTEIN VERBAND E.V. (2002):

Holsteinzucht.

<http://www.holstein-dhv.de>

DE VRIES, T. (1975):

Primary infection of milk.1. Bacterial infection inside the udder and its relation with the cell count in milk.

Neth. Milk Dairy J. 29, 127-134.

- DOGGWEILER, R., HESS, E. (1983):  
Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter.  
Milchwissenschaft 38, 5-8.
- DUGUAY, S.J. (1999):  
Post-translational processing of insulin-like growth factors.  
Horm. Metab. Res. 31, 43-49.
- ELSAESSER, F., PARVIZI, N. (1996):  
Zwanzig Jahre Forschungsbereich Endokrinologie Mariensee: Neuere Erkenntnisse zur hormonalen und molekularen Steuerung des Wachstums beim Schwein.  
Züchtungskunde 68, 280-296.
- ERSKINE, R.J., EBERHART, R.J., HUTCHINSON, L.J., SPENCER, S.B., CAMPBELL, M.A. (1988):  
Incidence and type of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 192, 761-765.
- FENLON, D.R., LOGUE, D.N., GUNN, J., WILSON, J. (1995):  
A study of mastitis bacteria and herd management practices to identify their relationship to high somatic cell counts in bulk tank milk.  
Br. Vet. J. 151, 17-25.
- FLINT, D.J., TONNER, E., ALLAN, G.J. (2000):  
Insulin-like growth factor binding proteins: IGF-dependent and -independent effects in the mammary gland.  
J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 5, 65-73.
- FORSYTH, I.A. (1989):  
Growth factors in mammary gland function.  
J. Reprod. Fert. 85, 759-770.
- FREY, R.S., HATHAWAY, M.R., DAYTON, W.R. (1994):  
Comparison of the effectiveness of various procedures for reducing or eliminating insulin-like growth factor-binding protein interference with insulin-like growth factor-I radioimmunoassay on porcine sera.  
J. Endocrinol. 140, 229-237.
- FROESCH, E.R., SCHMID, C., SCHWANDER, J., ZAPF, J. (1985):  
Actions of insulin-like growth factors.  
Ann. Rev. Physiol. 47, 443-467.

- FU, Y.-K., ARKINS, S., WANG, B.S., KELLEY, K.W. (1991):  
A novel role of growth hormone and insulin-like growth factor-I: priming neutrophils for superoxide anion secretion.  
*J. Immunology* 146, 1602-1608.
- FUKUSHIMA, R., SAITO, H., INOUE, T., FUKATSO, K., INABA, T., HAN, I., FURUKAWA, S., LIN, M.-T., MUTO, T. (1999):  
Prophylactic treatment with growth hormone and insulin-like growth factor I improve systemic bacterial clearance and survival in a murine model of burn-induced gut-derived sepsis.  
*Burns* 25, 425-430.
- GARCIA-PEÑARRUBIA, P., KOSTER, F.T., KELLEY, R.O., MCDOWELL, T.D., BANKHURST, A.D. (1989):  
Antibacterial activity of human natural killer cells.  
*J. Exp. Med.* 169, 99-113.
- GERMINARIO, R.J., DESANTIS, T., WAINBERG, M.A. (1995):  
Insulin-like growth factor 1 and insulin inhibit HIV type 1 replication in cultured cells.  
*AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11, 555-561.
- GIBSON, C.A., STALEY, M.D., BAUMRUCKER, C.R. (1999):  
Identification of IGF binding proteins in bovine milk and the demonstration of IGFBP-3 synthesis and release by bovine mammary epithelial cells.  
*J. Anim. Sci.* 77, 1547-1557.
- GLIMM, D.R., BARACOS, V.E., KENNELLY, J.J. (1988):  
Effect of bovine somatotropin on the distribution of immunoreactive insulin-like growth factor-I in lactating bovine mammary tissue.  
*J. Dairy Sci.* 71, 2923-2935.
- GLUCKMAN, P.D., BREIER, B.H., DAVIS, S.R. (1987):  
Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the ruminant.  
*J. Dairy Sci.* 70, 442-466.
- GONZALEZ, R.N., JASPER, D.E., KRONLUND, N.C., FARVER, T.B., CULLOR, J.S., BUSHNELL, R.B., DELLINGER, J.D. (1990) :  
Clinical mastitis in two California dairy herds participating in contagious mastitis control programs.  
*J. Dairy Sci.* 73, 648-660.

GROPEP (2001):

IGF comparative sequence chart.

<http://www.gropep.com.au/site/guest/igf.pdf>

GROPP, J., SCHUHMACHER, A. (1993):

Ernährung während der Gravidität.

In: Richter, J., Götze, R., Grunert, E., Arbeiter, K. (Hrsg.): Tiergeburtshilfe. 4. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, 64-79.

GROSVENOR, C.E., PICCIANO, M.F., BAUMRUCKER, C.R. (1993):

Hormones and growth factors in milk.

Endocr. Rev. 14, 710-728.

GRUNERT, E., HOEDEMAKER, M., WEIGT, U. (1996):

Euterkrankheiten.

In: Grunert, E. (Hrsg.): Buiatrik: Kurzgefaßte Darstellung. Bd. 1. Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung. 5. überarb. u. erw. Auflage. Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 21-68.

GUTIERREZ, C.G., CAMPBELL, B.K., ARMSTRONG, D.G., WEBB, R. (1997):

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells *in vitro* and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: an evaluation of IGF-binding protein extraction protocols.

J. Endocrinol. 153, 231-240.

HADSELL, D.L., CAMPBELL, P.G., BAUMRUCKER, C.R. (1990):

Characterization of the change in type I and II insulin-like growth factor receptors of bovine mammary tissue during the pre- and postpartum periods.

Endocrinology 126, 637-643.

HAMMON, H.M., ZANKER, I.A., BLUM, J.W. (2000):

Delayed colostrum feeding affects IGF-I and insulin plasma concentrations in neonatal calves.

J. Dairy Sci. 83, 85-92.

HAMMOND, B.G., COLLIER, R.J., MILLER, M.A., MCGRATH, M., HARTZELL, D.L., KOTTS, C., VANDAELE, W. (1990):

Food safety and pharmacokinetic studies which support a zero (0) meat and milk withdrawal time for use of sometribove in dairy cows.

Ann. Rech. Vet. 21, Suppl. 1., 107S-120S.

HARMON, R.J. (1994):

Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts.

J. Dairy Sci. 77, 2103-2112.

HENSEN, S.M., PAVIČIĆ, M.J.A.M.P., LOHUIS, J.A.C.M., DE HOOG, J.A.M.,  
POUTREL, B. (2000):

Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ.

J. Dairy Sci. 83, 1966-1975.

HIPPEL, T., KRATZSCH, J., GRÜN, E. (1999):

Die Bedeutung des insulinähnlichen Wachstumsfaktors I (IGF-I) für die Proliferation und Differenzierung tierischer Zellen.

Prakt. Tierarzt 80, 234-244.

HOEBEN, D., BURVENICH, C., EPPARD, P.J., HARD, D.L. (1999a):

Effect of recombinant bovine somatotropin on milk production and composition of cows with *Streptococcus uberis* mastitis.

J. Dairy Sci. 82, 1671-1683.

HOEBEN, D., BURVENICH, C., EPPARD, P.J., BYATT, J.C., HARD, D.L. (1999b):

Effect of bovine somatotropin on neutrophil functions and clinical symptoms during *Streptococcus uberis* mastitis.

J. Dairy Sci. 82, 1465-1481.

HOFFMANN, B. (1994):

Gravidität, Geburt und Puerperium.

In: Döcke, F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage, Fischer Verlag, Jena, 509-543.

HOUBEN, E.H.P., DIJKHUIZEN, A.A., VAN ARENDONK, J.A.M., HUIRNE, R.B.M. (1993):

Short- and long-term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle.

