

Aus dem Institut für Tierwissenschaften,
Abteilung Physiologie und Hygiene der Universität Bonn

**Vergleichende Untersuchungen zum Lactoferrin
und dem Bindungsprotein-2 insulinartiger
Wachstumsfaktoren (IGFBP-2) in Kuh- und Ziegenmilch**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)
der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am
5. Januar 2006

von
Tanja Meyer

aus
Neuss

Referentin: Frau Prof. Dr. Dr. H. Sauerwein
Koreferent: Herr Prof. Dr. K. Schellander
Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2006

D 98 (Diss. Universität zu Bonn)

*Für Christian,
Lina und Imke*

Abstract

Vergleichende Untersuchungen zum Lactoferrin und dem Bindungsprotein-2 insulinartiger Wachstumsfaktoren (IGFBP-2) in Kuh- und Ziegenmilch

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, valide Testsysteme zum Messen von Lactoferrin (Lf) und IGFBP-2 in der Milch von Kühen und Ziegen zu entwickeln. Damit sollten Einflüsse verschiedener physiologischer Zustände d.h. der Gravidität, des Laktationsstadiums und der Eutergesundheit auf die Messwerte erfasst werden, um die Aussagefähigkeit einzelner Messungen für die Beurteilung von Konzeptionschancen bzw. Eutergesundheit in der Praxis einordnen zu können. Es standen Milchproben von 226 Kühen zur Verfügung, die über einen Zeitraum von neun Monaten regelmäßig gezogen wurden. Zusätzlich wurden Milchproben von 20 Ziegen über eine Laktation hinweg genommen sowie von 10 dieser Ziegen über zwei aufeinander folgende Laktationen.

Zur Quantifizierung von Lf wurden tierartspezifische kompetitive Enzymimmuntests nach der Doppelantikörpermethode entwickelt und validiert. Die relativ höchsten Lf-Werte lagen sowohl bei der Kuh als auch bei der Ziege im Kolostrum vor. In der ersten Laktationswoche fielen die Gehalte stark ab und stiegen zum Laktationsende wieder an, wobei der Anstieg mit dem Zeitpunkt des ersten Östrus in der Laktation zusammenfiel. Es konnte jedoch weder bei Kuh noch bei Ziege ein direkter Einfluss der Gravidität auf den Lf-Gehalt in der Milch festgestellt werden. Störungen der Eutergesundheit beeinflussten hingegen den Lf-Gehalt in der Milch erheblich.

Zur Bestimmung des Konzentrationsverlaufs von IGFBP-2 in Ziegen- und Kuhmilch wurde ein für beide Tierarten validierter kompetitiver Enzymimmuntest mit Vorinkubation nach der Doppelantikörpermethode entwickelt. Die zunächst hohe IGFBP-2-Konzentration im bovinen und caprinen Kolostrum nahm in den ersten Laktationswochen stark ab. Zum Ende der Laktation stiegen die IGFBP-2-Gehalte zwar wieder an, variierten aber stark. Bei der Ziege war der Anstieg deutlicher ausgeprägt. Die Gravidität zeigte bei Kühen in der vorliegenden Untersuchung, anders als bisher beschrieben, keinen Einfluss auf den IGFBP-2-Gehalt der Milch. Bei den Ziegen war ein Anstieg im Milch-IGFBP-2 offenbar auf das Laktationsstadium zurückzuführen und demnach ein direkter Einfluss der Trächtigkeit auszuschließen. In der Kuhmilch waren bei steigender Zellzahl auch erhöhte IGFBP-2-Gehalte zu beobachten. Bei klinischen Mastitiden zeigten Ziegen relativ stärkere Anstiege der IGFBP-2-Konzentration in der Milch als Kühe.

Abstract

Comparative Studies on Lactoferrin and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP2) in Bovine and Caprine Milk

The objective of this thesis was to develop valid test systems for measuring lactoferrin (Lf) and IGFBP-2 in bovine and caprine milk in order to characterize the influence of different physiological states, i.e. pregnancy, stage of lactation and mammary gland's health on the concentrations in milk in both animal species. Milk from 226 cows was available. The samples were taken regularly over a period of 9 months. In addition, milk samples were collected from 20 goats over a period of one lactation. 10 of the 20 goats were sampled over a period of two subsequent lactations.

For the quantification of Lf competitive enzyme immunoassays specific to each of the two species were developed using the double-antibody technique. Lf concentrations were highest in bovine as well as in caprine colostrum. The contents decreased steeply in the first week of lactation and then increased again towards the end of lactation. The onset of increasing concentrations coincided with the first estrus in lactation. However, a direct effect of pregnancy on the concentration of Lf in milk was neither established in cow nor in goat. In contrast, health disturbances of the mammary gland affected the concentration of Lf in milk in both species.

For the determination of IGFBP-2 content in caprine and bovine milk a competitive enzyme immunoassay with preincubation was developed using the double-antibody technique and was validated for both of the animal species. The high concentration of IGFBP-2 observed in bovine and caprine milk decreased in the first two weeks of lactation. The concentrations increased towards the end of the lactation, but showed high inter-individual variabilities. In goats, the increase towards the end of lactation was steeper than in cows. Different from what is described so far, pregnancy did not affect the concentrations of IGFBP-2 in milk. The increase of IGFBP-2 in caprine milk was related to the stage of lactation and hence a direct effect of pregnancy on milk IGFBP-2 concentration can be excluded.

Elevated concentrations of IGFBP-2 in bovine milk coincided with increased somatic cell counts. Relatively higher increases were evident in goats during clinical cases of mastitis when compared to cows.

1	Einleitung	1
2	Entwicklung kompetitiver Enzymimmuntests zur Messung von Lactoferrin und IGFBP-2 in Ziegen- und Kuhmilch.....	11
2.1	Lactoferrin.....	11
2.1.1	Lactoferrinreinigung	12
2.1.2	Markierung des Lactoferrins	19
2.1.3	Herstellung von Antiseren.....	20
2.1.4	Spezifität der Antiseren	23
2.1.5	Durchführung des ELISAs.....	27
2.1.6	Validierung und Testcharakteristika.....	28
2.1.7	Schlussbetrachtung zur Testentwicklung.....	31
2.1.8	Aufbereitung der Proben	31
2.2	IGFBP-2	33
2.2.1	Herstellung von Antiseren.....	34
2.2.2	Spezifität der Antiseren	35
2.2.3	Markierung des IGFBP-2.....	37
2.2.4	Durchführung des ELISAs.....	37
2.2.5	Validierung und Testcharakteristika.....	38
2.2.6	Schlussbetrachtung zur Testentwicklung.....	41
2.2.7	Aufbereitung der Proben	41
3	Untersuchungen zum Lactoferrin und IGFBP-2 in der Milch von Kühen und Ziegen.....	43
3.1	Material und Methodik.....	43
3.1.1	Einordnung der Milchkühe in verschiedene Gruppen sowie Probennahmedesign und Bestimmung der Milchinhaltsstoffe	43
3.1.1.1	Voruntersuchung zur Behandlung der Kuhmilchproben	47
3.1.1.2	Statistische Auswertung der Kuhmilchdaten.....	48
3.1.1.2.1	Untersuchungen zur Laktation.....	48
3.1.1.2.2	Untersuchungen über den jahreszeitlichen Verlauf	51
3.1.1.2.3	Untersuchungen zur Trächtigkeit.....	51

3.1.1.2.4	Untersuchungen zur Zellzahl.....	52
3.1.2	Haltung und Milchprobennahme der Ziegen.....	54
3.1.2.1	Statistische Auswertungen der Ziegenmilchdaten.....	55
3.1.2.1.1	Untersuchungen zur Laktation.....	55
3.1.2.1.2	Untersuchungen zur Trächtigkeit.....	57
3.2	Ergebnisse	59
3.2.1	Untersuchungen der Kuhmilch bezüglich ihrer Inhaltsstoffe sowie dem Lactoferrin- und dem IGFBP-2-Gehalt.....	59
3.2.1.1	Milchinhaltsstoffe bei der Kuh.....	59
3.2.1.1.1	Milchinhaltsstoffe im Laktationsverlauf	59
3.2.1.1.2	Milchinhaltsstoffe im jahreszeitlichen Profil	60
3.2.1.2	Lactoferrin in Kuhmilch	61
3.2.1.2.1	Lactoferrinkonzentration im Laktationsverlauf	61
3.2.1.2.2	Lactoferrinkonzentration in Bezug zur Trächtigkeit.....	63
3.2.1.2.3	Lactoferrinkonzentration in Bezug zur Zellzahl.....	64
3.2.1.3	IGFBP-2 in Kuhmilch	66
3.2.1.3.1	IGFBP-2-Konzentration im Laktationsverlauf	66
3.2.1.3.2	Einfluss des Ernährungsstatus auf den IGFBP-2-Gehalt der Kuhmilch.....	67
3.2.1.3.3	IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Trächtigkeit.....	69
3.2.1.3.3	IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Trächtigkeit.....	70
3.2.1.3.4	IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Zellzahl	71
3.2.1.4	Verhalten von Lactoferrin, IGFBP-2 und Inhaltsstoffen der Kuhmilch während einer Mastitis.....	72
3.2.1.5	Verteilung der Zellzahlen auf die verschiedenen Melkgruppen der Milchkühe.....	78
3.2.2	Untersuchungen der Ziegenmilch bezüglich ihrer Inhaltsstoffe, dem Lactoferrin- und dem IGFBP-2-Gehalt.....	80
3.2.2.1	Milchinhaltsstoffe und Milchleistung der Ziegen im Verlauf der Laktation	80
3.2.2.2	Lactoferrin in Ziegenmilch	82
3.2.2.2.1	Lactoferrinkonzentration im Laktationsverlauf	82
3.2.2.2.2	Lactoferrinkonzentration in Bezug zur Trächtigkeit.....	84
3.2.2.3	IGFBP-2 in Ziegenmilch	87

3.2.2.3.1	IGFBP-2-Konzentration im Laktationsverlauf	87
3.2.2.3.2	IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Trächtigkeit	89
3.2.2.4	Untersuchungen zur Mastitis bei der Ziege.....	92
3.3	Diskussion	95
4	Schlussbetrachtung	120
5	Anhang	121
6	Literaturverzeichnis.....	140
7	Tabellenverzeichnis.....	154
8	Abbildungsverzeichnis.....	155

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMS	Automatisches Melksystem
anti-Lf	Kaninchen-Antiserum gegen Lactoferrin
B	biotinyliert
b	bovin
BSA	Bovines Serum Albumin
c	caprin
DAB	3,3 Diaminobezidin
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
E. coli	Escherichia coli
Fc-Fragment	Fragment Crystalline
ffa (mmol/100g Fett)	freie Fettsäuren in mmol pro 100 g Fett
GLM	mehrfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung
IGFBP-2	Insulin like growth factor binding protein2 (Bindungsprotein 2 des insulinartigen Wachstumsfaktors)
IgG	Immunglobuline G
IRMA	immunradiometrischer assay
KB	künstliche Besamung
kDa	Kilodalton
KW	Kalenderwoche
Lf	Lactoferrin
LW	Laktationswoche
LZ	Landwirtschaftszentrum
MLP	Milchleistungsprüfung
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäuren
n	Anzahl Proben/Tiere
NEL	Nettoenergie-Laktation
nXP	nutzbares Rohprotein am Duodenum des Wiederkäuers
p	Signifikanz (Irrtumswahrscheinlichkeit)
ppm	Harnstoffgehalt in der Milch in mg/kg
r	Korrelationskoeffizient
rbIGFBP-2	rekombinantes bovines IGFBP-2
RIA	Radioimmuntest
SCS	Somatic Cell Score (Zellzahlklasse)
SEM	Standardfehler
t	Angabe in Tausend
Tab.	Tabelle
TP II	Testpuffer II
\bar{X}	arithmetischer Mittelwert

1 Einleitung

IGF-Bindungsproteine (IGFBP)

Die IGFBPs sind Teil des komplexen Systems insulinartiger Wachstumsfaktoren (IGF-System), (Abb. 1). Zu diesem System zählen die drei Liganden: Insulinartiger Wachstumsfaktor I und II (IGF-I, IGF-II) und Insulin, sowie die damit korrespondierenden hochaffinen Rezeptoren (IGF-I-R, IGF-II-R und Insulin-R). Die IGFs sind im extrazellulären Raum größtenteils hochaffin an spezifische Bindungsproteine gebunden (BPs). Sechs verschiedene Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6) wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt geklont und sequenziert. Ein siebtes Bindungsprotein wird diskutiert (OH et al., 1996; WILSON et al. 1997). Darüber hinaus zählen zum IGF-System neun auf die Bindungsproteine bezogene Proteine, so genannte IGFBP-related proteins (IGFBPrP-1 bis -9) (WILSON et al., 1999).

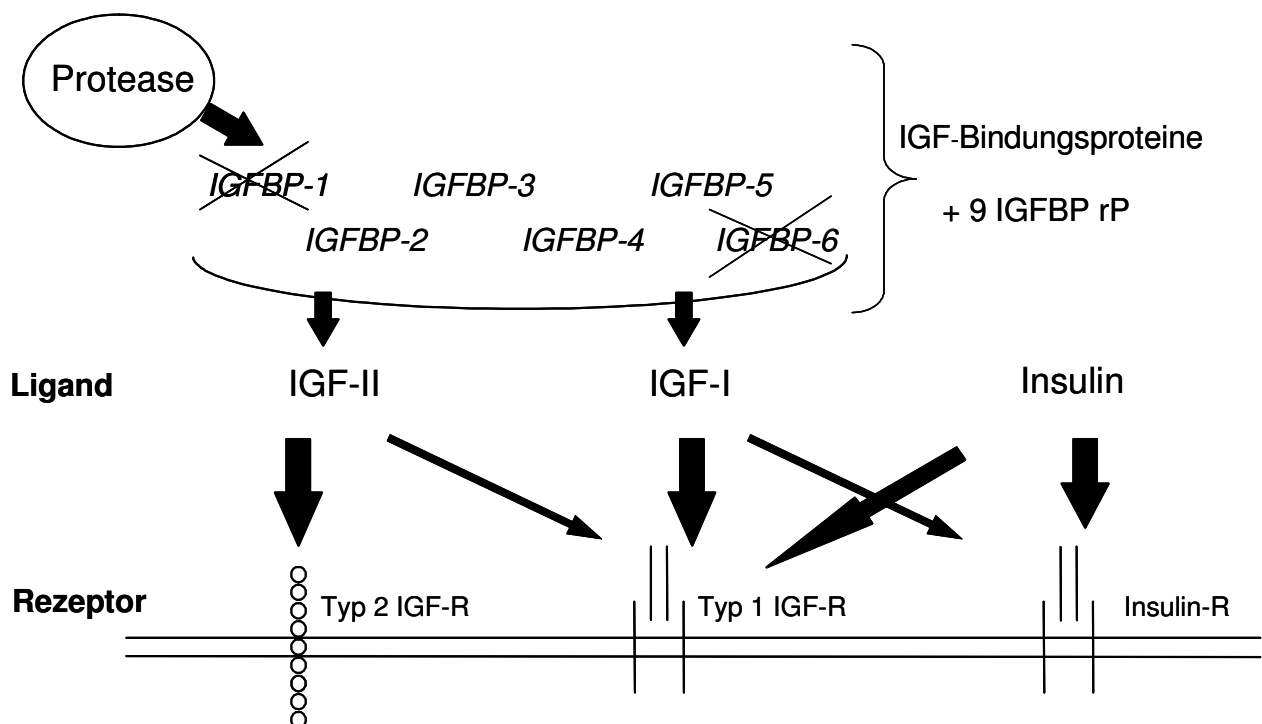


Abbildung 1: Das System der insulinartigen Wachstumsfaktoren (IGF-System) und das Vorkommen der einzelnen Komponenten in der bovinen Milchdrüse (CAMPBELL & BAUMRUCKER, 1986; HADSELL et al., 1990; BAUMRUCKER et al. 1993; GIBSON et al., 1999)

Die IGFs werden ubiquitär gebildet und agieren als Mediatoren bei Wachstum, Entwicklung und Differenzierung von Zellen; weiter haben sie als endokrine Faktoren, die dem programmierten Zelltod (Apoptose) entgegenwirken, Bedeutung.

Die Wirkungen der IGF-BPs innerhalb des IGF-Systems sind ebenfalls vielschichtig. Charakteristisch für die IGF-Bindungsproteine ist, dass sie cysteinreiche Bindungsregionen besitzen und z. T. glycosyliert sind (IGFBP-3, -4, -5, -6). Sie alle binden IGF-I- und/oder IGF-II-spezifisch, jedoch kein Insulin. Generell lassen sich ihnen vier Hauptfunktionen zuordnen (JONES & CLEMMONS, 1995):

- Transportproteine im Plasma;
- Verlängerung der Halbwertszeit von IGFs durch Schutz vor proteolytischem Abbau, Kontrolle über Verweildauer und biologische Wirksamkeit von IGFs im Organismus;
- gewebe- und zellspezifische Lokalisation der IGFs;
- Modulation der Interaktionen der IGFs mit ihren Rezeptoren in direkter Weise und somit eine indirekte Kontrolle der biologischen Aktivität

IGFBPs können darüber hinaus jedoch auch direkte Liganden-unabhängige Effekte auf Zellfunktionen haben (JONES & CLEMMONS, 1995).

Das IGF-System innerhalb der Milchdrüse (Abb. 1) ist beim Rind in Hinblick auf das Vorkommen der einzelnen Komponenten recht gut untersucht. Die Epithelzellen enthalten die drei in Frage kommenden Rezeptoren (CAMPBELL & BAUMRUCKER, 1986; HADSELL et al., 1990). Sie produzieren jedoch nur IGF-II und kein IGF-I (BAUMRUCKER et al. 1993). Es werden vier IGFBPs, IGFBP-2, -3, -4 und -5, synthetisiert, die auch in der Milch erscheinen (GIBSON et al., 1999).

Vermutet wird, dass die IGFBPs in der Milch dem Abbau des IGF-I entgegenwirken bzw. dass sie lokale mitogene Aktivitäten der IGFs modulieren (RAJARAM et al., 1997). IGFBP-2 scheint das vorherrschende Bindungsprotein in humaner Milch zu sein (DONOVAN et al., 1991a), aber bis heute ist seine biologische Bedeutung dort nicht intensiv erforscht. Es wird in der Milchdrüse produziert (DONOVAN et al., 1995; COHICK & TURNER, 1998).