J. Dairy Sci. 76, 2561-2578.

HURLEY, W.L. (2000):

Lactation biology. ANSCI 308.

<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/mastitis.html>

IBELGAUFTS, H. (1995):

Lexikon Zytokine.

Medikon Verlag, München.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1987):

Bovine mastitis – definition and guidelines for diagnosis.

IDF Doc. 211.

JAYARAO, B.M., GILLESPIE, B.E., LEWIS, M.J., DOWLEN, H.H., OLIVER, S.P. (1999):

Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd.

Zentralbl. Veterinärmed. B 46, 433-442.

JUDGE, L.J., ERSKINE, R.J., BARTLETT, P.C. (1997):

Recombinant bovine somatotropin and clinical mastitis: incidence, discarded milk following therapy, and culling.

J. Dairy Sci. 80, 3212-3218.

KARG, H. (1988):

Wachstumshormon: Von den physiologischen Grundlagen zu einem aktuellen Thema in der Tierproduktion.

VET 3, 10-18.

KEHRLI, M.E., JR., SHUSTER, D.E. (1994):

Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland.

J. Dairy Sci. 77, 619-627.

KELLEY, K.W. (1989):

Growth hormone, lymphocytes and macrophages.

Biochem. Pharmacol. 38, 705-713.

KELLEY, K.W. (1990):

The role of growth hormone in modulation of the immune response.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 594, 95-103.

KIRCHGESSNER, M., ROTH, F.X., SCHAMS, D., KARG, H. (1987):

Influence of exogenous growth hormone (GH) on performance and plasma GH concentrations of female veal calves.

J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 58, 50-59.

KLAAS, I. (2000):

Untersuchungen zum Auftreten von Mastitiden und zur Tiergesundheit in 15 Milchviehbetrieben Schleswig-Holsteins.

Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin.

KOOLMAN, J., RÖHM, K.-H. (1998):

Taschenatlas der Biochemie. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 370.

KRONFELD, D.S. (1988):

Biologic and economic risks associated with use of bovine somatotropins.

J.A.V.M.A. 192, 1693-1696.

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

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

Milchwissenschaft 53, 63-66.

LACY-HULBERT, S.J., HILLERTON, J.E. (1995):

Physical characteristics of the bovine teat canal and their influence on susceptibility to streptococcal infection.

J. Dairy Res. 62, 395-404.

LANCELOT, R., FAYE, B., LESCOURRET, F. (1997):

Factors affecting the distribution of clinical mastitis among udder quarters in French dairy cows.

Vet. Res. 28, 45-53.

LEAN, I.J., BRUSS, M.L., TROUTT, H.F., GALLAND, J.C., FARVER, T.B., ROSTAMI, J., HOLMBERG, C.A., WEAVER, L.D. (1994):

Bovine ketosis and somatotrophin: risk factors for ketosis and effects of ketosis on health and production.

Res. Vet. Sci. 57, 200-209.

LEAN, I.J., WADE, L., BECKETT, S.D. (2000):

Bovine somatotropin and monensin: emerging technologies.

<http://www.afns.ualberta.ca/wcds/wcd96/wcd96237.htm>.

LIEBE, A. (1996):

Zusammenhänge zwischen Zellzahl und Wachstumsfaktorengehalt der Milch sowie Mastitis beim Rind unter besonderer Berücksichtigung von Haltungseinflüssen.

Dissertation, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München-Weihenstephan.

LIEBE, A., SCHAMS, D. (1998):

Growth factors in milk: interrelationships with somatic cell count.

J. Dairy Res. 65, 93-100.

LISSEMORE, K.D., LESLIE, K.E., MCBRIDE, B.W., BURTON, J.H., WILLAN, A.R., BATEMAN, K.G. (1991):

Observations on intramammary infection and somatic cell counts in cows treated with recombinant bovine somatotropin.

Can. J. Vet. Res. 55, 196-198.

LISTRAT, A., GERRARD, D.E., BOULLE, N., GROVER, A., ROBELIN, J. (1994) :

In situ localization of muscle insulin-like growth factor-II mRNA in developing bovine fetuses.

J. Endocrinol. 140, 179-187.

LKV (2002):

Die Leistungskontrollergebnisse des Kontrolljahres 2001.

Landeskontrollverband Schleswig-Holstein e.V.

MALVEN, P.V., HEAD, H.H., COLLIER, R.J., BUONOMO, F.C. (1987):

Periparturient changes in secretion and mammary uptake of insulin and in concentrations of insulin and insulin-like growth factors in milk of dairy cows.

J. Dairy Sci. 70, 2254-2265.

MCCLARY, D.G., GREEN, H.B., BASSON, R.P., NICKERSON, S.C. (1994):

The effects of a sustained-release recombinant bovine somatotropin (somidobove) on udder health for a full lactation.

J. Dairy Sci. 77, 2261-2271.

MCCUSKER, R.H. (1998):

Controlling insulin-like growth factor activity and the modulation of insulin-like growth factor binding protein and receptor binding.

J. Dairy Sci. 81, 1790-1800.

MCGRATH, M.F., COLLIER, R.J. (1988):

Effect of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on ruminant mammary development.

J. Dairy Sci. 71 (Suppl. 1), 229.

MIELKE, H. (1994):

Physiologie der Laktation.

In: Wendt, K., Bostedt, H., Mielke, H., Fuchs, H.W. (Hrsg.): Euter- und Gesäugekrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena, 64-105.

MILLER, J.R., THOMSEN, P.D., DIXON, S.C., TUCKER, E.M., KONFORTOV, B.A., HARBITZ, I. (1992):

Synteny mapping of the bovine IGHG2, CRC and IGF1 genes.

Anim. Genet. 23, 51-58.

NEUENSCHWANDER, S., ROBERTS, C.T., JR., LEROITH, D. (1995):

Growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by stable expression of an insulin-like growth factor I receptor antisense ribonucleic acid.

Endocrinology 136, 4298-4303.

NEUENSCHWANDER, S., SCHWARTZ, A., WOOD, T.L., ROBERTS, C.T.J., HENNINGHAUSEN, L., LEROITH, D. (1996):

Involution of the lactating mammary gland is inhibited by the IGF system in a transgenic mouse model.

J. Clin. Invest. 97, 2225-2232.

OKA, T., YOSHIMURA, M., LAVANDERO, S., WADA, K., OHBA, Y. (1991):

Control of growth and differentiation of the mammary gland by growth factors.

J. Dairy Sci. 74, 2788-2800.

OLDENBROEK, J.K., GARSSEN, G.J., TEN NAPEL, J., VERPLANKE, J.C., BROWN, A.C.G., JONKER, L.J. (1991):

Effect of treating dairy cows of three breeds with recombinantly derived bovine somatotropin for three years.

Lifest. Prod. Sci. 27, 265-284.

PAAPE, M.J., CAPUCO, A.V. (1997):

Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats.

J. Anim. Sci. 75, 556-565.

- PEEL, C.J., BAUMAN, D.E. (1987):  
Somatotropin and lactation.  
J. Dairy Sci. 70, 474-486.
- PELL, A.N., TSANG, D.S., HOWLETT, B.A., HUYLEYER, M.T., MESEROLE, V.K., SAMUELS, W.A.,  
HARTNELL, G.F., HINTZ, R.L. (1992):  
Effects of a prolonged-release formulation of somatotribove (*n*-methionyl bovine  
somatotropin) on Jersey cows.  
J. Dairy Sci. 75, 3416-3431.
- POLITIS, I., ZHAO, X., MCBRIDE, B.W., BURTON, J.H. (1992):  
Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 30, 399-410.
- PROSSER, C.G., FLEET, I.R., CORPS, A.N. (1989):  
Increased secretion of insulin-like growth factor-I into milk of cows treated with  
recombinant derived bovine growth hormone.  
J. Dairy Res. 56, 17-26.
- PROSSER, C.G., DAVIS, A.J., FLEET, I.R., REES, L.H., HEAP, R.B. (1987):  
Mechanism of transfer of IGF-1 into milk.  
J. Endocrinol. 1/5 (Suppl.), 91.
- REICHMUTH, J. (1975):  
Somatic cell counting – interpretation of results.  
IDF Doc. 85, 93-124.
- RECHLER, M.M. (1993):  
Insulin-like growth factor binding proteins.  
Vit. Horm. 47, 1-114.
- RINDERKNECHT, E., HUMBEL, R.E. (1978):  
The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural  
homology with proinsulin.  
J. Biol. Chem. 253, 2769-2776.
- RONGE, H., BLUM, J.W. (1988):  
Somatomedin C and other hormones in dairy cows around parturition, in newborn  
calves and in milk.  
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 60, 168-176.

RONGE, H., BLUM, J.W., CLEMENT, C., JANS, F., LEUENBERGER, H., BINDER, H. (1988):

Somatomedin C in dairy cows related to energy and protein supply and to milk production.

Anim. Prod. 47, 165-183.

RÖPKE, R. (1993):

Untersuchungen zu Blutplasmakonzentrationen von Wachstumshormon, insulinähnlichem Wachstumsfaktor-1 (IGF-1), Insulin und Glucagon sowie zur Genexpression des Wachstumshormonrezeptors beim Rind.

Dissertation, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München-Weihenstephan.

SARA, V.R., HALL, K. (1990):

Insulin-like growth factors and their binding proteins.

Physiol. Rev. 70, 591-614.

SAS INSTITUTE INC. (2000):

SAS für Windows Version 8.1, Cary, North Carolina, USA.

SAUERWEIN, H. (1994):

Die Bedeutung der somatotropen Achse für Muskelwachstum und Reproduktion bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Habilitationsschrift, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München-Weihenstephan.

SCHAMS, D. (1989):

Somatotropin and related peptides in milk.

In: Sejrsen, K., Vestergaard, M. and Neimann-Sørensen, A. (Hrsg.): Use of Somatotropin in Lifestock Production. Elsevier Applied Science, London.

SCHAMS, D. (1994):

Growth factors in milk.

Endocrine Regul. 28, 3-8.

SCHAMS, D., EINSPANIER, R. (1991):

Growth hormone, IGF-1 and insulin in mammary gland secretion before and after parturition and possibility of their transfer into the calf.

Endocrine Regul. 25, 139-143.

SCHAMS, D., AMSELGRUBER, W., SINOWATZ, F. (1995):

Immunolocalization of the insulin-like growth factors and basic fibroblast growth factor in the bovine mammary gland.

In: Wilde, C.J., Peaker, M., Knight, C.H. (Hrsg.): Intercellular Signalling in the Mammary Gland. Proceedings of the 1994 Hannah Symposium Held Ayr, Scotland, April 13-15, 1994. Plenum Press, New York, London.

SCHAMS, D., WINKLER, U., SCHALLENBERGER, E., KARG, H. (1988):

Wachstumshormon- und insulin like growth factor I (Somatomedin C)-Blutspiegel bei Rindern von der Geburt bis nach der Pubertät.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 95, 360-362.

SCHAMS, D., GRAF, F., GRAULE, B., ABELE, M., PROKOPP, S. (1991a):

Hormonal changes during lactation in cows of three different breeds.

Lifest. Prod. Sci. 27, 285-296.

SCHAMS, D., GRAF, F., MEYER, J., GRAULE, B., MAUTHNER, M., WOLLNY, C. (1991b):

Changes in hormones, metabolites, and milk after treatment with sometribove (recombinant methionyl bST) in Deutsches Fleckvieh and German Black and White cows.

J. Anim. Sci. 69, 1583-1592.

SCHEPERS, A.J., LAM, T.J.G.M., SCHUKKEN, Y.H., WILMINK, J.B.M., HANEKAMP, W.J.A. (1997):

Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters.

J. Dairy Sci. 80, 1833-1840.

SEJRSEN, K., PURUP, S., VESTERGAARD, M., WEBER, M.S., KNIGHT, C.H. (1999):

Growth hormone and mammary development.

Domest. Anim. Endocrinol. 17, 117-129.

SELSTED, M.E., TANG, Y.Q., MORRIS, W.L., MCGUIRE, P.A., NONOTNY, M.J., SMITH, W., HENSCHEN, A.H., CULLOR, H.S. (1993):

Purification, primary structures, and antibacterial activities of  $\beta$ -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils.

J. Biol. Chem. 268, 6641-6648.

SELYE, H. (1955):

Stress and disease.

Science 122, 625-628.

SENF, B., NEUDECKER, J. (1991):

Abwehrmechanismen der bovinen Milchdrüse.

Tierärztl. Prax. 19, 357-363.

SHEFFIELD, L. G. (1997):

Mastitis increases growth factor messenger ribonucleic acid in bovine mammary glands.

J. Dairy Sci. 80, 2020-2024.

SHIMIZU, M., SWANSON, P., FUKADA, H., HARA, A., DICKHOFF, W.W. (2000):

Comparison of extraction methods and assay validation for salmon insulin-like growth factor-I using commercially available components.

Gen. Comp. Endocrinol. 119, 26-36.

SHUSTER, D.E., KEHRLI, M.E., JR., BAUMRUCKER, C.R. (1995):

Relationship of inflammatory cytokines, growth hormone, and insulin-like growth factor-I to reduced performance during infectious disease.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 210, 140-149.

SJÖBERG, A., OSCARSSON, J., OLOFSSON, S.-O., EDEN, S. (1994):

Insulin-like growth factor-I and growth hormone have different effects on serum lipoproteins and secretion of lipoproteins from cultured rat hepatocytes.

Endocrinology 135, 1415-1421.

SMITH, K.L., HOGAN, J.S. (1995):

Epidemiology of mastitis.

Proceedings of the 3<sup>rd</sup> IDF International Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel, S6, 3-13.

SMITS, E., BURVENICH, C., GUIDRY, A.J., HEYNEMAN, R., MASSART-LEEN, A. (1999):

Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils.

Vet. Immunol. Immunopathol. 68, 169-176.

- SORDILLO, L.M., CAMPOS, M., BABIUK, L.A. (1991):  
Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2.  
J. Dairy Sci. 74, 3370-3375.
- SORDILLO, L.M., SHAFER-WEAVER, K., DEROSA, D. (1997):  
Immunobiology of the mammary gland.  
J. Dairy Sci. 80, 1851-1865.
- SURIYASATHAPORN, W., HEUER, C., NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N., SCHUKKEN, Y.H. (2000):  
Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review.  
Vet. Res. 31, 397-412.
- ŚLEBODZIŃSKI, A (1994):  
Hormone in der Milch und ihre Bedeutung für die Nachkommen.  
In: Döcke, F. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage, Fischer Verlag, Jena, 598-601.
- TAPSON, V.F., BONI-SCHNETZLER, M., PILCH, P.F., CENTER, D.M., BERMAN, J.S. (1988):  
Structural and functional characterization of the human T lymphocyte receptor for insulin-like growth factor I in vitro.  
J. Clin. Invest. 82, 950-957.
- THEYERL-ABELE, M. (1990):  
Analytische Untersuchungen zum IGF-1 (insulin-like growth factor-1) beim Rind.  
Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- TOLLE, A., HEESCHEN, W., HAMANN, J. (1977):  
Grundlagen einer systematischen Bekämpfung der subklinischen Mastitis des Rindes.  
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 29, 3-103.
- TUCKER, H.A. (2000):  
Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective.  
J. Dairy Sci. 83, 874-884.
- VEGA, J.R., GIBSON, C.A., SKAAR, T.C., HADSELL, D.L., BAUMRUCKER, C.R. (1991):  
Insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGF binding proteins in serum and mammary secretions during the dry period and early lactation in dairy cows.  
J. Anim. Sci. 69, 2538-2547.