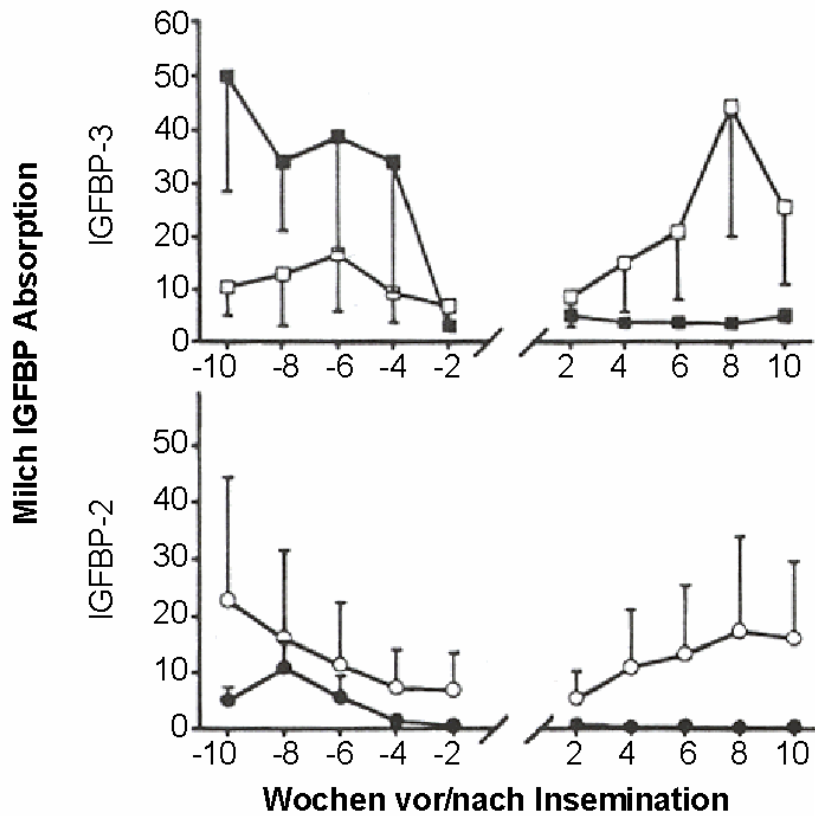
Von SEJRSEN et al. (2001) wurden mit Hilfe des Western Liganden Blots Konzentrationen der einzelnen IGFBPs in der Milch von 8 Kühen in verschiedenen Stadien der Laktation dargestellt. Diese variieren abhängig vom Laktationsstadium. So sind sie vor dem Kalben, im Kolostrum, in der Milch der frühen Laktation und am Ende der Laktation hoch und in der Mittlaktation niedrig konzentriert. Auch von VEGA et al. (1991) wurden während der Präpartalphase IGFBP-Konzentrationen in der Milch beziehungsweise im Milchdrüsensekret gefunden, die höher bzw. gleich hoch

sind wie im Blut. Jedoch lassen sich im Blut bei der Kuh während des Laktationsverlaufes kaum Konzentrationsunterschiede für die IGFbps feststellen. Lediglich während der Präpartalphase und Involution werden für IGFbp-3 erhöhte Werte berichtet (SHARMA et al., 1994).

Eine Bedeutung der in der Milch erscheinenden IGFbps für die Milchdrüsenfunktion ist somit wahrscheinlich und deutet auf ein mit der Trächtigkeit assoziiertes Regulativ für die mamäre IGFbp-Sekretion hin. BAUMRUCKER und ERONDU (2000) haben für die Zeitspanne nach der Kolostralmilchphase bis etwa 10 Wochen nach der Besamung eine Divergenz der IGFbp-2 und -3 Milchwerte bei solchen Kühen, die erfolgreich besamt wurden, und solchen, bei denen keine Trächtigkeit etabliert werden konnte, festgestellt (Abb. 2).

Schon vor der Belegung unterscheiden sich beide Gruppen. Tiere, die nicht tragend wurden, wiesen vor der Belegung niedrigere IGFbp-3 und höhere IGFbp-2 Werte auf als die erfolgreich besamten Vergleichskühe. Nach der Besamung blieben die IGFbp-Werte der gravid gewordenen Tiere auf zunächst gleich bleibend geringem Niveau; im Gegensatz dazu hatten die nicht gravid gewordenen Kühe höhere IGFbp-2 und -3 Konzentrationen in der Milch.

Diese Daten sind noch in ihrer Aussagesagekraft limitiert, da erstens die verwendete Quantifizierungsmethode (Western Ligand Blot) nicht hinreichend präzise und zudem für große Probenserien ungeeignet ist und weil zweitens die Beobachtungen auf eine relativ kleine Tiergruppe (n = 32) beschränkt sind.



aus BAUMRUCKER & ERONDU, 2000

Abbildung 2: Konzentrationen von IGFBP-2 und -3 in Milch von Kühen in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstatus. Kühe, die erfolgreich besamt wurden (gefüllte Symbole, n = 24) sind Tieren, die nicht tragend wurden (offene Symbole, n = 8) gegenübergestellt. Die gezeigten Werte basieren auf der im Western-Liganden-Blot gemessenen Absorption, die auf einen internen Rinderblut-Standard korrigiert wurde. Die so korrigierte Absorption wurde relativ gegen den Tag der Konzeption bzw. des letzten Besamungstermins aufgetragen. Kühe, die tragend wurden, hatten einen Besamungsindex (BSI) von durchschnittlich 1,5; Kühe, die nicht tragend wurden, lagen bei einem BSI von 3,2.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein nicht-radioaktives, enzym-immunologisches Nachweisverfahren zur Quantifizierung von IGFBP-2 zu etablieren. Dies sollte ermöglichen, physiologische IGFBP-2-Gehalte in der Milch von Kühen und Ziegen routinemäßig mit hohem Probendurchsatz messen zu können.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen zum IGFBP-2 und -3 in Milch bzw. der Milchdrüse beziehen sich in der Regel auf qualitative Bestimmungen, jedoch fast nie auf quantitative Analysen in der Milch. Vorhandene, auch kommerziell verfügbare Testverfahren für die IGFBPs von Mensch und Labornagern sind für Messungen am

Rind bzw. der Ziege nicht einsetzbar, da die Speziesheterologie eine übergreifende, valide immunologische Erkennung nicht erlaubt.

Die Untersuchung von IGFBP-2 in Milch bei einer großen Probenmenge mit einem nicht-radioaktiven Testsystem ist von daher neuartig.

Die Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von IGFBP-3 kann im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgestellt werden. PUVOGEL et al. (2005) beschreiben aber die Analyse von Milchproben mit einem von der Arbeitsgruppe Sauerwein am hiesigen Institut für Tierwissenschaften der Universität Bonn entwickelten Enzymimmunoassay. Durch die Entwicklung eines solchen Testes zur Messung von IGFBP-3 in Plasma (HENNIES & SAUERWEIN, 2003) und der Validierung für Milch können jedoch bisher nur Proben erfasst werden, die einen relativ hohen Gehalt an Bindungsprotein-3 aufweisen. Die Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten Proben liegt jedoch unterhalb der Nachweisgrenze, so dass Untersuchungen über eine komplette Laktation und in späteren Laktationsabschnitten noch nicht möglich sind. Deswegen müssen sich die Ausführungen hier auf die Darstellung des Bindungsprotein-2 der insulinartigen Wachstumsfaktoren konzentrieren.

An Hand von in ein- bzw. mehrwöchentlichen Abständen gezogenen Milchproben sollte der Konzentrationsverlauf von IGFBP-2 während der Laktation in einer großen Milchviehherde bzw. einer ausgewählten Ziegengruppe charakterisiert werden. Da sich der Gehalt des Bindungsprotein-2 im Serum bei extremen Fütterungssituationen nachweislich ändert (McGUIRE et al., 1995; VICINI et al., 1991) und der Ernährungsstatus somit als Einflussfaktor der IGFBP-2 Blutwerte agiert, sollten hier auch Untersuchungen zum Einfluss des Ernährungsstatus der Kühe auf die IGFBP-2-Konzentration in der Milch im Verlauf der Laktation dargestellt werden. Ebenso erfolgt eine jahreszeitliche Einordnung der Ergebnisse.

Um den näheren Zusammenhang von einem mit der Trächtigkeit assoziierten Regulativ für die mammäre IGFBP-Sekretion zu klären, sollten Untersuchungen durch einen Vergleich verschiedener Gruppen mit unterschiedlicher Anzahl von Besamungen bis zur erfolgreichen Trächtigkeit pro Tier vorgestellt werden.

Darüber hinaus sollte in vergleichenden Untersuchungen mit Ziegen, bei denen ein saisonaler Laktationsanöstrus besteht und die erst gegen Ende ihrer Laktation

wieder gravid werden können, die Bedeutung der Trächtigkeit für den Konzentrationsverlauf der IGFBP-2 in Milch geklärt werden.

Zur Regulation von IGFBP-2 bei entzündlichen Veränderungen der Milchdrüse liegen sowohl bei der Kuh wie auch bei der Ziege bislang keine Daten vor. Deshalb kommt in diesem Aspekt den Messungen in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zu.

Lactoferrin (Lf)

Lactoferrin ist ein etwa 80-kDa großes, Eisen-bindendes Glycoprotein und gehört zur Familie der Transferrine. (SORRENTINO et al., 1999; METZ-BOUTIGUE et al., 1984). Als das „rote Protein“ wurde es erstmals 1939 in Kuhmilch identifiziert (SOERENSEN & SOERENSEN, 1939). Es ist hauptsächlich in der Milch zu finden, kommt jedoch geringer konzentriert auch im Blut sowie praktisch in allen exokrinen Flüssigkeiten (MASSON & HEREMANS, 1971; MASSON et al., 1966), besonders in Galle, Tränen, Schweiß und Nasensekret vor.

Lactoferrin ist ein Bestandteil des natürlichen Schutzsystems für Tier und Menschen. Es wird vor allem durch neutrophile Granulozyten am Ort von Entzündungen freigesetzt. Bei Mastitiden geben die das Lactoferrin synthetisierenden Epithelzellen dieses in die Milch ab (BAGGIOLINI et al. 1970, BROCK 1995, LÖNNERDAL & IYER 1995, NUIJENS et al. 1996, AGUILA & BROCK 2001). Die Regulation der Lactoferrin-Synthese ist gewebespezifisch (LEVAY & VILJOEN, 1995). Sowohl hormonelle wie auch nicht-hormonelle Faktoren spielen dabei eine Rolle (BROCK, 2002).

Während der Embryonalentwicklung wird Lf in hohem Maße exprimiert, seine Bedeutung während dieser Entwicklungsphase ist aber noch weitestgehend unklar (WARD et al., 1999). Obwohl die physiologische Rolle des Lactoferrins im weiblichen Reproduktions-Trakt noch nicht vollständig geklärt ist, könnte es auch für viele wichtige Funktionen vor und nach der Fertilisation wichtig sein (WARD et al., 1999).

In der Milch ist Lf das Hauptbindungsprotein für Eisen und seine bedeutendste physiologische Aufgabe ist die Eisenspeicherung und der -transport während der Laktation (SORRENTINO et al., 1999). Lactoferrin existiert in eisengesättigter (holo-Lactoferrin) sowie eisenungesättigter Form (apo-Lactoferrin). In der apo-Form wird es in die meisten exokrinen Flüssigkeiten wie die Milch sekretiert (VORLAND, 1999). Neben diesen Effekten ist Lf in viele andere physiologische Aufgaben mit eingebunden (Abb. 3), in denen es Einfluss auf viele Organsysteme nimmt.

Eine besonders wichtige Rolle des Lactoferrins ist seine protektive Wirkung bei bakteriellen Infektionen. Lactoferrin wird am Ort der Entzündungsreaktion aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt und verhindert das Wachstum der Bakterien indem es auf den Eisenstoffwechsel der Bakterien Einfluss nimmt und so deren Proliferation unterbindet bzw. indem es die äußere Membran gramnegativer Mikroorganismen schädigt (ARNOLD et al., 1977; ELLISON et al., 1988). In diesem Zusammenhang hat sich das bovine Lactoferrin als effektiver als das von Nagern, Ziegen und Menschen erwiesen (VORLAND et al., 1998).

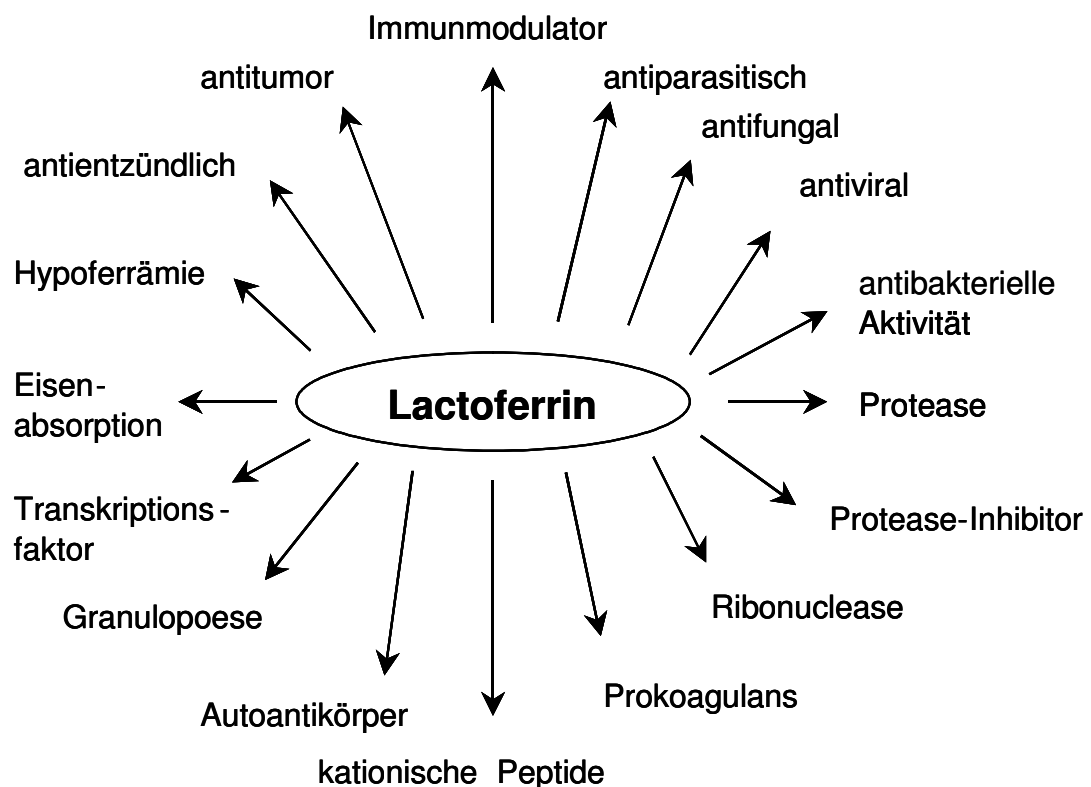


Abbildung 3: Vermutete Funktionen des Lactoferrins (BROCK, 2002)

Darüber hinaus hat Lactoferrin andere wichtige Funktionen im Organismus wie die protektive Wirkung bei Infektionskrankheiten, die Stimulation des Immunsystems und die Förderung einer guten Darmflora. Lf ist ein Antioxidans und wirkt Tumorwachstum und Metastasenbildung entgegen (VORLAND, 1999; LEVAY & VILJOEN, 1995, BEZAULT et al., 1994, YOO et al., 1998).

Die Synthese des Lf in der Milch wird durch die Epithelzellen der Milchdrüse geregelt (CAMPBELL et al., 1992). Die Konzentration in der Milch variiert abhängig von

Tierart und Laktationsstadium, wobei die Milch von Wiederkäuern weniger Lactoferrin enthält als die des Menschen (MASSON & HEREMANS, 1971). Auch spiegelt sich der Gesundheitsstatus der Milchdrüse in der Lf-Konzentration der Milch wider. So ist die Konzentration in der Milch von Kühen mit klinischer Mastitis höher als bei gesunden Tieren oder bei Kühen mit subklinischen Mastitiden (KAWAI et al., 1999).

Die Lactoferrinkonzentration im Eutersekret variiert in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Die höchsten Konzentrationen von bis zu 20-50 mg/ml werden während der Involution der Milchdrüse bei Mensch und Rind gemessen (LINZELL & PEAKER, 1974). Die Involution ist physiologisch gesehen die Zeit der Zell-Erneuerung. Bei Milchkühen ist diese Zeit durch den Ersatz alternder Epithelzellen mit neu hergestellten Zellen gekennzeichnet. Es ist jedoch kein Gewebe-Verlust von Zellen der Milchdrüse während dieser Periode feststellbar (CAPUCO & AKERS, 1999).

Da der Anteil des Lf im Kolostrum eine sehr hohe Konzentration erreicht, kann zudem davon ausgegangen werden, dass es eine wichtige Rolle für die Immun-Reaktion von Neugeborenen spielt.

Bisher wurde lediglich das bovine Lactoferrin in der Milch detaillierter beschrieben. Über die kleinen Wiederkäuer liegen bisher kaum Daten vor.

Ziel dieser Arbeit war es, enzymimmunologische Testverfahren zur Messung von Lactoferrin in der Milch von Kühen und Ziegen zu entwickeln. Kommerziell sind keine ELISAs zur Messung von Lf in Kuh- bzw. Ziegenmilch verfügbar. Die entwickelten Testverfahren sollten für die Routinediagnostik geeignet sein und auch geringe Konzentrationen erfassen.

An Hand der Messungen mit den entwickelten Testverfahren sollten dann im speziellen die folgenden grundlagenphysiologische Fragen und angewandte Aspekte näher betrachtet werden.

Zunächst war es Voraussetzung, die Verläufe des Lf beider Tierarten über eine gesamte Laktation darzustellen, was vor allem für die Ziege neue Erkenntnisse erwarten lässt. Ergänzend dazu sollte jeweils der Einfluss der Jahreszeit überprüft werden.

Weiterhin sind mit der Trächtigkeit der Tiere assoziierte Fragestellungen zu betrachten. Da Lactoferrin ebenfalls Aufgaben im reproduktionsphysiologischen

Ablauf zugeordnet werden, wird im Rahmen dieser Arbeit auch dieser Parameter auf Zusammenhänge mit der Trächtigkeit untersucht.

Auf Grund der weiteren bedeutenden Rolle von Lf bei bakteriellen Infektionen und anderen Erkrankungen ist seine Einordnung bei inflammatorischen Veränderungen in der Milchdrüse aufschlussreich. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob, und wenn ja wann eine Veränderung der Lactoferrinkonzentration schon Hinweise auf krankhafte Entwicklungen gibt. Während es in der Literatur dazu zwar einige Arbeiten zu experimentell induzierten Mastitiden bei Kühen gibt, existieren jedoch keinerlei Untersuchungen zu natürlichen Infektionen der Milchdrüse von Kühen und Ziegen. Dabei ergibt sich die Frage, inwieweit der Gesundheitsstatus der Tiere über wöchentliche Kontrollen der Werte beurteilt werden kann. In diesem Sinne ist die Quantifizierung speziell für die Milchviehhaltung interessant.