VEREINIGTE INFORMATIONSSYSTEME TIERHALTUNG W.V., VIT (2001):

Zuchtwertschätzung Zellzahl.

<http://www.vit.de/zws/document/zellzad.htm>.

WALLAC (1996):

Auswertungsprogramm RIA-Calculator für WIZARD, Version 3.3.

WEBER, M.S., PURUP, S., VESTERGAARD, M., AKERS, R.M., SEJRSEN, K. (2000):

Regulation of local synthesis of insulin-like growth factor-I and binding proteins in mammary tissue.

J. Dairy Sci. 83, 30-37.

WENDT, K. (1992):

Milchbestandteile als diagnostische Kriterien für die biologische Abwehr der bovinen Milchdrüse.

Collegium Veterinarium XXIII, 23-26.

WENDT, K., LOTTHAMMER, K.-H., FEHLINGS, K., SPOHR, M. (1998):

Handbuch Mastitis.

Kamlage Verlag, Osnabrück.

WHITE, T.C., MADSEN, K.S., HINTZ, R.L., SORBET, R.H., COLLIER, R.J., HARD, D.L., HARTNELL, G.F., SAMUELS, W.A., DE KERCHOVE, G., ADRIAENS, F., CRAVEN, N., BAUMAN, D.E., BERTRAND, G., BRUNEAU, PH., GRAVERT, G.O., HEAD, H.H., HUBER, J.T., LAMB, R.C., PALMER, C., PELL, A.N., PHIPPS, R., WELLER, R., PIVA, G., RIJKEMA, Y., SKARDA, J., VEDEAU, F., WOLLNY, C. (1994):

Clinical mastitis in cows treated with sometribove (recombinant bovine somatotropin) and its relationship to milk yield.

J. Dairy Sci. 77, 2249-2260.

WILSON, D.J., GONZALEZ, R.N., DAS, H.H. (1997):

Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production.

J. Dairy Sci. 80, 2592-2598.

WITKAMP, R.F., NIJMEIJER, S.M., VAN DUIN, C.T., NOORDHOEK, J., VAN MIERT, A.S. (1993):

The regulation of oxidative drug metabolism by growth hormone in the dwarf goat: differences from and similarities to the mechanisms in rats.

J. Endocrinol. 136, 313-317.

ZECCONI, A., HAMANN, J., BRONZO, V., MORONI, P., GIOVANNINI, G., PICCININI, R. (2000):

Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections.

Adv. Exp. Med. Biol. 480, 287-293.

ZHAO, X., MCBRIDE, B.W., TROUTEN-RADFORD, L.M., BURTON, J.H. (1992):

Specific insulin-like growth factor-I receptors on circulating bovine mononuclear cells.

J. Recept. Res. 12, 117-129.

ZHAO, X., MCBRIDE, B.W., TROUTEN-RADFORD, L.M., BURTON, J.H. (1993):

Effects of insulin-like growth factor-I and its analogues on bovine hydrogen peroxide release by neutrophils and blastogenesis by mononuclear cells.

J. Endocrinol. 139, 259-265.

ZHAO, X., BURTON, J.H., MCBRIDE, B.W. (1994):

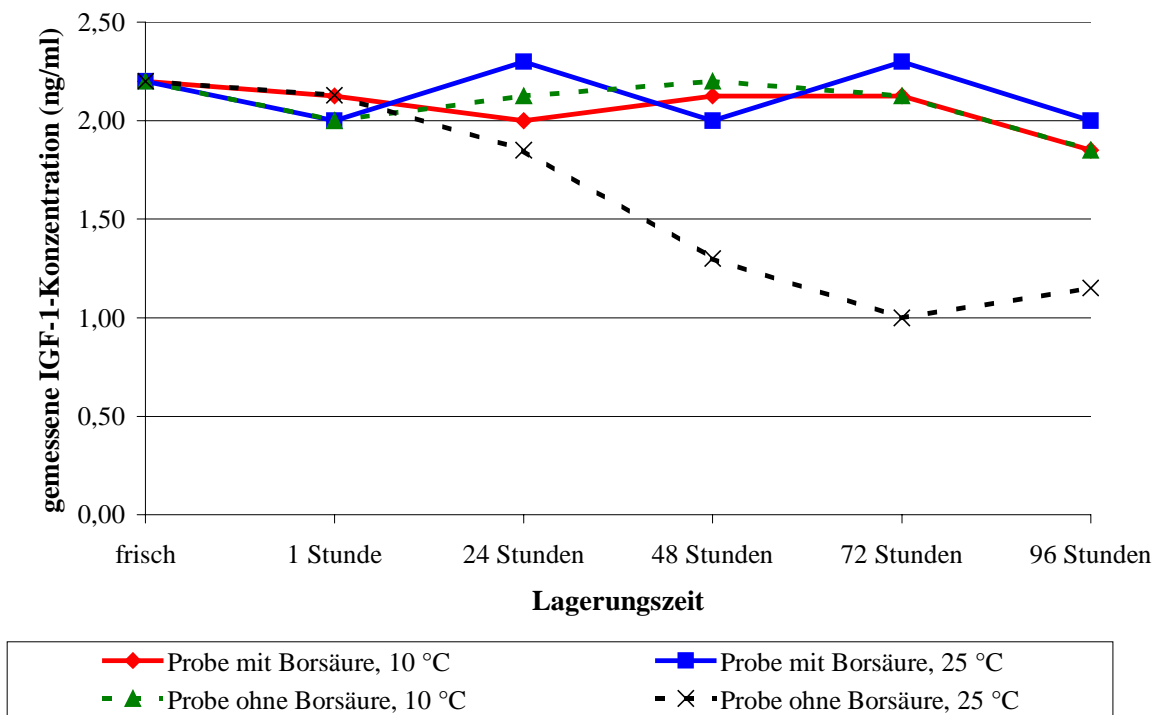
Lactation, health, and reproduction of dairy cows receiving daily injectable or sustained-release somatotropin.

J. Dairy Sci. 75, 3122-3130.

## 9 Anhang

### Stabilitätsnachweis des IGF-1 in gelagerten Milchproben

In Vorversuchen wurde die Stabilität des IGF-1 in Milchproben mit und ohne Konservierungsmittel (0,18 g Borsäure) bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (10 °C und 25 °C) überprüft. Die Meßergebnisse sind in Abbildung 9.1 dargestellt.



**Abbildung 9.1:** Stabilität von IGF-1- in Milchproben mit und ohne Konservierungsmittel bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen.

## **Verlauf der IGF-1-Konzentrationen bei individuellen Kühen**

Im folgenden sollen beispielhaft die Veränderungen der in den Viertelanfangsgemelksproben gemessenen IGF-1-Konzentrationen, der Zellzahlen und evtl. bakteriologischer Befunde bei zwei Kühen unterschiedlichen Alters dargestellt werden, die im Untersuchungszeitraum mehrmals beprobt wurden. Zusätzlich werden eventuelle Erkrankungen und/oder Behandlungen in diesem Zeitraum aufgeführt. Von jeder Kuh werden zuerst die Ergebnisdiagramme der beiden Vorder-, dann die Diagramme der Hinterviertel dargestellt.

### **1 Kuh „Ubel“**

Rasse: Deutsche Holstein, Farbrichtung Rot

Betriebsnummer: 7

Geburtsdatum: 03.12.94

Letzte Kalbung: 26.06.1998

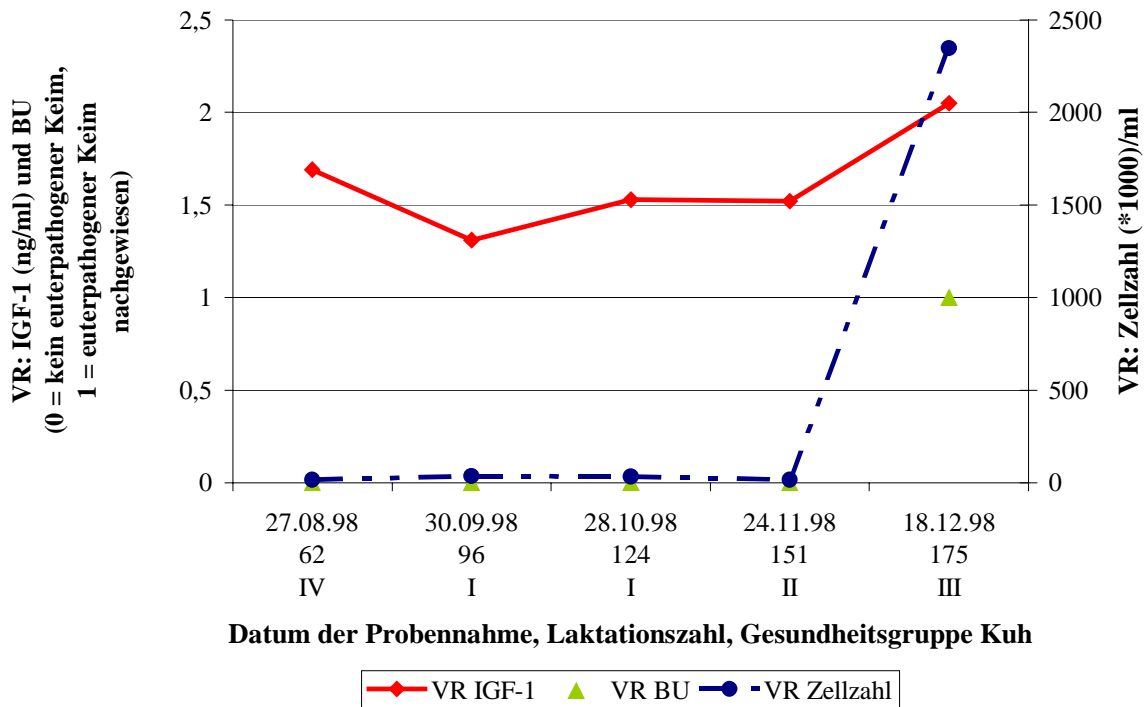
Laktationsnummer: 2

Besondere Beobachtungen: 04.09.1998 Besamung

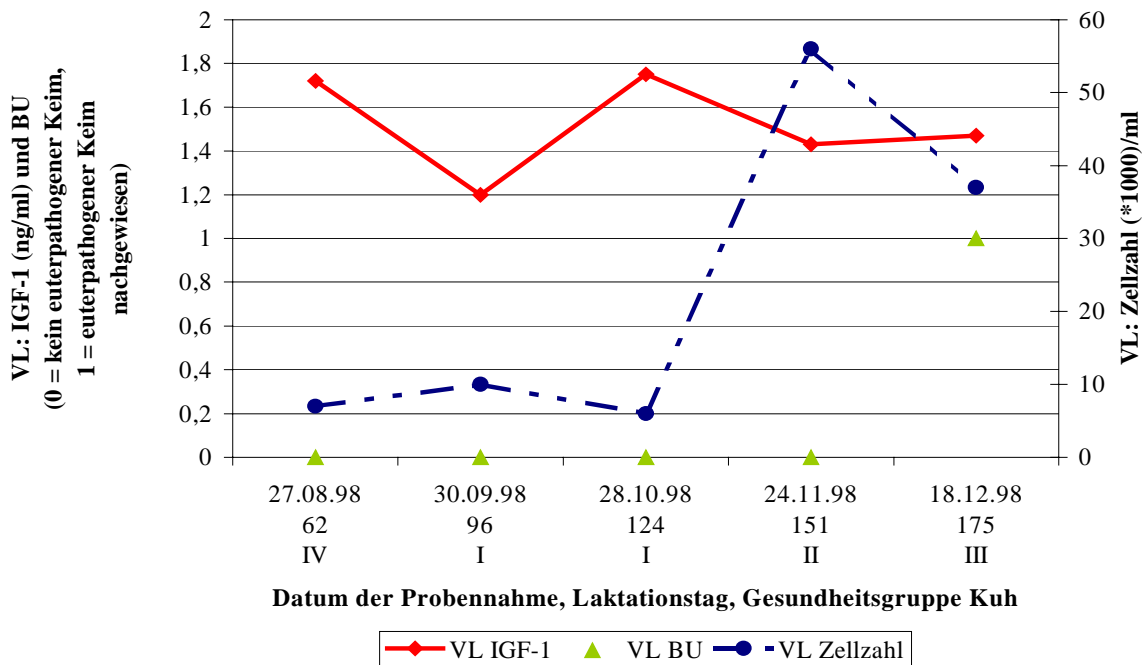
12.10.1998 akute Mastitis hinten links, antibiotisch behandelt

13.10.1998 akute Mastitis hinten links, antibiotisch behandelt

In „Ubels“ rechten Hinterviertel waren im August koagulase-negative Staphylokokken nachweisbar, ohne daß gleichzeitig eine Zellzahlerhöhung vorlag (54.000/ml). Die in dieser Milchprobe gemessenen IGF-1-Konzentrationen waren höher als in den anderen Vierteln. Im September zeigte „Ubel“ auf allen vier Vierteln normale Sekretion und IGF-1-Konzentrationen unter 2 ng/ml. Im Oktober wurden, 15 Tage nach einer akuten Mastitis hinten links, die antibiotisch behandelt worden war, in den beiden Hintervierteln IGF-1-Konzentrationen knapp unter 5 ng/ml gemessen. Zu diesem Zeitpunkt lagen die Werte in den Vordervierteln unter 2 ng/ml. Die Zellzahlen in allen vier Vierteln lagen unter 30.000/ml. Im November stieg die Zellzahl im linken Hinterviertel auf über eine Million, ohne daß jedoch ein Erreger nachgewiesen werden konnte. Die IGF-1-Konzentration betrug nur in diesem Viertel mehr als 2 ng/ml. Im Dezember war die Zellzahl hier wieder auf 907.000/ml zurückgegangen, in den Vordervierteln waren Keime nachweisbar. Im rechten Vorderviertel lagen CPS vor mit gleichzeitiger Zellzahlerhöhung auf über 2 Millionen und einer IGF-1-Konzentration knapp über 2 ng/ml, vorne links CNS mit einer Zellzahl unter 40.000/ml und einem IGF-1-Wert unter 1,5 ng/ml (Abbildungen 9.2 – 9.5).



**Abbildung 9.2:** Kuh „Ubel“, rechtes Vorderviertel (VR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probennahmen)



**Abbildung 9.3:** Kuh „Ubel“, linkes Vorderviertel (VL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probennahmen)