Sofern im Rahmen der Milchuntersuchungen ebenfalls Milchinhaltsstoffe wie Gesamtprotein, Fett, freie Fettsäuren, Lactose, Harnstoff sowie die somatischen Zellen bzw. die Milchmenge erfasst wurden, konnten sie ergänzend bzw. vergleichend in die Auswertungen der Daten von Lactoferrin und IGFBP-2 einbezogen werden.

Lactoferrin (Lf) und das IGF-System der Milchdrüse

Nach den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe Baumrucker interagieren sowohl holo-Lf wie auch apo-Lf der Kuh mit dem IGF-System (BAUMRUCKER & ERONDU, 2000; BAUMRUCKER, 2000; BAUMRUCKER et al. 2003). In *in vitro* Studien wurde von ihnen nachgewiesen, dass für den Transfer von rekombinantem humanen IGFBP-3 in den Zellkern dieses einen Komplex mit bovinem Lactoferrin bilden muss. Die Beteiligung an der Vermittlung der Liganden-unabhängigen nukleären IGFBP-3-Wirkung erweitert nun das Wirkungsspektrum des Lactoferrins. WEINZIMMER et al. (2001) beschreiben ebenfalls, dass IGFBP-3 im humanen Serum an ein Protein > 70 kDa bindet, welches sie allerdings als Transferrin, ein Protein, mit welchem Lactoferrin verwandt ist, identifizierten.

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war es, auch die Interaktion des Lactoferrins mit dem IGF-System auf Protein-Ebene näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte an Hand der vorliegenden Kuhmilchproben in großer Anzahl die These von

BAUMRUCKER & ERONDU (2000) überprüft werden und weitere Zusammenhänge bezüglich der Trächtigkeit näher beleuchtet werden. Eine weitergehende Untersuchung von IGFBP-3 in der Milch von Kühen und Ziegen konnte an dieser Stelle auf Grund der zu niedrigen Konzentration von IGFBP-3 in der Milch aus der zu untersuchenden relevanten Zeitperiode nicht durchgeführt werden (siehe Ausführung zum ELISA, HENNIES & SAUERWEIN, 2003, PUVOGEL et al., 2005).

Die Ausführungen zum Lactoferrin und IGFBP-2 werden von daher als eigenständige unabhängige Ergebnisse dargestellt und stehen nicht im funktionalen Zusammenhang.

Die Zusammenhänge zwischen der Trächtigkeit und den Proteinen sowie die Erkenntnisse zur Mastitis-Diagnostik und die völlig neuen Darstellungen zum kleinen Wiederkäuer bilden somit den Fokus der vorliegenden Arbeit.

2 Entwicklung kompetitiver Enzymimmuntests zur Messung von Lactoferrin und IGFBP-2 in Ziegen- und Kuhmilch

2.1 Lactoferrin

Lactoferrin wurde bisher in der Milch von verschiedenen Säugetieren wie Menschen, Pferden, Meerschweinchen, Ziegen, Schweinen, Rindern, Schafen und Mäusen nachgewiesen (MASSON & HEREMANS, 1971). Während die Milch des Menschen und des Rindes schon detailliert untersucht wurde, gibt es bisher kaum Aussagen bezüglich anderer Spezies wie z. B. der Ziege.

Die Voraussetzung zur Messung von Lactoferrin in Kuh- und Ziegenmilch war die Entwicklung einer geeigneten Testmethode.

Es gibt verschiedene Arten zur quantitativen Bestimmung des Lactoferrins. Als ein gängiges und sicheres Nachweisverfahren gilt der Enzymimmuntest (REJMAN et al., 1989, BUCHTA, 1991; WEIHUAN & OLIVER, 1999; MEISEL, 1990; CHEN et al., 2004). Die Empfindlichkeit ist hoch und erlaubt Lactoferrinbestimmungen in großen Konzentrations-Spannweiten. Zum Nachweis von Lactoferrin des Rindes oder anderen Tieren, wird ein solcher Test in der Regel von den verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt. Ein Nachteil ist, dass die Entwicklung aufwändig und teuer ist. Allerdings kann ein Testverfahren, einmal etabliert, für viele und große Versuchsreihen genutzt werden. Zum Nachweis des humanen Lf gibt es im Gegensatz zum bovinen oder caprinen Lactoferrin zahlreiche Enzymimmuntests käuflich zu erwerben.

Andere Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung erfolgen mit Verfahren wie der radialen Immundiffusion (MASSON & HEREMANS, 1971; SENFT & KLOBASA, 1973, HAGIWARA et al., 2003), Elektro-Immundiffusion (HARMON et al., 1975) oder durch chromatographische Bestimmung (YE & YOSHIDA, 1995).

Für die Untersuchungen zu dieser Arbeit war es wichtig, ein Testverfahren zu verwenden, was der großen Probenmenge gerecht wird und schnell und einfach in der Handhabung ist. Zudem war es wichtig, vergleichende Untersuchungen in der Milch der Spezies Kuh und Ziege durchführen zu können. Zur Messung von Lactoferrin in der Milch der Wiederkäuerspezies Rind und Ziege wurde zu diesem Zweck je ein tierartspezifischer nicht radioaktiver kompetitiver Enzymimmunoassay entwickelt.

2.1.1 Lactoferrinreinigung

Als Ausgangsmatrix wurde für die Testentwicklung caprines und bovines Lactoferrin in Reinform benötigt. Bovines Lactoferrin ist kommerziell verfügbar (Sigma, Deisenhofen). Caprines Lactoferrin musste zunächst in reiner Form dargestellt werden.

Zur Gewinnung des nativen Lactoferrins werden mehrere Verfahren beschrieben, u.a. die Isolierung des humanen Lf durch nur eine Prozedur, der Heparin-Sepharose-Chromatographie (BLÄCKBERG & HERNELL, 1980) oder die kostenaufwändige Isolierung über monoclonale Antikörper gegen humanes bzw. bovines Lf (KAWAKAMI et al., 1987). Die Verwendung mehrerer hintereinander angelegter Reinigungsschritte hat sich aber bewährt, so dass die in diesen Untersuchungen durchgeführte Reinigung des nativen caprinen Lactoferrins modifiziert nach BUCHTA (1991) als beste Möglichkeit, einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erlangen, betrachtet werden kann.

Zur Reinigung wurde als Ausgangsmatrix Ziegenkolostrum gewählt, da in diesem Laktationsstadium in der Regel ein hoher Gehalt an Lactoferrin in der Milch vorliegt (SENF & KLOBASA, 1973).

Zuerst wurde das Kolostrum entfettet. Es wurden aufeinander folgende Zentrifugationsschritte bei 4°C und 1.500 g für 20 min und für 60 min bei 4.500 g durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde die Fettschicht entnommen. Der pH-Wert der Magermilch betrug 6,5 bis 6,8. Zur Ausfällung des Caseins wurde der pH-Wert mit 5 M HCl auf 4,6 eingestellt und die Magermilch erneut bei 15.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis eine klare Lösung vorhanden war.

Es folgte eine 12 bis 24-stündige Dialyse (Dialysis Tubing, D0405, Sigma) bei 4°C gegen Wasser. Im Anschluss wurde der Inhalt der Dialyseschläuche erneut für 30 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet wurde erneut verworfen und der pH mit 5 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Erfolgte die weitere Reinigung nicht direkt im Anschluss wurde die gewonnene Molke in kleinen Portionen bei -20°C zwischengelagert.

Die anschließende Aufreinigung erfolgte im Äkta Purifier 10 Liquid Chromatography System (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Hier wurde die sterilfiltrierte Molke zum Kationenaustausch auf eine HR 5/10 Säule, die mit 2 ml Source 15Q (Amersham Pharmacia Biotech) als Trägermatrix gepackt war, geladen.

Die Auftrennung der Proteine einer Lösung basiert bei der Ionenaustauschchromatographie auf der reversiblen Bindung von Proteinen an ein gegensätzlich geladenes Säulenmaterial unter definierten pH-Bedingungen. Die Säulenmatrix ist beim Kationenaustausch negativ geladen, so dass alle positiv geladenen Proteine an die Matrix binden. Die gleichsinnig geladenen und ungeladenen Proteine erscheinen im Durchlauf. Durch eine Elution mittels eines Salzgradienten werden die gebundenen Proteine je nach Bindungsintensität, d. h. je nachdem wie hoch ihre Nettoladung im Gegensatz zur Säulenmatrix ist, früh oder spät von der Säule abgetrennt und erscheinen so im Elutionsprofil.

Es wurden 35 ml caprine Molke auf die Kationenaustauschsäule aufgetragen. Anschließend erfolgte eine 5-malige Waschung der Säule mit dem CIEX-Laufpuffer aus 0,03 M Na_2HPO_4 (Sigma), 0,03 M Na-Formiat (Sigma), 0,06 M Na-Acetat (Roth, Karlsruhe) eingestellt auf einen pH-Wert von 7,0. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M (Abb. 4). Die gesamte Reinigung erfolgte unter konstanten pH-Bedingungen von 7,0, bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Bei allen durchgeführten Reinigungsschritten wurden die Eluate bei 260 und 280 nm auf ihren Proteingehalt hin untersucht.

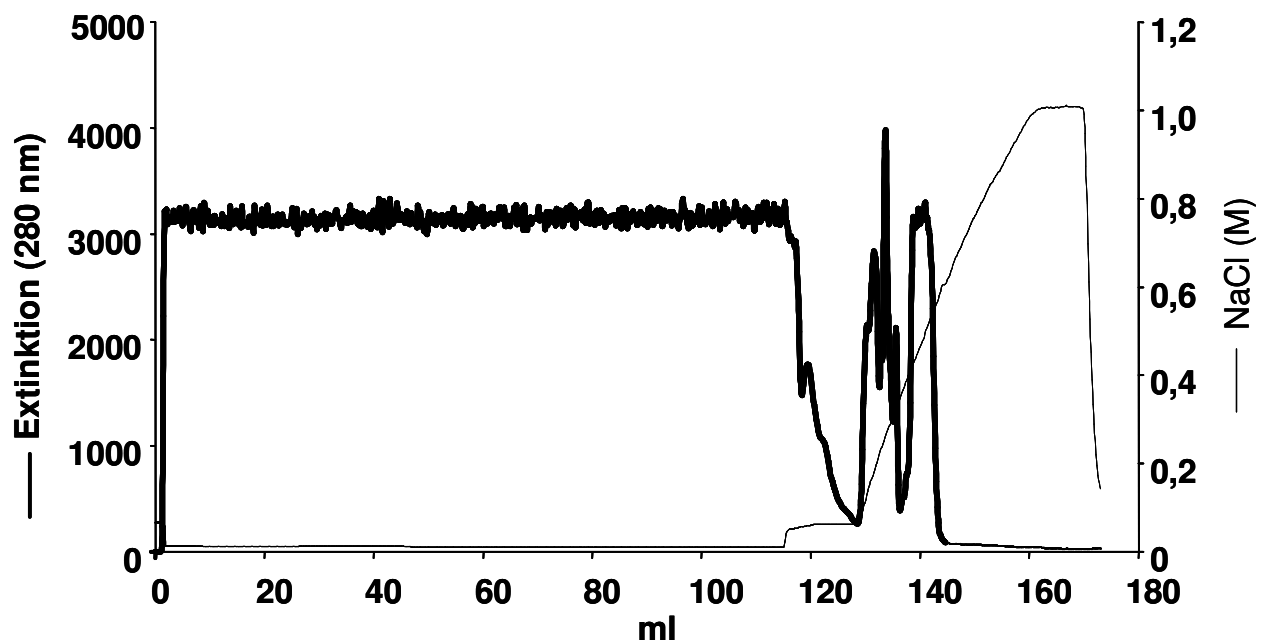


Abbildung 4: Elutionsprofil des Kationenaustausches zur Reinigung von caprinem Lactoferrin aus Ziegenkolostrum

Das caprine Lactoferrin eluierte unter den gewählten neutralen Bedingungen bei etwa 0,5 M NaCl. Die Fraktionen des in Abb. 4 gezeigten letzten großen Peaks wurden vereinigt.

Um mögliche Verunreinigungen abzutrennen, wurde anschließend mit den vereinigten Lf-haltigen Fraktionen eine Gelfiltration durchgeführt (Abb. 5). Die dafür verwendete Säule (XK 16, Amersham Pharmacia Biotech) war mit 120 ml Superdex 200® (Amersham Pharmacia Biotech) gepackt. Die Gelfiltration trennt Proteine in einem Durchflussverfahren auf Grund ihrer Molekulargröße auf. Während die großen Proteine schnell über die Säulenmatrix laufen brauchen kleinere Proteine einen längeren Weg und erscheinen so im Elutionsprofil später. Der limitierende Faktor ist bei dieser Reinigungsform das Probenvolumen. Es soll nicht mehr als 1 % des Säulenvolumens betragen (AIGNER & NEUMANN, 1997).

Als Lauf- und Äquilibrationpuffer wurde PBS (s. Anhang) eingesetzt (Flussrate 1 ml/min). Die Säule wurde nach Probenauftrag 1,5-mal mit dem Puffer gewaschen.

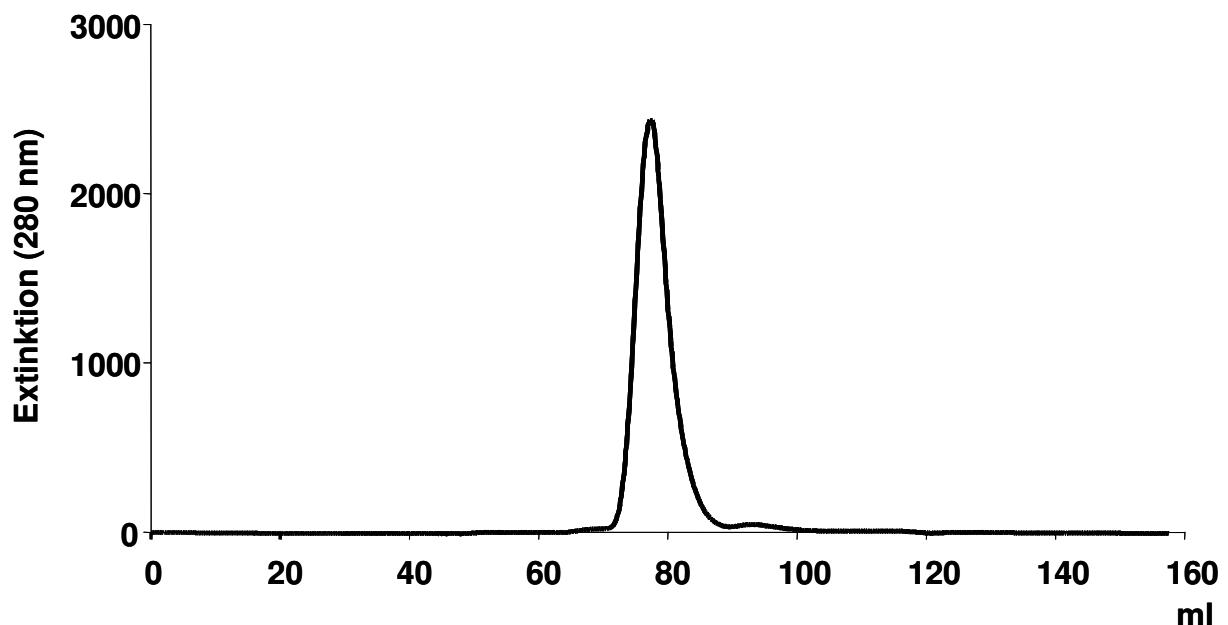


Abbildung 5: Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie zur Aufreinigung der vereinigten lactoferrinhaltigen Fraktionen aus dem Kationenaustausch

In dem Elutionsprofil der Gelfiltration zeigt sich der Erfolg der Reinigung. Es wurde nur ein Hauptpeak eluiert, dessen Fraktionen vereinigt, aliquotiert und bei -20°C gelagert wurden.

Die Konzentration des Lactoferrins in den vereinigten Fraktionen aus der Reinigung wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt. Das Gesetz beschreibt die Beziehung zwischen Absorption durchstrahlter Schichtdicke und Konzentration einer Lösung wie folgt: $E = \varepsilon \cdot c \cdot b$

E = Extinktion bzw. Absorption

ε = molaren Extinktionskoeffizienten; entspricht der Extinktion E einer einmolaren Lösung ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bei einer Schichtdicke von 1 cm ($b = 1$) und bei der Wellenlänge λ

c = molare Konzentration (mol/l)

b = Schichtdicke

Eine Probe aus den vereinigten Fraktionen des Hauptpeaks der Gelfiltration wurde 1:10 in PBS verdünnt. Anschließend wurde ihre Extinktion fotometrisch bei 280 nm bestimmt.

Der Extinktionskoeffizient von caprinem Lactoferrin beträgt 1,33 (<http://paris.chem.yale.edu/extinct.3.1.1>, Dezember 2000, LE PROVOST et al., 1994). Daraus ergibt sich für die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration eine Konzentration von 5,13 mg caprinem Lactoferrin pro ml.

Zur Kontrolle, ob es sich bei dem aufgereinigten Protein um Lactoferrin handelt, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) modifiziert nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Durch die Zugabe von SDS werden dabei die aufgetragenen Proteine denaturiert. Weiterhin lagert sich das SDS an die Polypeptidketten an und verleiht ihnen so auf Grund ihrer Größe eine entsprechend negative Ladung, die die eigene Ladung überlagert. Alle Proteine wandern somit durch das elektrische Feld zur Anode hin. Durch den Vernetzungsgrad des Polyacrylamidgels werden die Proteine in ihrer Wanderung im elektrischen Feld beeinflusst. Entsprechend ihres Molekulargewichtes wandern größere Proteine langsamer als kleine. Mit Hilfe eines im Gel mitlaufenden Molekulargewichtsmarkers lässt sich nach der Anfärbung der entstandenen Banden ihre Größe bestimmen.

Zur Darstellung der aus der Reinigung gewonnenen Fraktionen wurden diese in die Taschen des 5,6-%igen Sammelgels aufgetragen, um im darunter liegenden 10-%igen Trenngel zu wandern. Die verwendeten Chemikalien für die Gele und Puffer der Gelelektrophorese sowie deren Herstellung sind im Anhang beschrieben. Es wurden Fraktionen auf Grund des Elutionsprofils aus verschiedenen Phasen des

Kationenaustausches ausgewählt. Sie wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer (2-fach konzentriert) versetzt mit 2-Mercaptoethanol (4 %) verdünnt. Und die so verdünnten Proben wurden 10 min im Wasserbad gekocht. Mercaptoethanol dient dazu, vorhandene Disulfidbrücken aufzuspalten. Es wurden anschließend zwischen 6 bis 20 µg der Proben im Gel, welches in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer (Hofer® Might Small SE 245, Amersham Bioscience) fixiert war, aufgetragen. In einem weiteren Gel wurde der Hauptpeak aus der Gelfiltration aufgetrennt. Dieser wurde sowohl vorbehandelt wie oben beschrieben bzw. nur in SDS-Probenpuffer (2-fach konzentriert) im Verhältnis 1:1 verdünnt aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte zunächst für 30 min bei 50 Volt, anschließend wurde für weitere 1 bis 1,5 h auf eine Spannung von 100 Volt erhöht. Die Banden wurden 30 min durch eine Coomassiebrilliantblau-Lösung angefärbt, der eine Entfärbung mit wechselnder Entfärbelösung folgte. In Abb. 6 sind die mit Coomassiebrilliantblau angefärbten Banden aus den Reinigungsfractionen des Kationenaustausches und der Gelfiltration zu sehen.