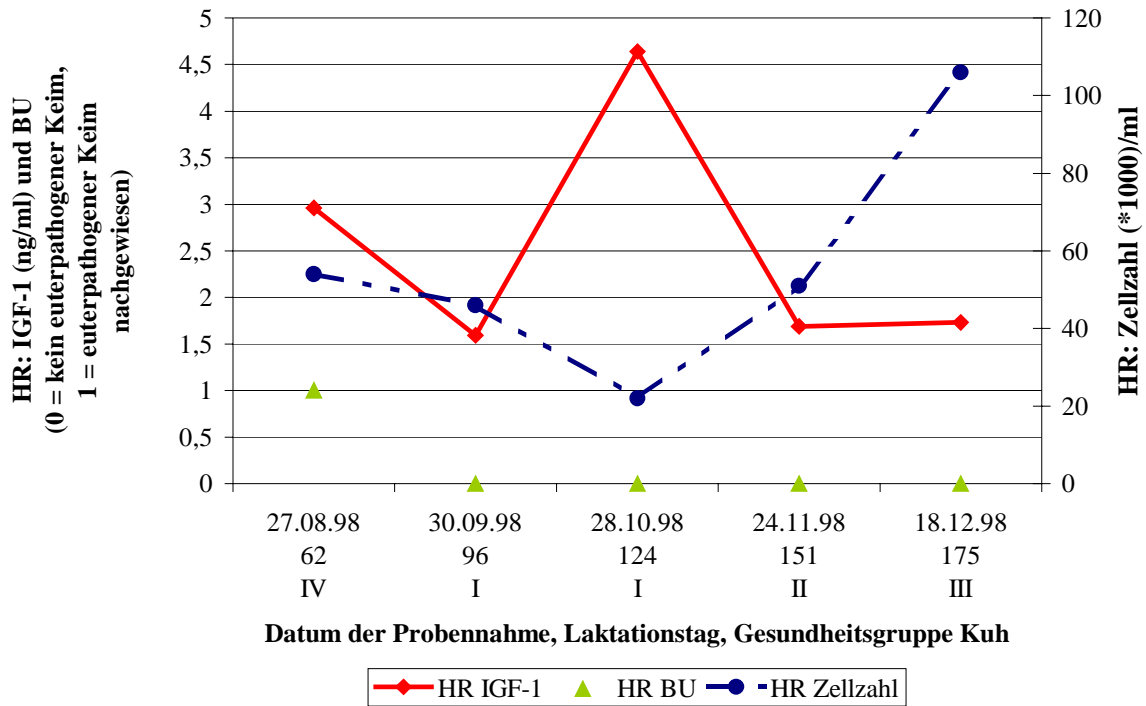


Abbildung 9.4: Kuh „Ubel“, rechtes Hinterviertel (HR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probenahmen)

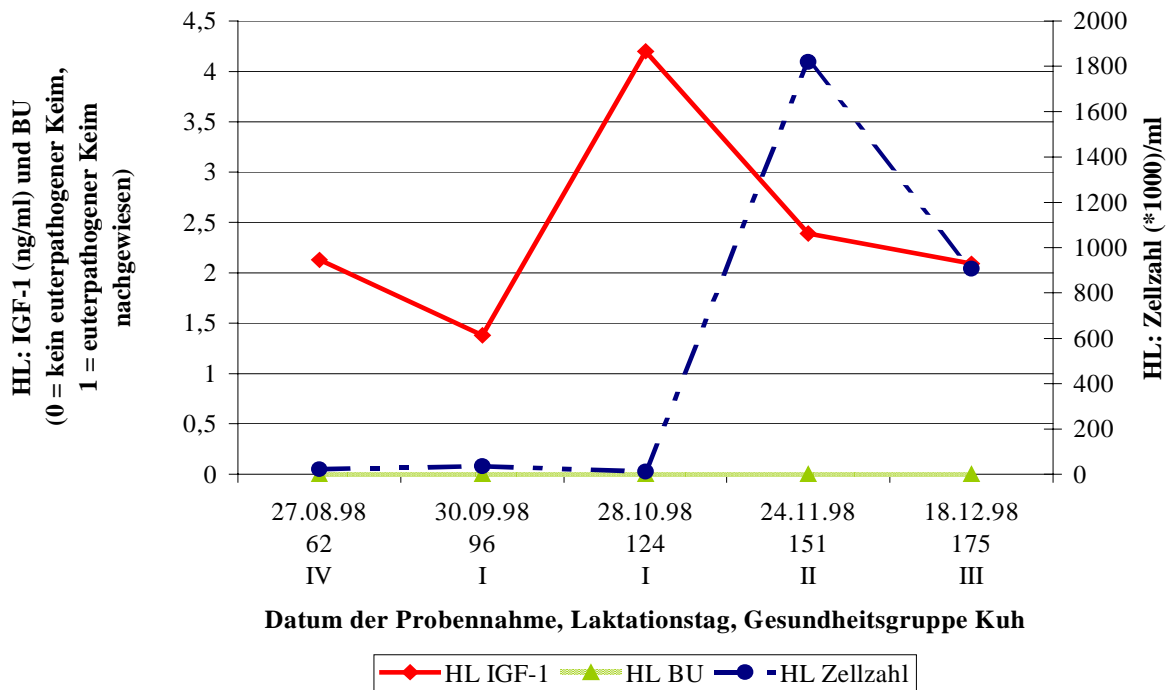


Abbildung 9.5: Kuh „Ubel“, linkes Hinterviertel (HL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (5 Probenahmen)

## 2 Kuh „Tina“

Rasse: Deutsche Holstein, Farbrichtung Rot

Betriebsnummer: 1

Geburtsdatum: 14.02.1994

Letzte Kalbung: 12.04.1998

Laktationsnummer: 3

Besondere Beobachtungen: 05.06., 25.08., 23.09.1998 Besamung

04.08.1998 Brunst

10.09.1998 Lahmheit

10.11.1998 Trächtigkeitsuntersuchung, nicht tragend

„Tina“ hatte im Juni in der Milch aller Viertel IGF-1-Konzentrationen über 5,5 ng/ml. Die Zellzahlen waren extrem niedrig (9.000 – 11.000/ml), nur im linken Hinterviertel waren 196 000 Zellen pro ml Milch meß- und koagulase-negative Staphylokokken nachweisbar. Im August fielen die Zellzahlen in diesem Viertel auf 84.000/ml, wobei die CNS immer noch nachweisbar waren und nun auch im rechten Hinterviertel nachgewiesen werden konnten. Die IGF-1-Werte sanken in allen vier Vierteln unter 3 ng/ml. Im September waren die Staphylokokken nur noch im linken Hinterviertel nachweisbar. Im November stieg die Zellzahl hinten rechts auf 373.000/ml, die IGF-1-Konzentrationen in diesem Viertel und im rechten Vorderviertel lagen bei 28,12 bzw. 13,23 ng/ml. Im linken Vorderviertel waren Zellzahlen von 141.000/ml meßbar, die IGF-1-Werte blieben hier und in der Probe des linken Hinterviertels unter 10 ng/ml. Keime waren in keinem Viertel nachweisbar (Abbildungen 9.6 – 9.9).

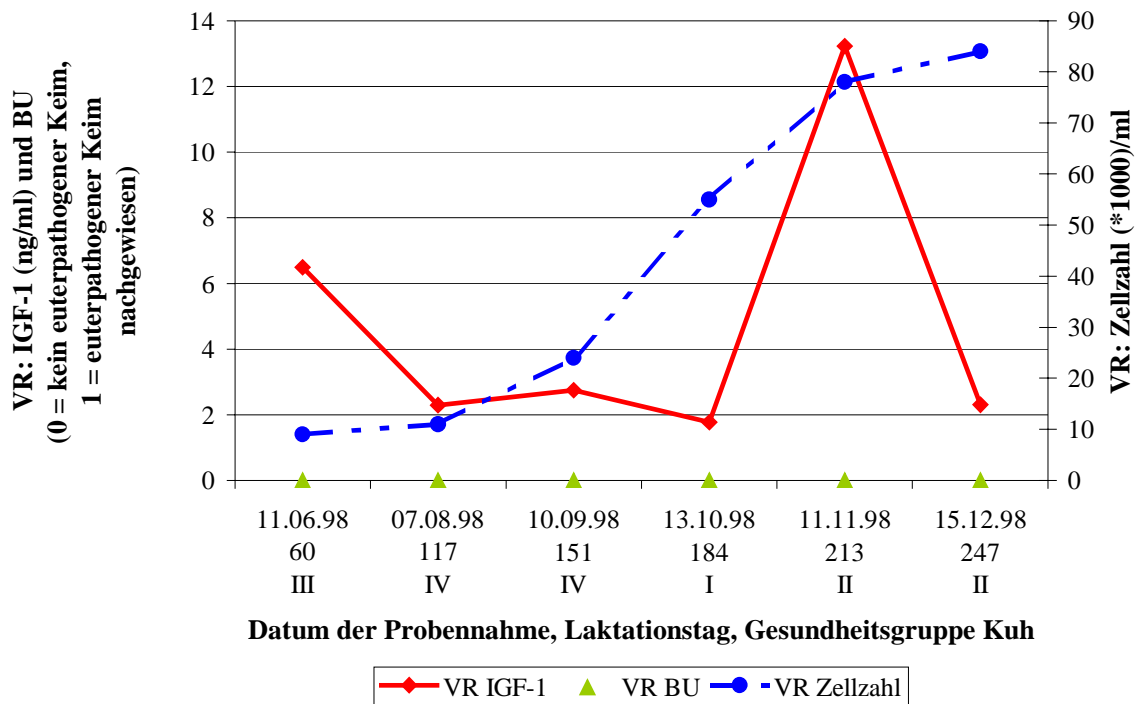


Abbildung 9.6: Kuh „Tina“, rechtes Vorderviertel (VR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)