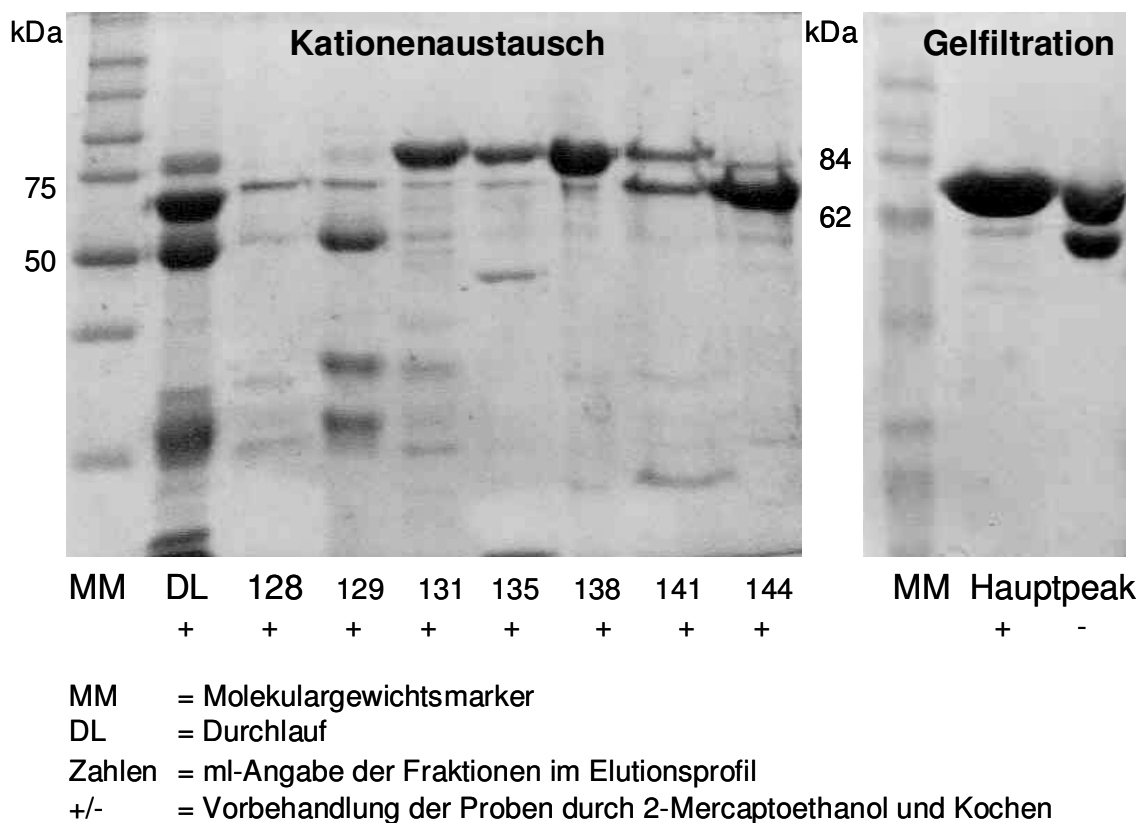


Abbildung 6: Ausgewählte Fraktionen der Reinigung caprinen Lactoferrins aus Kolostrum im SDS-PAGE mit Coomassiebrilliantblau-Färbung

Bei einer Gegenüberstellung verschiedener Spezies zeigt das Lactoferrin ein jeweils anderes Laufverhalten in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 7). Zusätzlich zum caprinen und bovinen Lf wurde noch ovines Lf aufgetragen, um die Unterschiede zwischen den Tierarten noch deutlicher herauszustellen. Das Lactoferrin des Schafes konnte in Vorversuchen zur Reinigung selbst aus Schafkolostrum gewonnen werden.

Bei einer Zugabe von 2-Mercaptoethanol (4%) im Probenpuffer und anschließendem 10-minütigem Kochen der Proben wird sowohl bei der Ziege und dem Schaf (aus Kolostrum gereinigt) wie auch bei dem von Sigma gekauften Rinder-Lactoferrin nur eine Bande im Gel sichtbar. Ohne jegliche Vorbehandlung, sondern nur bei gleicher Verdünnung im Probenpuffer zeigt sich das Lactoferrin bei Ziege und Schaf eindeutig als Doppelbande. Beim Rind ist eine breitere, etwas tiefer angeordnete Bande sichtbar. Diese wird im Western Blot mit dem spezifischen bovinen Antiserum (Kapitel 2.1.4) jedoch auch als doppelte Bande deutlich differenziert.

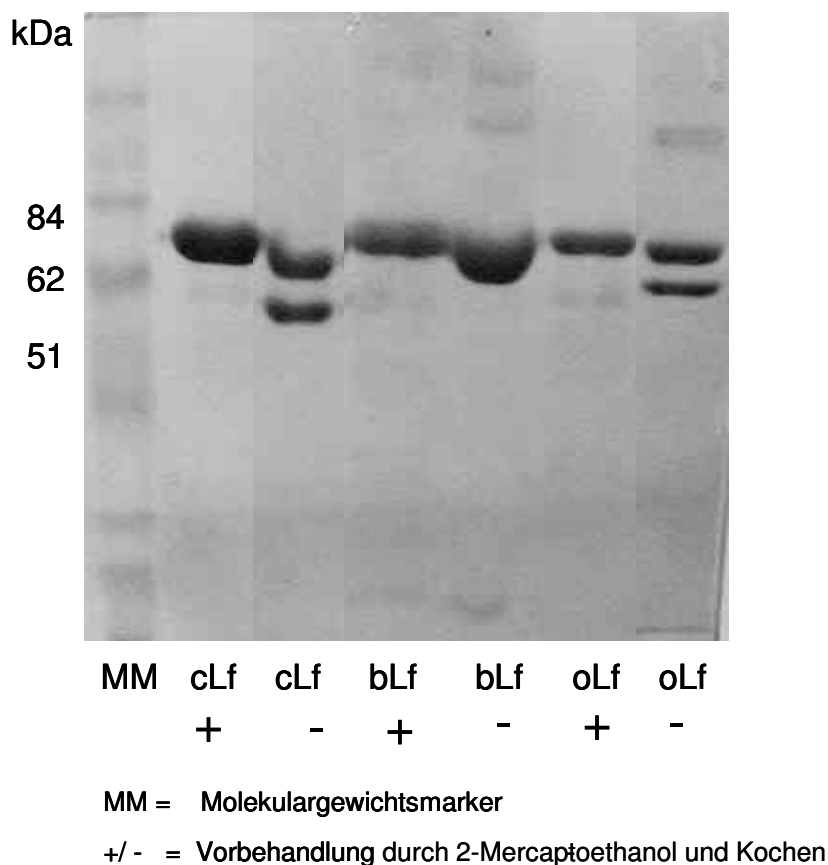


Abbildung 7: Lactoferrin, gereinigt aus Ziegen- und Schafkolostrum bzw. gekauftes Rinder-Lactoferrin (Sigma) im SDS-PAGE mit Coomassiebrilliantblau-Färbung.

Schlussfolgerung zur Reinigung des Lactoferrins

Die Verwendung mehrerer hintereinander angelegter Reinigungsschritte hat sich bewährt, so dass die in diesen Untersuchungen durchgeführte Reinigung des nativen caprinen Lactoferrins modifiziert nach BUCHTA (1991) als effektives Resultat daraus betrachtet werden kann. Die Ausfällung von einem Großteil der Proteine und die Dialyse der Vollmilch wurden schon von BAER et al. (1979) bei Schafmilch beschrieben. Die Ziegenmilch in dieser Arbeit wurde dementsprechend mit kleinen Anpassungen in den Zentrifugations- und Dialyseschritten durchgeführt. Im Anschluss wurden die von BUCHTA (1991) für die Reinigung des ovinen Lf und von NAM et al. (1999) für caprines Lf beschriebenen Chromatographie-Schritte etwas variiert. So erfolgte für die weitere Aufreinigung der gewonnenen Molke nach der Ionenaustauschchromatographie keine weitere Reinigung über die Affinität, sondern mit Hilfe der Gelfiltration über das Molekulargewicht des Lactoferrins. Da durch den Ionenaustausch schon eine hohe Aufkonzentrierung stattgefunden hatte, bot sich dieser Schritt als effektiv an. Es konnte durch die Modifikation der in der Literatur beschriebenen Verfahren eine große Probenmenge verarbeitet werden und dementsprechend viel pures natives caprines Lactoferrin auf kostengünstigem Weg gewonnen werden.

Bei der Gegenüberstellung der verschiedenen Tierarten im SDS-PAGE (Abb. 7) ergibt sich die Frage, inwiefern das Laufverhalten in den verschiedenen Formen des Lactoferrins begründet liegt.

Lactoferrin gehört zur Familie der Transferrine mit einer Größe um 80 kDa, die zwischen den Spezies geringfügig variiert. So untersuchten SHIMAZAKI et al. (1991) unter anderem die Molekulargewichte des Lactoferrins bei verschiedenen Spezies. Ovines, humanes und bovines Lactoferrin hatten eine Größe von 80 kDa, wohingegen das caprine mit 78 kDa etwas kleiner war. Von ihnen selbst gereinigtes bovines apo-Lf (kein gebundenes Eisen) aus dem Kolostrum und auch natives Lf aus der Milch der fortgeschrittenen Laktation hatte eine Größe von 79 kDa.

Diese geringfügigen Abweichungen kann man in der hier gezeigten Gelelektrophorese nicht eindeutig aufzeigen. Die Größe der einzelnen Banden unter reduzierten Laufbedingungen liegt jedoch auch hier bei allen Tierarten im Bereich von 79 ± 2 kDa.

Wurde Lactoferrin in Körperflüssigkeiten untersucht zeigte sich jedoch, dass das Lactoferrin in zwei verschiedenen Formen vorlag, die unterschiedlich groß waren.

BEZWODA & MANSOOR (1986) beschreiben in ihren Untersuchungen eine leichtere Eisen-gesättigte Form (62 kDa) und eine schwerere ungesättigte Form (76 kDa) des nativen humanen Lactoferrins bei nicht reduzierten Proben aus der Milch. KIJLSTRA et al. (1989) beobachteten ebenfalls eine leichtere Form von Lactoferrin aus Tränen. Ebenso wie bei BEZWODA & MANSOOR (1986) liegt auch in den eigenen Untersuchungen zur Milch unter nicht reduzierten Bedingungen eine Doppelbande bei der elektrophoretischen Auftrennung des nativen Ziegen- und Schaf-Lactoferrins, jeweils aus Kolostrum gereinigt, vor. Die beiden Banden sind etwas kleiner als die Hauptbande, die unter reduzierten Bedingungen zu sehen ist. NAM et al. (1999) beschreiben den Anteil des aus Ziegenkolostrum aufgereinigten nativen Lactoferrins, der Eisengesättigt ist, mit 30 %.

Das bovine Lactoferrin (Sigma) zeigt unter nicht-reduzierenden Bedingungen lediglich eine etwas breitere Hauptbande, die jedoch in der Höhe der oberen Doppelbande der anderen Spezies angeordnet ist. Unter reduzierten Bedingungen ist auch hier eine etwas größere Hauptbande zu beobachten.

2.1.2 Markierung des Lactoferrins

Ein Teil des gereinigten Lf wurde für den Test mit Biotin markiert. Dazu wurden 40 µg bovines bzw. caprines Lactoferrin in 200 µl 0,1 M NaHCO₃ (pH 9,0; Roth) aufgenommen. Der in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO (Dimethyl Sulfoxid, Sigma) gelöste Biotinamidocaproat-N-hydroxysuccinimidester (BXHNS, Sigma) wurde dem Protein in einem 50-fachem molaren Überschuss hinzugegeben und 4 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Der Vorgang wurde durch Zugabe von 80 µl 1 M NH₄Cl (Roth) abgestoppt. Um das an das Lactoferrin gebundene Biotin von dem freien Biotin abzutrennen, musste die Lösung über eine PD-10 Säule (Amersham Pharmacia Biotech), das heißt auf Grund des Molekulargewichtes, gereinigt werden. Die Äquilibration der Säule und die Elution fanden mit PBS, dem 1 % BSA (Sigma) zugesetzt wurde, statt. Die Ausschlussgrenze der Säule liegt bei 5 kDa und das Ausschlussvolumen bei 2,5 ml, demzufolge konnten die ersten 2,5 ml Durchlauf verworfen werden. Das folgende Eluat wurde in 500 µl großen Fraktionen gesammelt und mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt. Die mit Biotin-markierten Lf-haltigen Fraktionen wurden mit Hilfe des spezifischen Antiserums

(siehe Kapitel 2.1.3) auf einer Mikrotiterplatte identifiziert. Die lactoferrinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und bei -20°C gelagert.

2.1.3 Herstellung von Antiseren

Da sowohl für bovines wie auch für caprines Lactoferrin spezifische Antikörper hergestellt werden mussten, wurden jeweils zwei Kaninchen aktiv gegen bovines bzw. caprines Lf immunisiert.

Den Kaninchen wurden als Startimmunisierung einmalig mit einer Emulsion aus tierartspezifischen Lf und Freund's Adjuvant Complete (Sigma) injiziert. Die Kaninchen, die mit dem bovinem Lf immunisiert wurden, erhielten als erste Immunisierung je $500\ \mu\text{g}$ bLf. Die mit caprinem Lf immunisierten Kaninchen erhielten als Startdosis $200\ \mu\text{g}$ cLf. Das Lf wurde jeweils in $1\ \text{ml}$ Freund's Adjuvant Complete (Sigma) emulgiert und dann verteilt auf sechs Stellen subkutan am Rücken verabreicht.

Im monatlichem Abstand folgt eine Auffrischung mit einer Emulsion aus $150\ \mu\text{g}$ bovinem bzw. $65\ \mu\text{g}$ caprinem Lf in je $1\ \text{ml}$ Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma). Auch hier erfolgten die Injektionen subkutan auf sechs Stellen am Rücken verteilt.

Zur Gewinnung des Antiserums wurde die Ohrvene der Kaninchen mit Hilfe einer sterilen Kanüle angeritzt. Aus dem aufgefangenen Blut ($20\ \text{ml}$) wurde im Anschluss durch Zentrifugation bei $2500\ \text{g}$ das Serum gewonnen und dieses aliquotiert bei -20°C tiefgefroren. Die Blutentnahmen folgten nach der dritten Immunisierung im wöchentlichen Abstand. Durch Umstrukturierungen im Stall konnte es im Einzelfall jedoch auch zu größeren Abständen zwischen den einzelnen Blutentnahmen kommen.

Zur Titerbestimmung der Antikörper wurde ein Test auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Testprinzip ist schematisch in Abb. 8 dargestellt. Die für diese Tests verwendeten Puffer sind im Anhang aufgeführt.

Es wurden Mikrotiterplatten (EIA plate 9018, Corning Coster, Cambridge, MA, USA) mit Schafantikörpern gegen das Fc-Fragment des Kaninchen-IgGs (institutseigene Herstellung) beschichtet. Dazu wurden die Schaf-Antikörper auf $1,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ mit Beschichtungspuffer verdünnt und dann jeweils $100\ \mu\text{l}$ pro Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach der Inkubation von $20\ \text{h}$ bei 4°C wurden die Platten $2\ \text{h}$ bei Raumtemperatur mit 2,5-%iger Caseinlösung abgesättigt. Im Anschluss daran

wurden die Platten 5-mal mit Waschpuffer gewaschen (EL 404 Microplate Autowasher, Bio-Tek Instruments, USA) und zur Lagerung pro Vertiefung mit 200 µl Testpuffer II, der mit Proteaseinhibitor (Complete™, Boehringer Mannheim) (200 µl/l) und 0,05 % NaN₃ versetzt war, beschickt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C für maximal 14 Tage.

Auf der so vorbereiteten Mikrotiterplatte wurde nach Dekantieren der Pufferlösung separat für die jeweilige Tierart das aus den Kaninchen gewonnene Serum in Form einer Verdünnungsreihe von 1:5.000 bis 1:640.000, verdünnt in Testpuffer II, auf je eine Platte aufgetragen. Jede Probe wurde im Doppelansatz mit je 100 µl/Kavität auf die Platte pipettiert. Nach einstündiger Vorinkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln folgte die Zugabe von 50 µl verdünntem Biotin-markierten Lactoferrin je Kavität. Dabei wurde das bovine markierte Lf in der Verdünnung 1:16.000 eingesetzt und das caprine markierte Lf 1:10.000. Nach 1 h Inkubation unter gleichen Bedingungen folgte eine Enzym-Substrat-Reaktion wie beim späteren ELISA (siehe Kapitel 2.1.5).

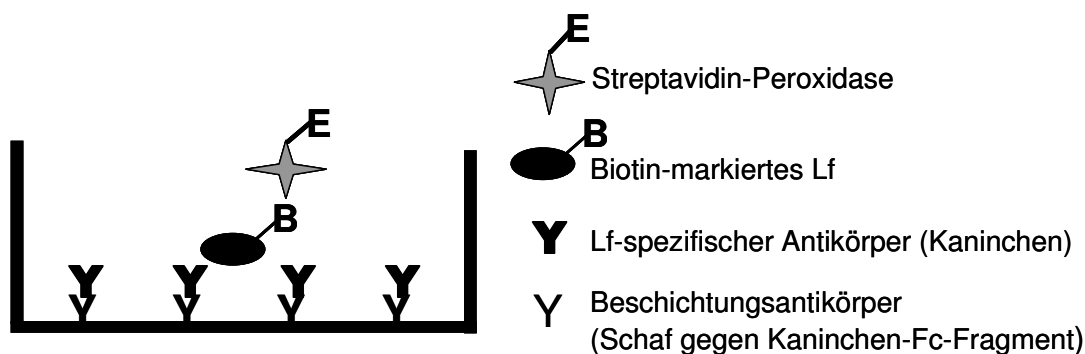


Abbildung 8: Schema des Testprinzipes zur Bestimmung des Antikörpertiters

Als Titer der Antikörper im Serum der Kaninchen wurde die berechnete Verdünnungsstufe definiert, wo das Antiserum jeweils eine bei 405 nm gemessene Extinktion von 1,0 besaß.

Für jede Tierart wurde ein Kaninchen ausgewählt, mit dessen Antiserum die besten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Hierbei bildete das Kaninchen Nr. 46 den besten Titer gegen das caprine Lf, welcher in der Verdünnung 1:160.000 als Antikörpertiter definiert wurde. Zur Gewinnung des Antiserums gegen das bovine Lf stellte sich das Kaninchen Nr. 38 als Optimum

heraus. Hier konnte eine Extinktion von 1,0 (405 nm) des Serums bei einer Verdünnung von 1:320.000 gemessen werden. Die Titerentwicklung der beiden Kaninchen ist in Abbildung 9 dargestellt.

Als Kontrolle bei der Titerbestimmung diente das Serum eines nicht immunisierten Kaninchens, das in gleicher Verdünnung wie das Antiserum aufgetragen wurde.

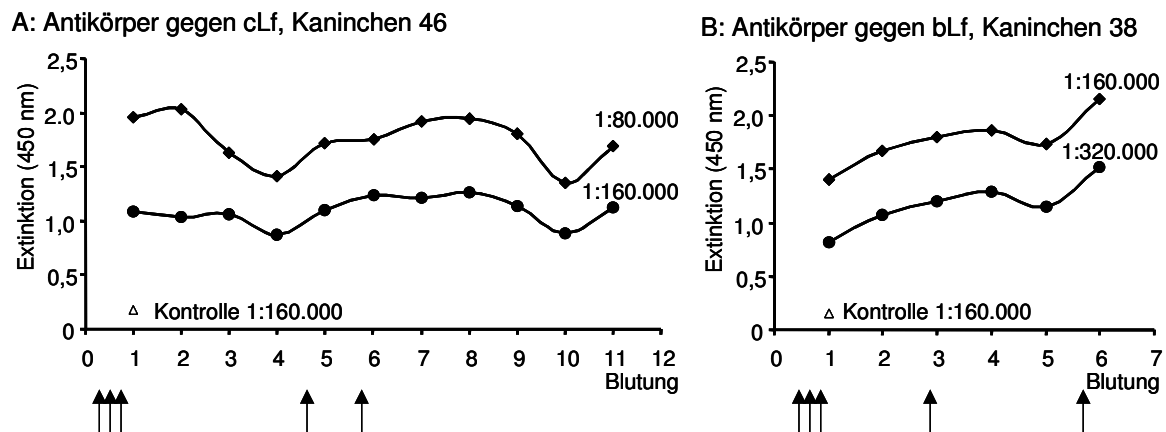


Abbildung 9: Titerentwicklung im Serum der mit caprinem (A) bzw. bovinem Lactoferrin (B) immunisierten Kaninchen, sowie die Extinktion eines nicht-immunisierten Kaninchens (Δ) als Kontrolle.

↑ Immunisierungen

Schlussfolgerungen zur Herstellung der Antiseren

Es stellt sich die Frage, ob vielleicht mit einem Test auch beide Tierarten untersucht werden könnten. Vergleicht man zu diesem Zweck die Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies zeigt sich, dass die Aminosäuresequenz des bovinen Lactoferrins zu 69 % mit dem des humanen Lf übereinstimmt (MOORE et al., 1997). Bei einem Vergleich der caprinen (LE PROVOST et al., 1994) und bovinen Aminosäuresequenzen (MEAD & TWEEDIE, 1990) über die BLAST 2-Datenbank (Version BLASTP2.2.6) zeigen die beiden Wiederkäuerspezies eine Übereinstimmung von 90 %.

CHEN et al. (2004) publizieren bisher die einzigen Untersuchungen zu Lactoferrin in Ziegenmilch mittels eines selbst entwickelten ELISAs. Sie arbeiten in ihrem Testsystem mit einem aus dem Kaninchen gewonnene Antiserum gegen das bovine Lf. Anders als bei ihnen wurde allerdings für unseren Test ein tierartspezifischer Antikörper für die Ziege entwickelt.

mit der 1-%iger BSA-Lösung sorgfältig gespült, um dann eine 30-minütige Inkubation unter gleichen Bedingungen mit 1:10.000 in 1-%iger BSA-Lösung verdünntem peroxidase markiertem Antikörper gegen Kaninchen IgG (Monoclonal Anti-Rabbit IgG, γ -chain specific, Sigma) durchzuführen. Nachdem die Membran 3-mal mit Waschpuffer aus 10 % PBS und 0,05 % Tween 20 (Roth) gespült wurde, erfolgte die Sichtbarmachung der erkannten Banden durch eine Anfärbung mit DAB-Lösung als Substrat. Die enzymkatalytische Reaktion wurde nach ausreichender Anfärbung der Banden mit Wasser zum Stillstand gebracht.

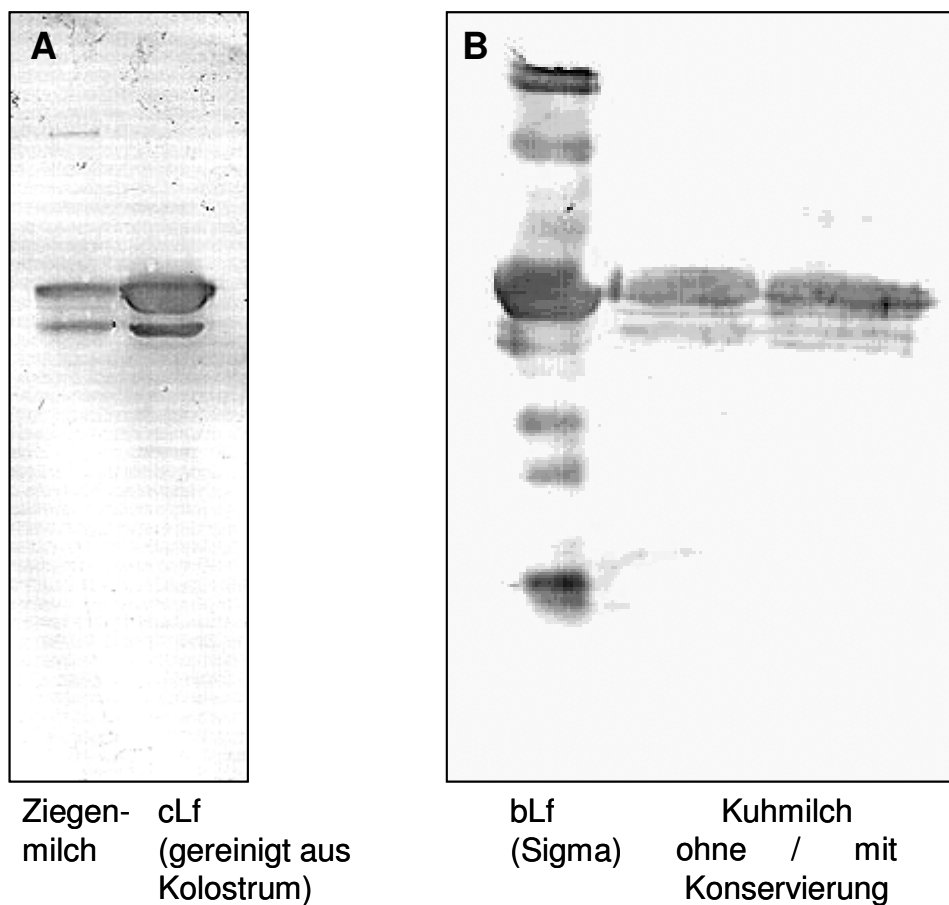


Abbildung 11: Western Blot mit den aus Kaninchen gewonnenen spezifischen Antisera gegen **A:** caprines Lactoferrin (Kaninchen 46); **B:** bovines Lactoferrin (Kaninchen 38).

Alle Proben wurden in Probenpuffer ohne Mercaptoethanol verdünnt.

Auf dem Western Blot (Abb. 11) ist das Lactoferrin in der Milch der Kuh sowohl mit wie auch ohne Konservierungsmittel jeweils als Doppelbande, die Ziege sowie Schaf schon im SDS-Page eindeutig zeigen (s. Abb. 7), zu sehen. Auch bei der Überprüfung des Antiserums gegen das caprine Lf zeigt sich in der Ziegenmilch die schon beschriebene Doppelbande in der Höhe des Lactoferrins. Ansonsten sind bei der Ziege keine weiteren Banden zu beobachten.

Bei der Auftrennung des bovinen Lactoferrins der Firma Sigma erkennt das Antiserum mehrere Banden, sowohl in dem Lactoferrin zugeordneten höheren wie auch im niederen molekularen Bereich (Abb. 11).

Schlussfolgerung zur Spezifität der Antiseren

Bei der Überprüfung der Antiseren mit Hilfe des Western Blots zeigt sich in der Milch beider Spezies die Doppelbande, die wahrscheinlich die eisengesättigte und ungesättigte Form, wie sie in Körperflüssigkeiten vorkommt, darstellen. Auch bei der Kuh ist hier im Gegensatz zum SDS-PAGE (Abb. 7), das das Lf der verschiedenen Tierarten vergleichend darstellt, dieses Laufverhalten zu beobachten. Möglicherweise ist dort auch die sichtbare breite Hauptbande bei der Auftrennung des gekauften bovinen Lactoferrins unter nicht reduzierenden Bedingungen demnach aus zwei eng aneinander liegenden Banden zusammengesetzt. Im Western Blot werden sowohl im Bereich über wie auch unter den bekannten Lactoferrin-Banden bei dem gekauften bovinen Lactoferrin weitere Banden vom Antiserum erkannt. Die Ursachen hierzu sind wahrscheinlich in der Struktur des Lactoferrins begründet:

Lactoferrin besteht aus einer Polypeptidkette, die sich in zwei Stränge, das N- und das C-Endstück, faltet. Jeder der Stränge lässt sich nochmals in die jeweiligen Fraktionen N1/N2 und C1/C2 aufteilen, in deren Mitte je eine Eisenbindungsstelle liegt (QUERINJEAN et al., 1971, SPIK et al., 1982). Zur Bindung des Eisens werden zwei Bicarbonat-Anionen benötigt (IYER & LÖNNERDAL, 1993). Die beiden Bindungsstellen sind sich sehr ähnlich (MOORE et al., 1997), auch bei einem Vergleich der Positionen des humanen und des bovinen Lactoferrins (ANDERSON et al., 1989).

MANTEL et al. (1994) beschreiben für eisengesättigtes humanes Lf ebenfalls, dass nach Reduzierung im 12-%igen SDS-Page aus einer Hauptbande bei 76 kDa, drei zusätzliche Banden in der Größe von 66, 47,5 und 35 kDa entstehen. Sie vermuten,

dass die beiden kleineren Banden (47,5 und 35 kDa) den zwei Strängen des Lactoferrins entsprechen. Lactoferrin ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

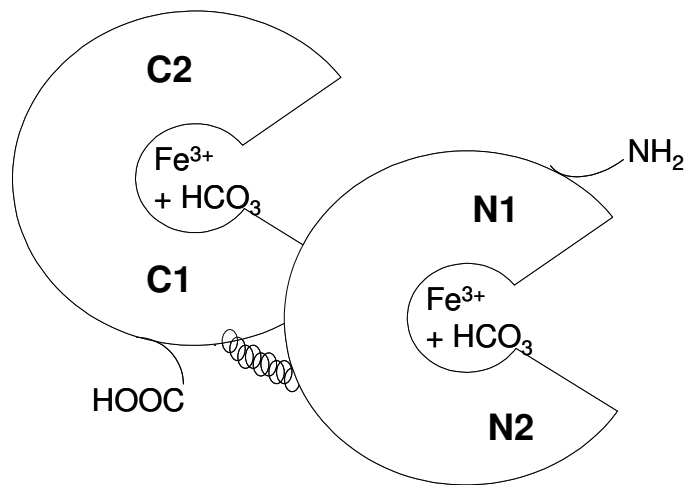


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Struktur des Lactoferrins (modifiziert nach JANNIIE et al., 2000)

Dies würde darauf hinweisen, dass Disulfid-Brücken zwischen den Strängen existieren oder aber sehr starke nicht-kovalente Assoziationen zwischen den zwei Strängen einiger Lf-Moleküle. Bei nativem humanen Lf beobachteten MANTEL et al. (1994), dass die beiden kleineren Banden nach der Reduzierung erscheinen, während als Hauptform aber nur die 76 kDa-Bande zu sehen ist, die leichtere Form jedoch nicht erscheint.

Die tiefer gelegenen Banden des hier aufgetrennten bovines Lf können denen von MANTEL et al. (1994) beschriebenen in den Höhen 66, 47,5 und 33 kDa entsprechen. Allerdings wurde die Probe nicht reduziert, jedoch im Probenpuffer bei -20 °C gelagert und mehrmals aufgetaut.

Diese Daten lassen bedeutende Veränderungen im Aufbau der Lf-Moleküle nach der Eisen-Bindung vermuten, was von andern Quellen unterstützt wird (BEZWODA & MANSOOR, 1986; KIJLSTRA et al., 1989).

Oberhalb der typischen Lf-Doppelbande liegen im hochmolaren Bereich weitere Banden vor, die durch Lactoferrin in polymerisierter Form erklärt werden können. MANTEL et al. (1994) beschreiben die Polymerisation des nativen Lactoferrins in verschiedenen Puffern. Auch unter Lösung in Phosphat-Puffer (pH 7,4), in dem auch das gekaufte bovine Lf gelöst ist, bilden sich Polymere, z. B. bei 350 kDa und bei einem Molekulargewicht größer 10^6 kDa. WANG & HURLEY (1998) beschreiben

ebenfalls, dass Lactoferrin in der Form eines Multimers im Milchsekret trockenstehender Kühe vorkommt.

2.1.5 Durchführung des ELISAs

Zur Bestimmung von Lactoferrin in der Milch von Ziegen und von Kühen wurde jeweils ein tierartspezifischer kompetitiver ELISA entwickelt. Das Testprinzip ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Durchführung beider Testsysteme ist analog.

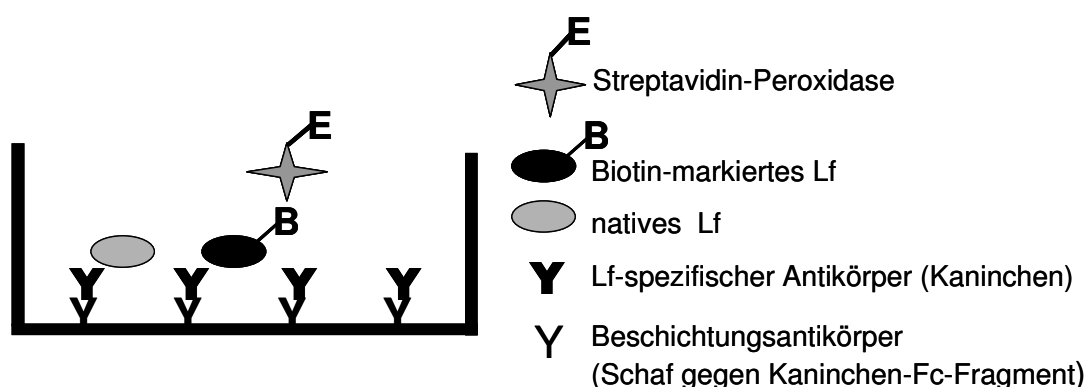


Abbildung 13: Testprinzip des kompetitiven ELISAs zur Lactoferrinbestimmung

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die verwendeten Puffer sind im Anhang aufgeführt.

Auf Mikrotiterplatten (EIA plate 9018, Corning Coster, Cambridge, MA, USA), die mit Schafantikörpern gegen das Fc-Fragment des Kaninchen IgGs beschichtet sind (siehe Kapitel 2.1.3), wurden, um der Austrocknung der Platte vorzubeugen, 25 μ l Testpuffer II in jede Kavität vorgelegt. Im Anschluss wurden im Doppelansatz die verdünnten Milchproben und der Standard aus dem gereinigten caprinem Lf (0; 50,00; 16,66; 5,55; 1,85; 0,62; 0,21 ng cLf/ml) bzw. gekauften bovinen Lactoferrin (0; 150,00; 75,00; 37,50; 18,75; 9,38; 4,69 ng bLf/ml) und Kontrollen (Milchproben mit bekannter Lf-Konzentration) in einem Volumen von 50 μ l je Kavität aufgetragen. Danach folgte die Zugabe des Antiserums mit je 50 μ l/Kavität in den Verdünnungen 1:180.000 anti-bLf und 1:250.000 anti-cLf. Nach 1-stündiger Vorinkubation unter leichtem Schütteln wurde in jede Kavität 50 μ l Biotin-markiertes Lactoferrin (B-Lf) hinzugefügt (B-bLf: 1:16.000; B-cLf: 1:10.000). Diese Verdünnungen ergaben sich als optimal aus Vortests mit verschiedenen Biotin-markierten Lactoferrin

Verdünnungsstufen gegen verschiedene Antiserum-Verdünnungen bei aufgetragener Standardkurve. Nach 1 h Inkubation unter leichtem Schütteln wurde die Platte 3-mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 100 μ l Streptavidinperoxidase (Sigma) (200 ng/ml Testpuffer II) je Kavität beschickt. Nachdem die Platte 30 min im Dunkeln inkubiert hatte, erfolgte erneutes 5-maliges Waschen bevor als Substrat frisch angesetzte TMB-Lösung aufgetragen wurde. Die Extinktion ließ sich nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln und dem Abstoppen mit 50 μ l 1 M Oxalsäure je Kavität im Microplate-Reader (ELX 800, Bio-Tek Instruments, USA) ablesen. Als Messfilter wurden 450 nm gewählt. Als Software zur Bestimmung der Lactoferrinkonzentrationen diente MikroWin 3.0 mit der 4-Parameter-Methode. Eine schematische Darstellung des Testprinzips ist in Abbildung 13 zu sehen.

2.1.6 Validierung und Testcharakteristika

Zur Validierung der hier entwickelten Testsysteme wurden die Kriterien Parallelität, Wiederfindung und Präzision erfasst.

Zur Darstellung der **Parallelität** des zum Nachweis von bovinem Lactoferrin entwickelten Testes sind in Abb. 14 die Verläufe von Standardkurve und von Verdünnungsreihen aus Rindermilch verschiedener Tiere aufgezeigt. Die Verdünnungsreihen reichen von 0,39 bis 200 nl Rindermilch je Kavität.