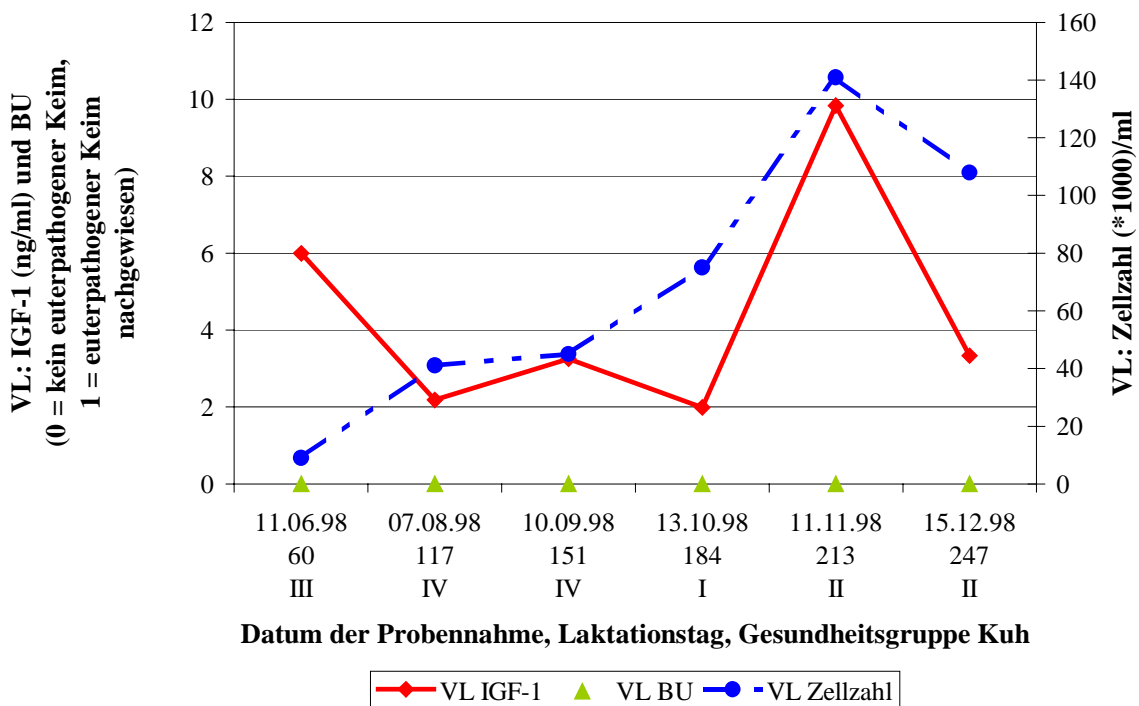


Abbildung 9.7: Kuh „Tina“, linkes Vorderviertel (VL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)

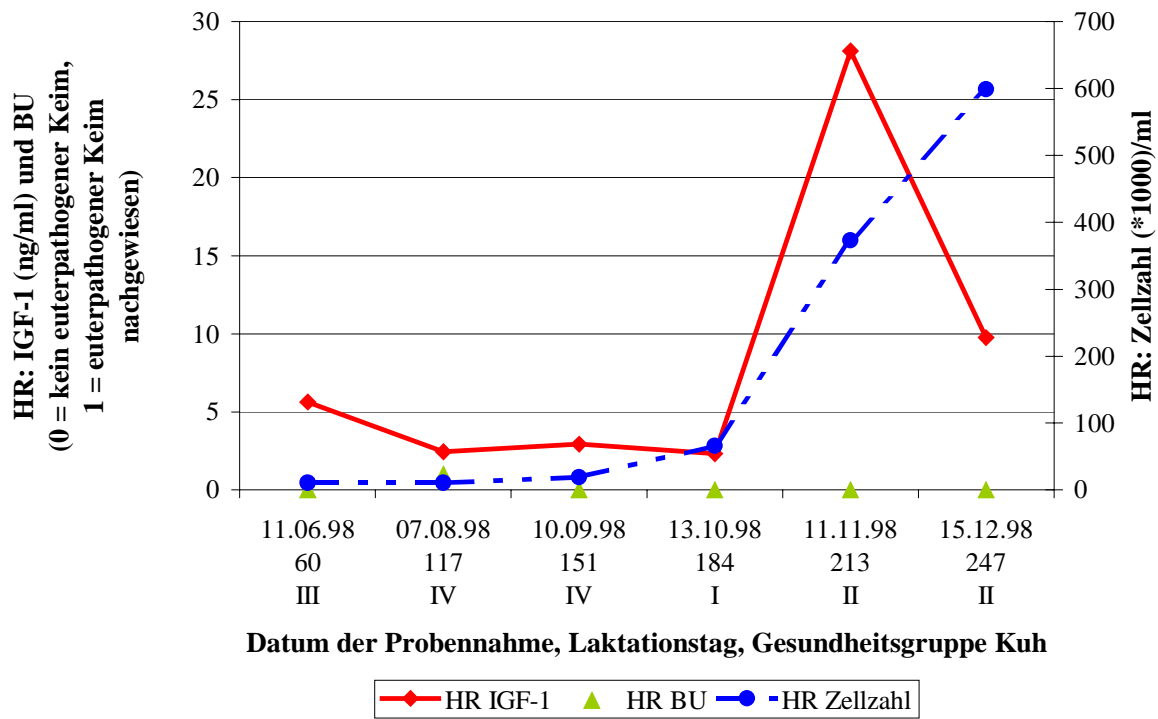


Abbildung 9.8: Kuh „Tina“, rechtes Hinterviertel (HR): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)