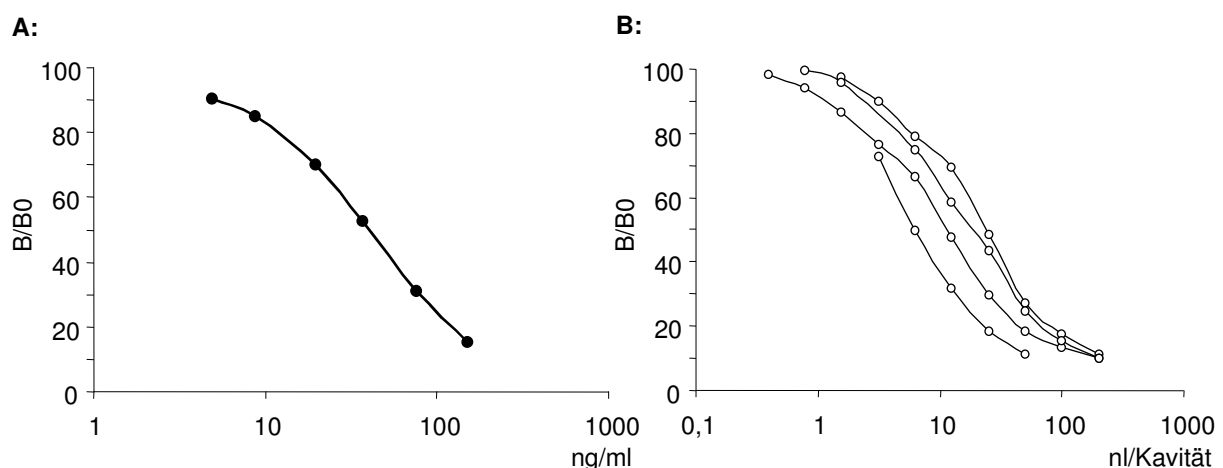


Abbildung 14: Standardkurve des bovinen Lactoferrins (A) und Verdünnungsreihen aus Rindermilch (B) zur Darstellung der Parallelität

Die Milch von Rindern oder Ziegen wurde wie die zu messenden Proben in Testpuffer II verdünnt.

Das caprine Lactoferrin zeigt den in Abb. 15 dargestellten Verlauf der Standardkurve. Auch hier werden Verdünnungsreihen von Ziegenmilch dargestellt. Die Ziegenmilchverdünnungen reichen von 0,05 bis 12,5 nl pro Kavität.

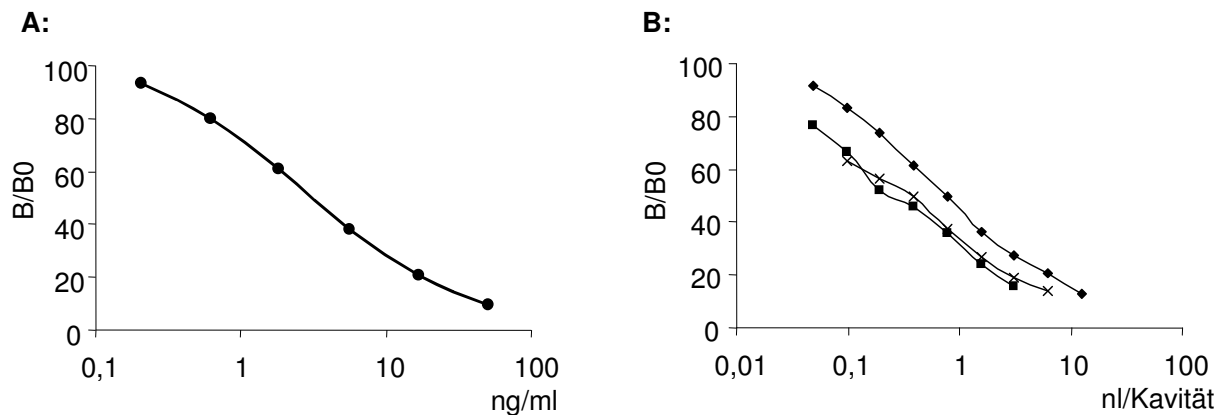


Abbildung 15: Standardkurve des caprinen Lactoferrins (A) und Verdünnungsreihen aus Ziegenmilch (B) zur Darstellung der Parallelität

Im Verlauf der Verdünnungsreihen sind sowohl bei dem Testsystem für die Ziege wie auch für das Rind keine Abweichungen vom Verlauf der Standardkurve ersichtlich. Dies wird dadurch bestätigt, dass die Regression zwischen eingesetzten Volumina und Lf-Konzentrationen der Verdünnungen einzelner Milchproben keine Signifikanzen aufwies.

Für die Enzymimmuntests bedeutet das, dass im geprüften Volumenbereich die Lactoferrinkonzentrationen in der Rinder- und Ziegenmilch unabhängig vom eingesetzten Volumen bestimmt werden können.

Um die **Wiederfindung** in den Tests zu bestimmen wurden Milchproben ohne und mit Zugabe definierter Mengen Lactoferrin gemessen. Aus der Differenz beider Messwerte wurde die Wiederfindungsrate berechnet. Tabelle 1 stellt die Ergebnisse dar. Im Mittel lag die Wiederfindung des Lactoferrins für die Ziege bei $106,4 \pm 7,9 \%$ und für das Rind bei $101,2 \pm 12,1 \%$.

Tabelle 1: Prozentuale Wiederfindung von zugefügtem Lactoferrin (Lf) in Proben bekannten Lactoferringehaltes

Spezies	Lf-Gehalt Probe (ng/ml)	zugefügtes Lf (ng/ml)	gemessenes Lf (ng/ml)	Wiederfindung (%)
Ziege	9,35	28,0	37,25	99,6
	19,41	28,0	48,72	104,7
	36,00	28,0	66,52	109,0
	6,14	33,6	46,76	120,9
	17,46	33,6	52,66	104,8
	56,73	33,6	90,13	99,4
Rind	8,74	5,56	15,35	119,1
	19,43	5,56	25,24	104,6
	21,33	5,56	25,83	81,1
	9,34	16,67	26,00	100,0
	17,87	16,67	34,72	101,1
	18,04	16,67	34,90	101,7

Um die **Präzision** des Testes aufzuzeigen wurden die Variationskoeffizienten des Intra- und Interassays bestimmt. Der Intraassay zeigt die Variation einer Probe, die mehrmals auf einer Mikrotiterplatte gemessen wird. Der Interassay gibt Aufschluss über die Reproduzierbarkeit des Wertes einer Probe, wenn sie auf verschiedenen Platten gemessen wird.

Der Interassay-Variationskoeffizient beträgt beim Rind 3,9 % (n = 21) und bei der Ziege 4,1 % (n = 27). Der Variationskoeffizient des Interassays beträgt bei den hier entwickelten Tests beim Rind 7,5 % (n = 20) und bei der Ziege 9,3 % (n = 20).

Die **untere Nachweisgrenze** des enzymimmunologischen Testes ist definiert als der kleinste vom Nullstandard unterscheidbare Wert. Er wird ermittelt aus dem Mittelwert (n = 10) des Nullstandards plus zwei Standardabweichungen. Beim Rind und bei der Ziege sind folgende Konzentrationen ermittelt worden, bLf 4,9 ng/ml und cLf 0,2 ng/ml. Die Unterschiede zwischen den Tierarten ergeben sich aus dem jeweiligen Testsystem. Eine Verschiebung der unteren Nachweisgrenze zum Nachweis des bovinen Lactoferrins nach unten war nicht weiter erforderlich, da im verwendeten Untersuchungsmedium Milch der Gehalt an Lactoferrin immer in höherer Konzentration vorliegt.

2.1.7 Schlussbetrachtung zur Testentwicklung

Die Entwicklung von Testsystemen zur Messung von Lactoferrin in der Milch von Ziegen und Kühen konnten erfolgreich abgeschlossen werden.

Wie bei CHEN et al. (2004) beruht auch der hier entwickelte Enzymimmunoassay zur Messung des nativen caprine Lactoferrins auf einem kompetitiven Prinzip. Ebenso benutzten sie das selbst aus Kolostrum gereinigte native Ziegenlactoferrin als Standard.

Außer zur Standardkurve und Parallelität werden von ihnen keine weiteren Aussagen über andere Parameter zur Validierung des ELISAs zur Detektion von caprinem Lf gemacht.

2.1.8 Aufbereitung der Proben

Da Milch eine Flüssigkeit mit teilweise inhomogener Konsistenz, vor allem nach dem Auftauen gefrorener Vollmilchproben, ist, wurden Messergebnisse von entfetteter Milch und von Vollmilch verglichen. Zu diesem Zweck wurde eine zufällige Auswahl von Rindermilchproben als Vollmilchproben auf ihren Lactoferringehalt hin untersucht und parallel dazu nach dem Entfetten der Milch in der Magermilch. Zum Entfetten wurden die bei 4 °C gekühlten Proben aufgeschüttelt und in Aufbewahrungsröhrchen für 6 min bei 4.000 g zentrifugiert. Die obere Fettschicht wurde mit der Pipette durchstoßen, daraufhin konnte direkt im Anschluss die Magermilch pipettiert werden.

Der Zusammenhang zwischen den Lf-Messwerten in Vollmilch und Magermilch wurde statistisch mit SPSS/PC 10.0 überprüft. Alle nachfolgenden Auswertungen von Daten wurden mit dem gleichen Programm analysiert.

Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung überprüft. Da diese nicht signifikant abgesichert war wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman, d. h. mit Hilfe eines nicht-parametrischen Testverfahrens ermittelt. Die Korrelation zwischen der Messung von Vollmilch und entfetteter Milch des Rindes beträgt hierbei $r = 0,94$ bei 34 gemessenen Proben ($p < 0,01$). Das Streudiagramm ist mit der ermittelten Regressionsgerade bzw. –gleichung in Abb. 16 dargestellt. Die Absolutwerte stimmten weitgehend überein.

Nach dem vorliegenden Ergebnis konnte Rindermilch sowohl als Vollmilch als auch als entfettete Milch auf Lactoferrin getestet werden.

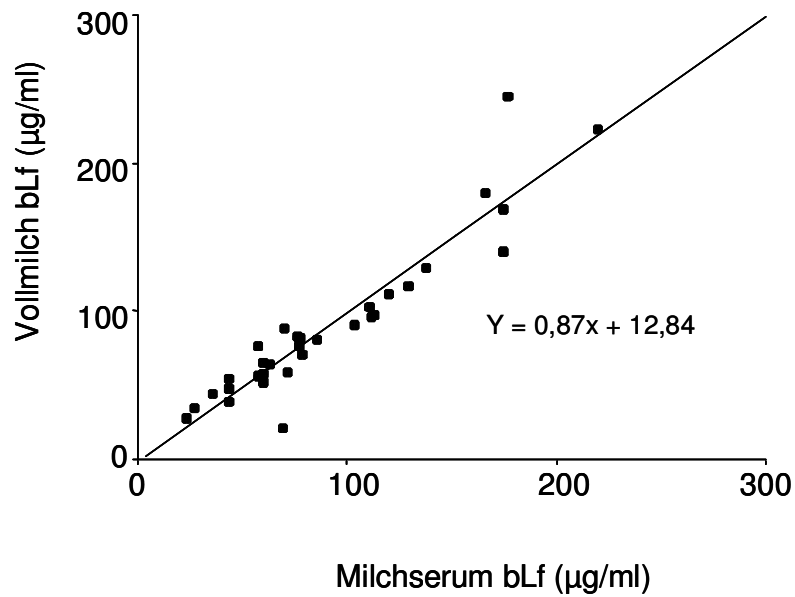


Abbildung 16: Lactoferrinbestimmung (µg/ml) in 34 Rinder-Vollmilch- und ent fetteten Rindermilchproben

Zur Untersuchung von Ziegenmilch war dies nicht relevant, weil die Proben alle in Vollmilch auf ihren Lactoferringehalt untersucht wurden. Hier waren nach dem Auftauen bei zügiger Weiterverarbeitung keine Probleme bei der Handhabung zu beobachten.

2.2 IGFBP-2

Das Bindungsprotein-2 der Insulinartigen Wachstumsfaktoren (IGFBP-2) wurde bisher außer im Serum auch in einer Vielzahl von biologischen Geweben und Körperflüssigkeiten entdeckt. Unter anderem konnte es in humaner (DONOVAN et al., 1991a), boviner (SKAAR et al., 1991), porciner (DONOVAN et al., 1994) und der Milch der Ratte (DONOVAN et al., 1991b) nachgewiesen werden. Die exakten Aufgaben dort sind jedoch noch nicht klar erforscht.

Zum quantitativen Nachweis der Bindungsproteine der IGFs werden verschiedene Verfahren wie der Western Liganden Blot, der Western Immunoblot, der Radioimmunoassay (RIA), der immunradiometrische Assay (IRMA) (RAJARAM et al., 1997) und der Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (DIAMANDI et al., 2000) angewendet.

Der Western Liganden Blot ist jedoch eher zur Charakterisierung der Proteine geeignet als zu ihrer Quantifizierung, da der Transfer während des ElektrobloTTings nicht immer komplett stattfindet und auch zwischen den Bindungsproteinen (ROSENFELD et al., 1989) variiert. Der Western Immunoblot hat sich eher zur Untersuchung von Proteasen der IGFBPs als geeignet erwiesen (RAJARAM et al., 1997). Zur genauen Ermittlung von Gehalten verschiedener IGFBPs hat sich der Radioimmunoassay als sehr erfolgreich gezeigt. Im Gegensatz zum RIA ist der IRMA spezifischer, ermittelt jedoch oft geringere Werte als tatsächlich vorliegen in Folge von Degradierungs-Prozessen während der Lagerung oder den Experiment-Bedingungen (RAJARAM et al., 1997). Der ELISA hat den Vorteil, dass er ebenfalls schnell in der Durchführung ist und hohe Probenmengen verarbeiten kann, aber im Gegensatz zum RIA nicht mit radioaktiven Reagenzien gearbeitet wird. So ist die Handhabung einfacher.

Die Detektion von IGFBP-2 in Kuh- und Ziegenmilch mit Hilfe eines ELISAs ist bisher noch nicht dokumentiert.

Da im Handel kein nicht-radioaktives Testsystem zur Messung des Bindungsproteins-2 des Insulinartigen-Wachstumsfaktors (IGFBP-2) in der Milch vorhanden ist, musste ein solches erst entwickelt werden. Wie auch zur Messung von Lactoferrin wurde ein kompetitiver Enzymimmuntest entwickelt (siehe Abb. 13 in Kapitel 2.1.5).

Rekombinantes bovines IGFBP-2 (rbIGFBP-2) wurde von der Firma GroPrep (Adelaide, Australien) bezogen. Dieses wurde dann zur Herstellung von Tracer und zur Produktion von Antiseren verwendet, welche in der benötigten Form nicht im Handel erhältlich sind.

2.2.1 Herstellung von Antiseren

Das lyophilisierte bovine IGFBP-2 wurde in 10 mM HCl gelöst und vor der weiteren Verwendung mit PBS neutralisiert. Zur Immunisierung wurde 2 Kaninchen eine Emulsion aus dem gelösten IGFBP-2 und Freund's Adjuvant Complete (Sigma) am Rücken subkutan verteilt auf mehrere Stellen injiziert. Die Anfangsdosis betrug hierbei 100 µg rbIGFBP-2 pro Kaninchen. Eine Auffrischung erfolgte nach einem Monat mit einer Emulsion aus 52 µg gelösten IGFBP-2 und Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma) pro Kaninchen in gleicher Art und Weise.

Nachdem auf der Mikrotiterplatte pro Vertiefung 25 µl Testpuffer II, in dem 250 ng IGF-II pro ml gelöst war, vorgelegt wurden, wurde die Titerbestimmung, wie schon in Kapitel 2.1.3 beschrieben, durchgeführt. Ein Vorversuch hatte gezeigt, dass Unterschiede in der Antikörperbindung zwischen freiem IGFBP-2 und an IGF-II gebundenem Bindungsprotein-2 bestehen. Um diesen Effekt auszuschalten wurde IGF-II in der ermittelten Konzentration vorgelegt.

Zur Kontrolle wurde ein Serum eines nicht immunisierten Kaninchens in gleicher Verdünnung wie das Antiserum aufgetragen. Dieses Serum erreichte eine Extinktion von 0,14. Beide Kaninchen (Nr. 50 und 51) entwickelten einen guten Titer gegen das rbIGFBP-2 im Blut, allerdings musste das zweite Tier (Nr. 51) auf Grund einer Erkrankung frühzeitig geschlachtet werden, so dass nur Kaninchen 50 Einsatz für die Testentwicklung fand. Die ersten drei Blutungen des Kaninchens 50 erfolgten in wöchentlichem Abstand. Die letzte dargestellte Blutung war die Schlachtung 4 Monate nach der letzten durchgeführten Blutung (Abb. 17).

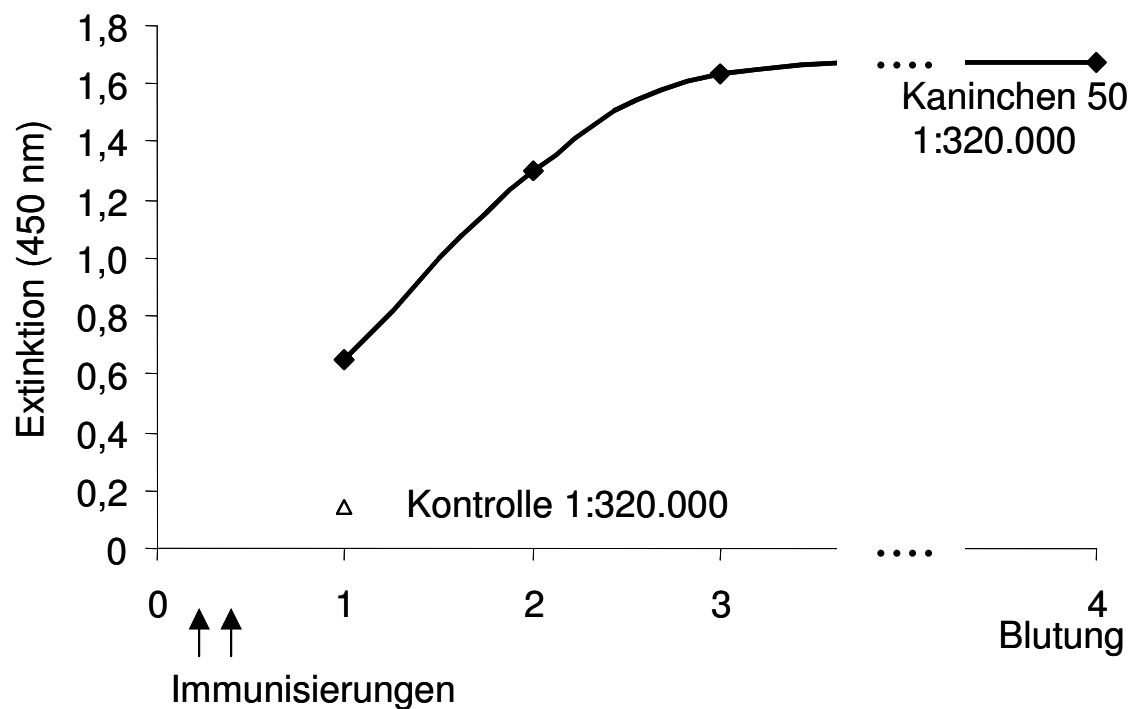


Abbildung 17: Titerentwicklung im Serum des mit rIGFBP-2 immunisierten Kaninchens

Das Testsystem wurde auf die Ermittlung von IGFBP-2 in der Milch von Kuh und Ziege getestet. Die untersuchten Testcharakteristika wie die Wiederfindung von zugefügtem IGFBP-2 wie auch die Parallelität von Verdünnungsreihen aus der Milch von Kuh und Ziege zeigen, dass mit Hilfe des hergestellten Antiserums in diesem Testsystem sowohl das bovine wie auch das caprine IGFBP-2 in der Milch der jeweiligen Spezies nachgewiesen werden kann. Die Darstellung der Testcharakteristika erfolgt detailliert für Kuh und Ziege in Kapitel 2.2.5.

Zum quantitativen Nachweis im entwickelten Testsystem (Kapitel 2.2.3) wurde das Antiserum des Kaninchens 50 bei der Ermittlung des IGFBP-2 in der Rindermilch und bei der Untersuchung der Ziegenmilch auf IGFBP-2 in der Verdünnung 1:200.000 eingesetzt.

2.2.2 Spezifität der Antiseren

Um die Spezifität des Antiserums nachzuweisen reichte die Sensitivität über eine DAB-Färbung beim Western Blot nicht aus. Um diese zu erhöhen wurde die Detektion der Banden mit Hilfe von Chemilumineszenz durchgeführt. Wie schon in Kapitel 2.1.4 für Lactoferrin beschrieben, wurde eine SDS-Polyacrylamid-

gelelektrophorese durchgeführt; die derart aufgetrennten Proteine wurden dann mittels des Wetblotting-Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde im Anschluss daran 1 h mit 5-%iger BSA-Lösung abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem aus dem Kaninchen 50 gewonnenen Antiserum bei einer Verdünnung von 1:5.000 in 1-%iger BSA-Lösung bei 4°C über Nacht. Nach anschließendem 2-maligen Waschen der Membran mit der 1-%igen BSA-Lösung erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln mit 1:10.000 in 1-%iger BSA-Lösung verdünntem peroxidase-markiertem Antikörper gegen Kaninchen IgG (Monoclonal Anti-Rabbit IgG, γ -chain specific, Sigma). Nachdem die Membran 3-mal mit Waschpuffer aus 10 % PBS und 0,05 % Tween 20 (Roth) gespült wurde, erfolgte die Detektion der markierten Banden. Entsprechend den Herstellerangaben wird der Blot mit der ECL-Lösung (Amersham, Freiburg) inkubiert und anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt. Das am zweiten Antikörper fixierte Enzym erzeugt durch Substrat-Umsatz Chemilumineszenz, die zur Schwärzung des Röntgenfilms führt.



- 1: Ziegenserum
- 2: Ziegenkolostrum
- 3: Rinderserum
- 4: rbIGFBP-2

Abbildung 18: Western Blot zur Detektion der IGFBP-2-Banden in Ziegenserum, und -milch sowie in Rinderserum.

Hier ließen sich in Ziegenkolostrum Banden, die denen des IGFBP-2 in der Größe von 31 - 36 kDa (RAJARAM et al., 1997) entsprechen, erkennen (Abb. 18). Im Rinderserum ließen sich die entsprechenden Banden nur als Schatten darstellen.

2.2.3 Markierung des IGFBP-2

Zur Herstellung eines Tracers wurden für den Test 40 µg rblIGFBP-2 mit einem 50-fachen molaren Überschuss von Biotinamidocaproat-N-hydroxysuccinimidester (Sigma) markiert. Das Verfahren entspricht der Markierung des Lactoferrins wie in Kapitel 2.1.2 dargestellt.

Nach der Abtrennung des markierten IGFBP-2 von freiem Biotin über eine PD-10 Säule (Amersham Pharmacia Biotech) wurden die IGFBP-2-haltigen Fraktionen vereinigt, mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Um die IGFBP-2-haltigen Fraktionen zu gewinnen wurden erst auf Grund der Ausschlussgrenze der Säule von 5 kDa und des Ausschlussvolumens von 2,5 ml die ersten 2,5 ml im Durchlauf verworfen. Das folgende Eluat wurde in 500 µl großen Fraktionen gesammelt und mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt. Die Tracerhaltigen Fraktionen wurden mit Hilfe des spezifischen Antiserums auf einer Mikrotiterplatte identifiziert. Zu diesem Zweck wurde das Antiserum jeweils in den Verdünnungen von 1:1.000 bis 1:729.000 in Testpuffer II mit 100 µl pro Kavität auf die mit Schafantikörpern gegen das Fc-Fragment des Kaninchen-IgGs (institutseigene Herstellung, Kapitel 2.1.3) vorbeschichteten Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Fraktionen 1 bis 6 in der Verdünnung 1:1000 in Testpuffer II mit je 50 µl je Vertiefung hinzugefügt. Nach 1 h Inkubation unter gleichen Bedingungen wurde die Antiserum-Tracer-Mischung von der Mikrotiterplatte dekantiert und anschließend wurde das gebundene mit Biotin markierte IGFBP-2 über eine Enzym-Substrat-Reaktion wie beim späteren ELISA sichtbar gemacht (Kapitel 2.2.4).

2.2.4 Durchführung des ELISAs

Das Testprinzip des entwickelten Enzymimmunoassay entspricht der Abbildung 13 in Kapitel 2.1.5. Für die Spezies Rind sowie Ziege ist die Durchführung des Testes identisch.

Auf Mikrotiterplatten, die mit Schafantikörpern gegen das Fc-Fragment des Kaninchen IgGs beschichtet waren (siehe Kapitel 2.1.3) wurden 25 µl Testpuffer II, dem je 250

ng IGF-II pro ml Testpuffer II zugefügt waren, in jede Kavität vorgelegt. Ein Vorversuch hatte gezeigt, dass die Konzentration von 250 ng IGF-II pro ml Testpuffer II ausreicht, um Effekte, die aus der unterschiedlichen Antikörperbindung von freiem IGFBP-2 und an IGF-II gebundenem Bindungsprotein-2 resultieren, auszuschalten. Im Anschluss wurden im Doppelansatz die in Testpuffer II verdünnten Milchproben und als Standard rekombinantes bovines IGFBP-2 in einer Verdünnungsreihe (0,2; 0,6; 1,9; 5,6; 16,7; 50,0 und 150 ng/ml) jeweils in einem Volumen von 50 µl je Kavität aufgetragen. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe des Antiserums mit je 50 µl/Kavität in der Konzentration 1:200.000. Die Mikrotiterplatte wurde zur Inkubation über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer gelagert. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe des Biotin-markierten rbIGFBP-2 in einer Konzentration von 1:1.000 mit je 50 µl pro Vertiefung. Nach 4 h Inkubation unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Platte 3-mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 100 µl Streptavidinperoxidase (200 ng/ml Testpuffer II) je Kavität beschickt. Nachdem die Platte 30 min im Dunkeln inkubiert hatte, erfolgte erneutes 5-maliges Waschen, bevor als Substrat frisch angesetzte TMB-Lösung aufgetragen wurde. Die Extinktion ließ sich nach 45-min Inkubation im Dunkeln und dem Abstoppen mit je 50 µl 1M Oxalsäure je Vertiefung im Microplate-Reader (ELX 800, Bio-Tek Instruments, USA) ablesen. Als Meßfilter wurden 450 nm gewählt. Als Software zur Bestimmung der IGFBP-2-Konzentrationen diente MikroWin 3.0 mit der 4-Parameter-Methode.

2.2.5 Validierung und Testcharakteristika

Der Test wurde für die Anwendung in der Milch von Rindern und Ziegen separat validiert.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen sollte Aufschluss darüber geben, wie groß die Übereinstimmung des caprinen und bovinen IGFBP-2 ist. Da jedoch keine vollständige Sequenz für das caprine IGFBP-2 vorliegt, wurde das Schaf (DELHANTY & HAN, 1992) als der Ziege relativ ähnliche Spezies herangezogen. Bei einem Vergleich über die BLAST 2-Datenbank (Version BLASTP 2.2.6) ergibt sich eine Übereinstimmung von 90 % mit der Proteinsequenz der Kuh (BOURNER et al., 1992).

Die Milch von Rindern bzw. Ziegen wurde jeweils wie die zu messenden Proben in Testpuffer II verdünnt.

In Abb. 19 sind die Verläufe der Standardkurve und Verdünnungsreihen aus Rindermilch sowie Ziegenmilch verschiedener Individuen zur Darstellung der **Parallelität** aufgezeigt. Die Verdünnungen der Milchproben reichen von 0,08 bis 25 μl Rindermilch und von 0,20 bis 50 μl Ziegenmilch je Kavität. Der Verlauf der Milchverdünnungen zeigt keine Abweichungen zur Standardkurve aus rekombinanten bovinen IGFBP-2.

Dies wird dadurch bestätigt, dass die Regression zwischen eingesetzten Volumina und IGFBP-2-Konzentrationen der Verdünnungen einzelner Milchproben keine Signifikanzen aufwiesen.

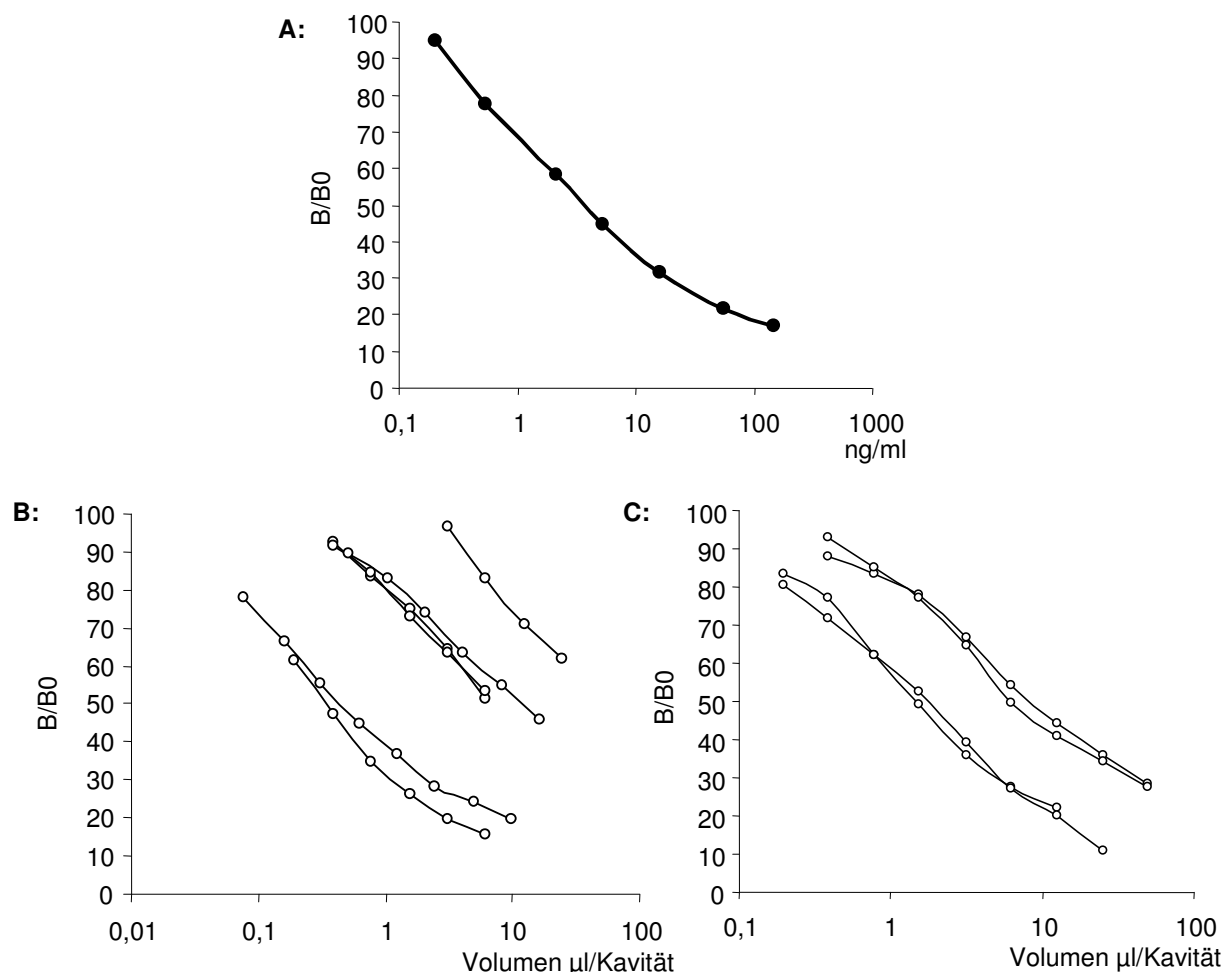


Abbildung 19: Standardkurve aus rekombinanten bovinen IGFBP-2 (A) und Verdünnungsreihen aus Rindermilch (B) und Ziegenmilch (C) zur Darstellung der Parallelität

Die prozentuale **Wiederfindung** des rekombinanten bovinen IGFBP-2 in der Milch von Rind und Ziege ergibt sich aus der Differenz der Messwerte der Milchprobe mit und ohne Zugabe einer definierten Menge rbIGFBP-2. Tabelle 2 stellt die Ergebnisse dar. Beim Rind lag die Wiederfindungsrate im Mittel bei $109,5 \pm 14,6$ % und für die Ziege bei $108,0 \pm 16,9$ %.

Tabelle 2: Prozentuale Wiederfindung von zugefügtem rbIGFBP-2 in Proben bekannten IGFBP-2-Gehaltes

Spezies	IGFBP-2-Gehalt Probe (ng/ml)	zugefügtes IGFBP-2 (ng/ml)	gemessenes IGFBP-2 (ng/ml)	Wiederfindung (%)
Rind	2,33	25,0	31,09	115,0
	2,21	25,0	33,86	126,6
	3,98	30,0	29,52	85,1
	1,34	30,0	35,04	112,3
	28,98	90,0	119,51	100,6
	27,41	90,0	132,91	117,2
Ziege	8,59	8,33	18,00	113,0
	6,17	8,33	15,69	114,4
	13,31	12,5	24,29	87,9
	1,84	12,5	12,70	86,9
	8,59	25,0	40,90	129,2
	6,17	25,0	35,37	116,8

Durch das wiederholte Messen einer Probe auf einer bzw. auf verschiedenen Platten wurde die **Präzision** des Testes aufgezeigt. Beim Rind ergab sich durch mehrfaches Messen einer Rindermilchprobe auf einer Platte ein Intraassay-Variationskoeffizient von 6,1 % ($n = 7$). Beim wiederholten Messen einer Ziegenmilchprobe betrug der Koeffizient 3,5 % ($n = 4$).

Eine Milchprobe eines Rindes, die auf 20 verschiedenen Platten gemessen wurde, ergab einen Interassay-Variationskoeffizient von 7,7 %. Bei der Ziege ergab die Messung einer Milchprobe auf 20 verschiedenen Platten einen Koeffizienten von 6,2 %.

Die **untere Nachweisgrenze** des Tests wird definiert als der kleinste von 0 unterscheidbare Wert und wird als Mittelwert aus der Bestimmung des Nullstandards plus zwei Standardabweichungen berechnet. Bei der Ermittlung des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch von Rindern und Ziegen ergab sich eine untere Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml.

2.2.6 Schlussbetrachtung zur Testentwicklung

Die Entwicklung eines nicht-radioaktiven Testsystems zur Messung von IGFBP-2 in der Milch von Ziegen und Kühen konnte erfolgreich abgeschlossen werden. So wurde die Voraussetzung geschaffen, um eine große Anzahl an Milchproben auf ihren quantitativen Gehalt des Bindungsproteins zu untersuchen.

2.2.7 Aufbereitung der Proben

Da es Probleme bei der weiteren Verarbeitung der aufgetauten Kuhmilchproben auf Grund deren Konsistenz gab, wurde für die Bestimmung des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch, wie schon in Kapitel 2.1.8 für das Lactoferrin beschrieben, getestet, ob die Messungen in entfetteter Milch mit denen in Vollmilch vergleichbar sind. Zu diesem Zweck wurde von 27 zufällig ausgewählten Rindermilchproben einmal der Gehalt an IGFBP-2 in der Vollmilch und daraufhin von der gleichen Probe in Magermilch gemessen.

Die Daten sind nach dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests signifikant auf Normalverteilung abgesichert und wurden nach Pearson auf ihre Korrelation getestet. Diese beträgt zwischen der Messung von Vollmilch und entfetteter Milch des Rindes $r = 0,85$. Das Ergebnis ließ sich auf dem Niveau von $p < 0,01$ absichern.

Da eine hohe Korrelation zwischen den beiden Milchkonsistenzen bestand, die Magermilch jedoch besser in der Handhabung war, wurden alle Messungen des IGFBP-2-Gehaltes der Rindermilch im Rahmen dieser Arbeit in der entfetteten Milch vorgenommen.

Das Streudiagramm ist mit Regressionsgerade in Abb. 20 dargestellt. Die Absolutwerte der zentrifugierten entfetteten Proben sind alle geringfügig (etwa 2 ng/ml) niedriger als die der Vollmilchproben, wobei zwei Messungen nach unten ausreißen.

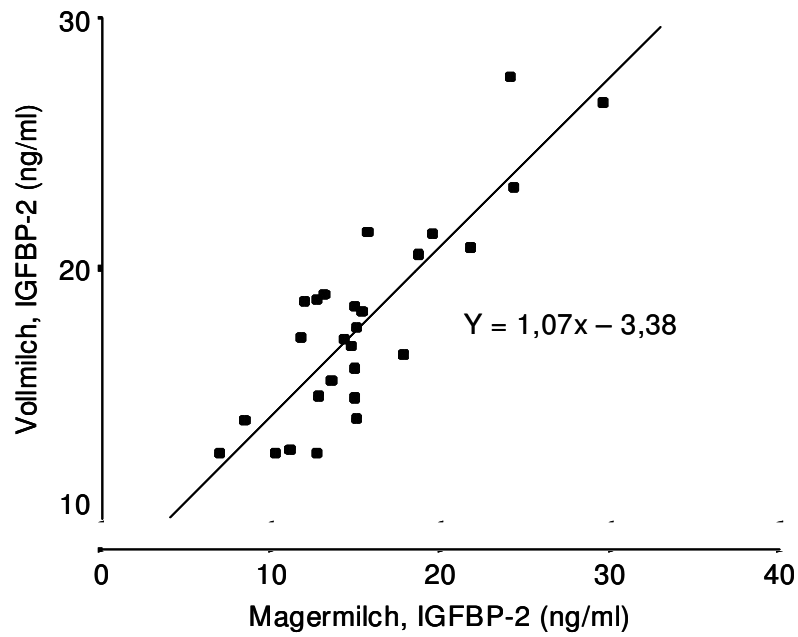


Abbildung 20: IGFBP-2-Bestimmung (ng/ml) in 27 Rinder-Vollmilch- und entfetteten Rindermilch-Proben

Für Ziegenmilch ergab sich kein Problem bei der Handhabung, so dass hier die IGFBP-2-Werte aus der Vollmilch ermittelt wurden.