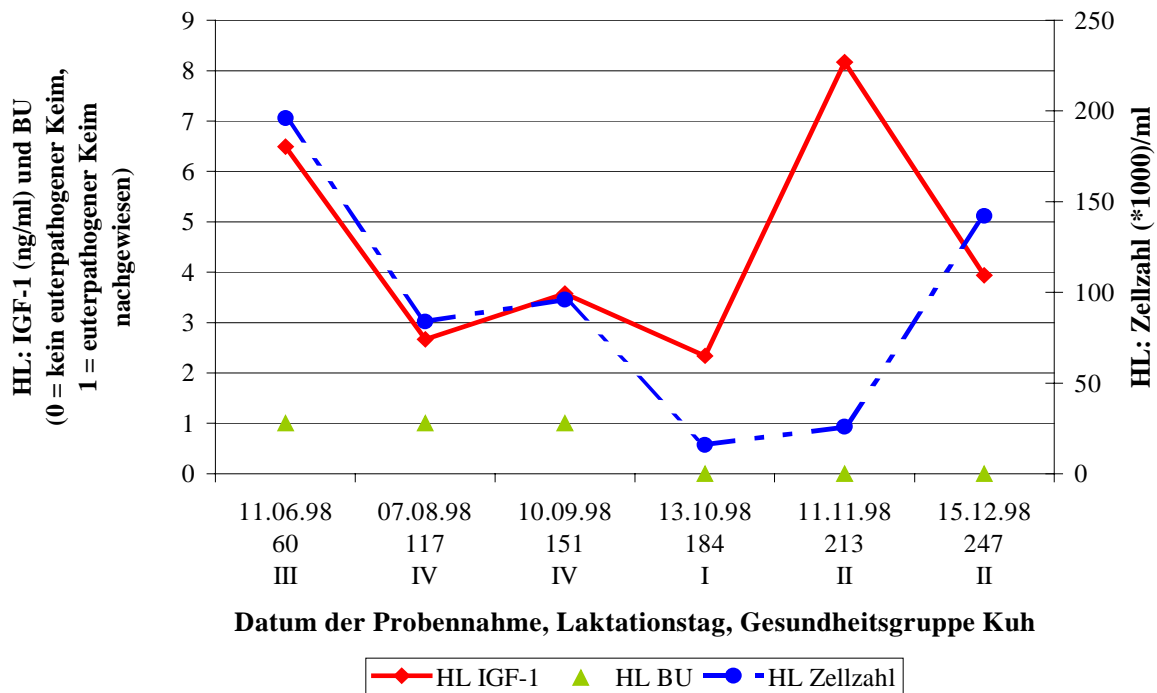


Abbildung 9.9: Kuh „Tina“, linkes Hinterviertel (HL): IGF-1-Konzentrationen, Zellzahlen und Gesundheitsgruppe im Probennahmezeitraum (6 Probennahmen)

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. E. Schallenberger möchte ich herzlich danken für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung am Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und für die gewährten Freiräume während der Bearbeitung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann danke ich besonders für die Übernahme des Themas an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Frau Priv. Doz. Dr. Annette Brückmann sei herzlich gedankt für die unermüdliche Betreuung – im Labor wie bei der Auswertung und für das Korrekturlesen und die Aufmunterung während meiner Zeit am Institut und in der langen Zeit danach!

Den Landwirten und ihren Familien, die auf ihren Betrieben zwei Jahre lang Milchproben ziehen ließen und damit auch diese Arbeit ermöglichten, vielen Dank für ihre Geduld und ihre Gastfreundschaft: Familie H.-P. Fehrs; Herrn B. Mann und Herrn H.-P. Westphal, BBZ Futterkamp; Familien C. und H.-J. Halske; Familie K.-G. Jahnnsen; Familie H.-H. Karstens; Familie W. Kruse; Familie K.-H. Kühl; Familie P. Lüscho; Familie U. Lütje; Familie H. Matthiesen; Herrn H.-W. Thomsen, LVB Mildstedt; Familie J. Möllgaard; Familie J. Münster; Familie C.-H. Niemann; Herrn K. Witten und Herrn H. Wegener. Darüber hinaus danke ich den beteiligten Beratern der Rinderspezialberatung und den Hoftierärzten.

Für die Unterstützung bei den morgendlichen Touren quer durch Schleswig-Holstein, der Vorbereitung der Milchprobenröhrchen und der Beschriftung unzähliger Reagenzröhrchen danke ich herzlich Heinrich Lüllau, Anne Stukenborg, Kathrin Tschirner und besonders Michael Kantereit.

Für die Auswertung der Milchproben danke ich den MitarbeiterInnen des ITL Kiel und des LKV Schleswig-Holstein e. V., außerdem geht Dank an die Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein sowie an die Stiftung Schleswig-Holsteinische Landschaft für die Finanzierung des Projektes.

Herrn Prof. Dr. B. H. Breier danke ich für die Überlassung des Antiserums. Für ihre freundliche, geduldige und gründliche Einweisung in die Besonderheiten des RIA-Labors und -Testverfahrens danke ich besonders herzlich Herrn H. Scholl und Herrn Dr. A. Daxenberger – unvergessen bleiben die prompten Hilfestellungen via e-mail bei allen unerklärlichen Vorkommnissen während der Testetablierung in Kiel und danach!

Frau E. Laß sei gedankt für ihre unermüdliche Unterstützung im Labor des ITZuTH Kiel.

Für ihre Hilfe auf den Pfaden durch den Dschungel der Statistik danke ich Herrn Dr. Eckhard Stamer und Herrn Dr. Hubert Rothfuß herzlichst. Herrn Rudolf Hartwigsen gilt mein besonderer Dank für seine Unterstützung, nicht nur bei allen IT-Fragen.

Herrn Sven Paul sei gedankt für sein gründliches Korrekturlesen.

Frau Dr. Ilka Klaas und Frau Dr. Uta Tölle sei besonders herzlich gedankt für die freundliche Aufnahme der „Nachzüglerin“ ins Projektgeschehen, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung und Hilfestellung (nicht nur) bei meiner Arbeit, die auch mit dem Abschluß ihrer Promotionen nicht zu Ende war!

Meiner Bürokollegin Frau Charlotte Leiber-Schotte möchte ich besonders für ihre gute Laune danken, die den Büroalltag so manches Mal erhellte!

Allen Mitgliedern des „Clubs der Freizeitoptimierer“: herzlichsten Dank für die absolut optimale Nutzung der verbliebenen knappen Freizeit während der Zeit am Institut!!

Meinen Kollegen in der Praxis DVM Maik Neßmann danke ich für die Ermöglichung meines wöchentlichen „Dissertationstages“.

Herrn Dr. Karl-Heinz Tölle gilt mein besonderer Dank für seine Hilfe bei der Erstellung der elektronischen Druckreife dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich herzlichst, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und insbesondere für ihre Unterstützung während aller Phasen der Dissertation.

Ganz besonders danke ich Kay – nicht nur für seine Geduld...!

## Lebenslauf

Name: Ulrike Maria Anna Adelheid Ruffer

geboren: 03.08.1972 in Erlangen

Schulbildung: 1978 – 1982 Grundschule Loschgeschule, Erlangen  
1982 – 1991 Städt. Marie-Therese-Gymnasium, Erlangen  
Juli 1991 Abitur

Studium: 1991 – 1994 Tiermedizinische Fakultät der Justus-Liebig-Universität, Gießen  
1994 – 1995 Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge, UK  
1995 – 1998 Tiermedizinische Fakultät der Justus-Liebig-Universität, Gießen  
März 1998 Approbation

Praktika: Feb. – April 1992 und 1993 Fachbibliothek der Firma Siemens, Erlangen  
Feb. – April 1994 Landwirtschaftlicher Betrieb J. und R. Klütze, Tönning  
März 1995 Schäferei Fam. Cawston, Attleborough, Norfolk, UK  
Juni 1995 Animal Health Trust, Department of Clinical Ophthalmology, Newmarket, Suffolk, UK  
Feb. – April 1996 Dr. H.-J. Paulick, Tating (Gemischtpraxis)  
Feb. – April 1997 Peter Robins & Ass., Cambridge, UK (Kleintierpraxis)  
Juni – August 1997 Dr. E. Börms, Garding (Gemischtpraxis)

Berufstätigkeit: April 1998 – Juni 2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Mai 1998 – Dezember 2000 regelmäßige Urlaubsvertretungen bei Dr. E. Börms, Garding, Gemischtpraxis  
Januar – Mai 2001 regelmäßige Vertretungen bei Mona Fenske, Kiel, Kleintierpraxis  
Juli 2001 – September 2002 Assistentztierärztin bei DVM Maik Neßmann, Bad Oldesloe, Gemischtpraxis, Schwerpunkt Bestandsbetreuung Rind  
seit Oktober 2002 tätig bei WestfaliaSurge GmbH, Oelde

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

Kiel, 15.09.2002

Ulrike Ruffer