3 Untersuchungen zum Lactoferrin und IGFBP-2 in der Milch von Kühen und Ziegen

3.1 Material und Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Zusammensetzung von Kuh- und Ziegenmilch gemacht. Zu diesem Zweck konnten Milchproben der Milchkuhherden sowie der Ziegenmilchherde von dem der Landwirtschaftskammer Rheinland angegliederten Lehr- und Versuchsgut Haus Riswick gezogen werden.

3.1.1 Einordnung der Milchkühe in verschiedene Gruppen sowie Probennahmedesign und Bestimmung der Milchinhaltsstoffe

Der Kuhbestand des Versuchsgutes Haus Riswick bietet eine homogene Zusammensetzung von schwarz- und rotbunten Kühen der Rasse Deutsche Holstein. Die Kühe werden in drei Liegeboxen-Laufställen mit unterschiedlichen Stalleinrichtungen und Melktechniken gehalten.

Milchviehstall 1 ist ein 3-reihiger Boxenlaufstall mit Spaltenboden und Zirkulationssystem. Gemolken wird in einem 2 x 5 Fischgräten-Melkstand (DeLaval). Die Fütterung erfolgt über Mischwagen am Fressgitter.

Milchviehstall 2 ist ein 4-reihiger Boxenlaufstall, der für Fütterungsversuche eingerichtet ist. Der Stall ist mit Spaltenboden ausgestattet. Die Kühe werden in zwei Gruppen getrennt gehalten und gemolken. Die Kühe auf der einen Stallseite werden in einem 14-er Melkkarussell (Westfalia Separator) und die Kühe der anderen Stallseite mit einem Automatischen Melksystem (AMS) (Einboxenanlage „Merlin“, Lemmer Fullwood) gemolken. Die Fütterung mit einer totalen Mischration (TMR) erfolgt über Mischwagen in elektronische Wiegetröge, die die Grundfutteraufnahme jeder Kuh individuell ermitteln.

Milchviehstall 3 ist ebenfalls ein Boxenlaufstall. Er dient im Wesentlichen zu Testzwecken für verschiedene Liegeboxenvarianten und unterschiedliche Entmistungsverfahren. Die Fütterung des Grundfutters erfolgt am Fressgitter. Die Kühe werden ebenfalls im o. g. Melkkarussell gemolken.

In Zusammenarbeit mit den Abteilungen Haustiergenetik und Tierernährung des Institutes für Tierwissenschaften der Universität Bonn sowie der tatkräftigen Unterstützung der Mitarbeiter des Versuchsgutes wurde eine regelmäßige

Probennahme innerhalb der verschiedenen Herden gewährleistet. Im Rahmen eines Melkautomatenversuches der Abteilung Haustiergenetik und Untersuchungen der Abteilung für Tierernährung zu verschiedenen Grundfuttermitteln standen 226 Tiere mit kontinuierlicher Abkalbung zur Verfügung (WIRTZ, 2003). Die Tiere wurden in mehrere Versuchsgruppen eingeteilt. Da eine leistungsgerechte Fütterung gesichert war konnte ausgeschlossen werden, dass die Zusammensetzung der Basisration das Vorkommen der beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine in der Milch beeinflusst. So konnten die Milchproben unabhängig von dem Fütterungsversuch gezogen und untersucht werden. Auch ein Einfluss des Melksystems ist bei den untersuchten Proteinen nicht zu erwarten gewesen.

Die **Fütterung** aller Kühe erfolgte unter Zugrundelegung der Empfehlungen der GfE (1991 und 1995) und der DLG (1986, 1997 und 1998). Als Leistungskraftfutter wurde eine Mischung eingesetzt, die je kg 6,7 MJ NEL und 160 g nXP enthielt. Die jeweilige leistungsgerechte Kraftfütterzuteilung der Kühe wird über Abrufstationen in den Ställen sichergestellt bzw. wird je nach Versuchsfrage darüber geregelt. Die erforderlichen Analysen der Futterproben wurden durch die Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFA) Bonn durchgeführt.

Die Tiere wurden wie folgt für die Untersuchungen in die unterschiedlichen Gruppen eingeteilt. Die Art und Weise der Probennahme ist anschließend erläutert und in Abbildung 21 graphisch dargestellt:

- **Gruppe I** (Milchviehstall 2) umfasst 104 Tiere. 52 der Tiere wurden im Melkkarussell gemolken und 52 Tiere im Melkautomaten. Die Einteilung der Kühe in diese zwei Melkgruppen erfolgte nach der eigenen Leistung oder der Vorleistung der Muttertiere, um zwei gleichwertige homogene Gruppen von Tieren zu erhalten. Von diesen Tieren wurde wöchentlich eine Milchprobe gezogen. Kühe, die aus unterschiedlichen Gründen für den Versuch nicht mehr zur Verfügung stehen konnten, wurden durch Färsen ersetzt.
- **Gruppe II** (Milchviehstall 3) umfasst 40 Tiere, die ebenfalls im Melkkarussell gemolken wurden. Diese Gruppe wurde 14-tägig beprobt.

- **Gruppe III** (Milchviehstall 1) umfasst 82 Tiere. Diese Gruppe wurde im 2 x 5 Fischgräten-Melkstand mit automatischer Abnahme gemolken. Die Probenahme erfolgte nur im Rahmen der Milchleistungsprüfung (MLP) alle 4 Wochen.

Die **Durchführung der Milchmengenmessung** erfolgte im Dreh- und Fischgrätmelkstand mit dem Messgerät Metatron der Firma Westfalia und wurde mit Hilfe des Softwareprogramms „Dairyplan DP 5“ (Firma Westfalia) erfasst und gespeichert. Die Milchmengen der automatisch gemolkenen Kühe wurden für jedes Versuchstier und jede Melkung über ein automatisches Durchflussmessgerät (Firma Fullwood) und mit Hilfe des Softwareprogramms „Crystal“ (Firma Fullwood) erfasst und gespeichert. Die Tiere wurden jeweils über Transponder erkannt. Die Milchmengenmessung erfüllt die Anforderungen zur Messgenauigkeit der ADR (1994) und wurde in regelmäßigen Abständen überprüft.

Zur **Bestimmung der Milchinhaltstoffe** wurde bei allen Versuchstieren im Abstand von 4 Wochen die **offizielle Milchleistungsprüfung (MLP)** des Landeskontrollverbandes Rheinland (LKV) durchgeführt. Sie erfolgte im Melkkarussell und im Fischgräten-Melkstand nach der A4-Methode der ADR-Richtlinien für Milchleistungsprüfungen (ADR, 1994).

Dieses Prüfverfahren bezieht sich auf Herden, die zweimal täglich gemolken werden. An einem Stichtag, der sich im Abstand von vier Wochen wiederholt, wird die Leistung je Kuh innerhalb von 24 h ermittelt. Zur Bestimmung der Inhaltsstoffe der Milch (mindestens Fett- und Eiweißgehalt) wird durch einen Prüfer für jede Kuh von jedem Gemelk eine repräsentative Probe gezogen.

Beim Melkautomaten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden Proben von allen Gemelken gezogen.

Die Proben eines Tages werden jeweils zu einer Mischprobe je Tier zusammengeführt. In einem Untersuchungslabor wird dann jede Probe bezüglich ihrer Inhaltsstoffe analysiert. Unter Einbeziehung der jeweiligen Milchmenge eines Gemelkes (gewichtetes arithmetisches Mittel) wurden angelehnt an die A4-Standard-Methode die durchschnittlichen Inhaltsstoffe für jede Kuh berechnet.

Ein Teil der Tiere wurde zusätzlich zur offiziellen Milchleistungsprüfung über eine **weitere 4-wöchige Kontrolle** beprobt, die so angelegt wurde, dass von diesen Versuchstieren alle 2 Wochen eine Milchprobe vorlag. Im Gegensatz zur MLP

wurden jedoch bei dieser zusätzlichen Milchkontrolle das Abend- und das Morgengemelk jeder Kuh separat vom LKV auf die Inhaltsstoffe analysiert. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Milchmenge eines Gemelkes wurden die durchschnittlichen Inhaltsstoffe jeder Kuh am Melkkarussell berechnet. Am Melkautomaten erfolgte diese ergänzende Kontrolle genau so wie an den Tagen der offiziellen Kontrolle.

Zusätzlich wurde bei der Gruppe I ergänzend zu den 2-wöchentlich stattfindenden Milchkontrollen **Zwischenbeprobungen** eingeführt, um die Eutergesundheit jeder Kuh besser kontrollieren zu können. Diese Zwischenbeprobungen fanden in den Wochen statt, in denen weder eine offizielle MLP noch eine ergänzende 4-wöchentliche Kontrolle durchgeführt wurde. So wurde für diese Gruppe ein 7-tägiger Kontrollabstand erreicht. Am Melkkarussell erfolgte dieses Zwischenbeprobung als alternierende Kontrolle, am Melkautomaten wurde von jeder Kuh eine Probe je Kontrolltag gezogen.

In Abbildung 21 ist der Aufbau der Kontrollen und Gruppen schematisch dargestellt.

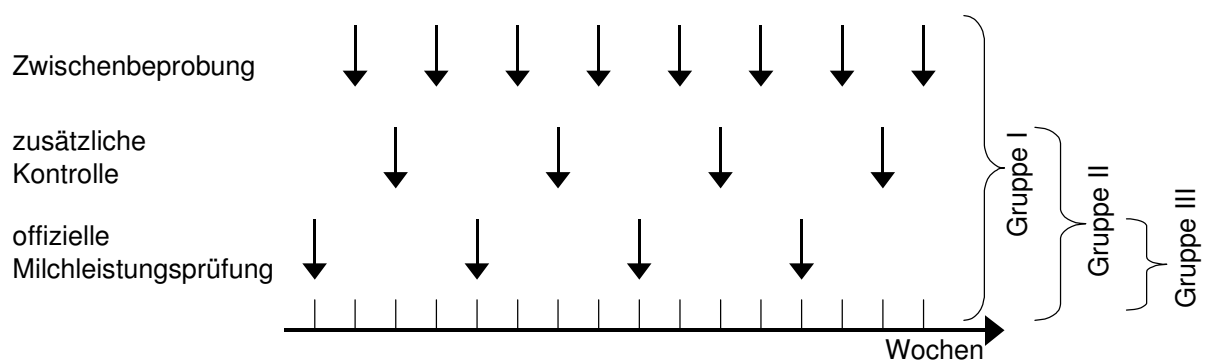


Abbildung 21: Milchprobenentnahme der einzelnen Gruppen

Da zwischenzeitlich die Maßnahmen, die einer Übertragung der Maul- und Klauenseuche vorbeugen, verstärkt wurden, entfielen die Zwischenbeprobungen in den Monaten April und Mai teilweise.

Direkt nach der Probennahme wurde die Milch mit dem Konservierungsmittel Bronopol (LKV Rheinland) versetzt. Am selben Tag wurden die Milchproben zum Landeskontrollverband Rheinland transportiert und dort mittels Nah-Infrarot-Verfahren (Milkoscan) auf Rohprotein (%), Rohfett (%), Lactose (%), Harnstoffgehalt (ppm) sowie auf die Anzahl somatischer Zellen pro ml Milch untersucht. Zwischen

Juli und September 2001 wurden über dieses Verfahren zusätzlich die freien Fettsäuren (mmol/100 g Fett) ermittelt.

Die Ergebnisse der LKV-Untersuchungen wurden in der Abteilung Haustiergenetik zusammengestellt und von dort in das hiesige Labor übermittelt.

Nach Abschluss der Untersuchungen wurden die Proben ins institutseigene Labor weitergeleitet. Mehrere Einzelproben einer Kuh aus den Probennahmen des automatischen Melksystems bzw. der zusätzliche Kontrolle wurden vereinigt, so dass pro Kuh und Probennahmetag eine Milchprobe vorlag. Es vergingen maximal 3 Tage ab Probennahme bis sie aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Untersuchung tiefgefroren wurden.

Es wurde weiterhin von jeder abkalbenden Kuh eine Kolostralmilchprobe maximal bis 6 h nach der Geburt genommen. Diese Probe wurde umgehend bei -20°C tiefgefroren.

Ebenso wurde von allen Kühen die Anzahl der Laktationen (Laktationsnummer), Erkrankungen, die im direkten Zusammenhang mit der Laktation oder der Geburt stehen wie z.B. Mastitiden, Milchfieber, etc. (Datum, Art der Erkrankung, Behandlung), Daten zur Geburt (Geburtsverlauf, Geschlecht der geborenen Kälber), alle Besamungsdaten (Datum, Bullenname, Anzahl erfolgter Besamungen bis zur Trächtigkeit), sowie alle Besonderheiten und Abweichungen im Arbeitsalltag erfasst. Alle anfallenden Milchproben wurden auf ihren Lactoferringehalt mittels des in Kapitel 2.1 dargestellten Enzymimmunoassays getestet. Eine Auswahl an Proben wurde zudem auf IGFBP-2 mit dem in Kapitel 2.2 vorgestellten Enzymimmunoassay untersucht. Hierfür wurden Proben ausgewählt, die zeitlich vor, während und nach Erhöhung über 150.000 Zellen/ml in der Milch von Kühen lagen, weiterhin Proben vor und nach erfolgreicher bzw. nicht erfolgreicher Besamung, sowie Proben, die eine ganze Laktation umfassen.

3.1.1.1 Voruntersuchung zur Behandlung der Kuhmilchproben

Da die zu untersuchenden Kuhmilchproben direkt nach der Probennahme mit dem Konservierungsmittel Bronopol versetzt wurden, wurde getestet, ob dieses Einfluss auf die Testsysteme hat. Ebenso wurde überprüft, ob die Lagerdauer bzw. mögliche Temperaturschwankungen beim Transport, Einfluss auf die Ergebnisse haben könnten.

Zu diesem Zweck wurde eine Frischmilchprobe aus dem Milchtank entnommen, sowie 3 frische Rindermilchproben gezogen. Diese Proben wurden jeweils in zwei Portionen aufgeteilt, wobei je eine mit dem Konservierungsmittel Bronopol und die andere nicht behandelt wurde. Jede vorliegende Probe wurde noch einmal aufgeteilt und weiter bei 4°C bzw. bei Raumtemperatur gelagert. Über die Dauer von 4 Tagen wurde täglich aus jeder Milchreihe eine Probe bei -20°C eingefroren. Danach wurden alle Proben auf den Lactoferringehalt und auf das Verhalten im IGFBP-2 Test untersucht.

Durch die statistische Auswertung der Daten mit Hilfe von SPSS 10 (Mauchly, allgemeines lineares Modell mit Messwiederholungen) konnte abgesichert werden, dass keine signifikante Abweichung in den Untersuchungsergebnissen bezüglich Zeitraum, Lagerung und Konservierungsmittel besteht.

3.1.1.2 Statistische Auswertung der Kuhmilchdaten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 10.0 bzw. 12. Die Daten der Lactoferrin- und IGFBP-2-Konzentrationen wurden zur Auswertung logarithmiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung geprüft. Lag diese vor, wurde die Homogenität der Varianzen mit dem Levene-Test überprüft. Lag keine Normalverteilung der Daten oder keine Homogenität der Varianzen vor, wurden sie mit nicht-parametrischen Testverfahren ausgewertet, ansonsten erfolgte die Auswertung über parametrische Tests.

Alle Werte werden als Mittelwert (\bar{X}) plus/minus Standardfehler (SEM) dargestellt.

In Berufung auf BÜHL & ZÖFEL (2000) werden Aussagen, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ behaftet sind, als signifikant bezeichnet. Beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$ heißen sie sehr signifikant und bei $p \leq 0,001$ höchst signifikant.

3.1.1.2.1 Untersuchungen zur Laktation

Auf Grund der sich aus dem Versuch ergebenden Datenstruktur ließen sich die ermittelten Parameter am besten darstellen und auswerten, indem die Laktation in vier Abschnitte unterteilt wurde:

- I Nachgeburtsphase: Laktationswoche (LW) 0 (Woche der Kalbung) bis 5. LW.
- II Mittlaktation, 1. Abschnitt: 6. bis 15. LW (Ende rund um den ersten Besamungszeitpunkt der Kühe).

III Mittlaktation, 2. Abschnitt: 16. bis 30. LW.

IV letzter Abschnitt der Laktation: 31. LW bis zum Ende der Laktation.

Die Einzelwerte pro Laktationswoche werden im Anhang aufgeführt.

Für die Berechnungen zur Laktation wurden nur die Tiere berücksichtigt, die aus der homogenen Versuchsgruppe 1 (n = 104) stammen und von den Mitarbeitern als gesund eingestuft wurden. Zudem wurden nur die Milchproben berücksichtigt, deren Zellzahlen unter 150.000 Zellen/ml lag.

Bei allen Parametern lag auch nach der Logarithmierung der o.g. Daten nach Kolmogorov-Smirnov keine Normalverteilung vor. Deshalb wurden bei den Berechnungen nur nicht-parametrische Testverfahren verwendet.

Eine Auswertung der untersuchten Parameter über die verschiedenen Laktationsstadien erfolgte mit Hilfe des H-Tests nach Kruskal-Wallis. Ein paarweiser Vergleich der aufeinander folgenden Stadien der Laktation wurde mit dem U-Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend nach Bonferroni korrigiert.

Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern wurden nicht-parametrisch nach Spearman überprüft.

Bei der Untersuchung, ob das Alter der Tiere einen Einfluss auf Höhe der untersuchten Parameter Lactoferrin bzw. IGFBP-2 nimmt, kam der H-Test nach Kruskal-Wallis zur Anwendung.

Um bei den Auswertungen des IGFBP-2-Gehaltes der Milch zur Laktation den Ernährungsstatus der untersuchten Kühe zu berücksichtigen, wurden die IGFBP-2-Konzentrationen zusätzlich in die praxisübliche so genannte 9-Felder-Tafel eingeordnet. Dazu werden in Anlehnung an die Auswertungen des LKV Rheinland im Rahmen des Harnstoffberichtes der Milchleistungsprüfung der Eiweiß- und der Harnstoffgehalt in der Milch ins Verhältnis gesetzt und in die in Abb. 22 dargestellte 9-Felder-Tafel eingetragen. Dieser Wert zeigt in welchem Feld sich die Kuh befindet und ob die Fütterung als optimal eingestuft werden kann oder ob Defizite im Bereich der Energie- und/oder Proteinversorgung bestehen.

Es konnte nicht auf Daten zur Energiebilanz o.ä. zurückgegriffen werden, deswegen erfolgte die Einordnung des Ernährungsstatus über die Ergebnisse aus den Milchanalysen.

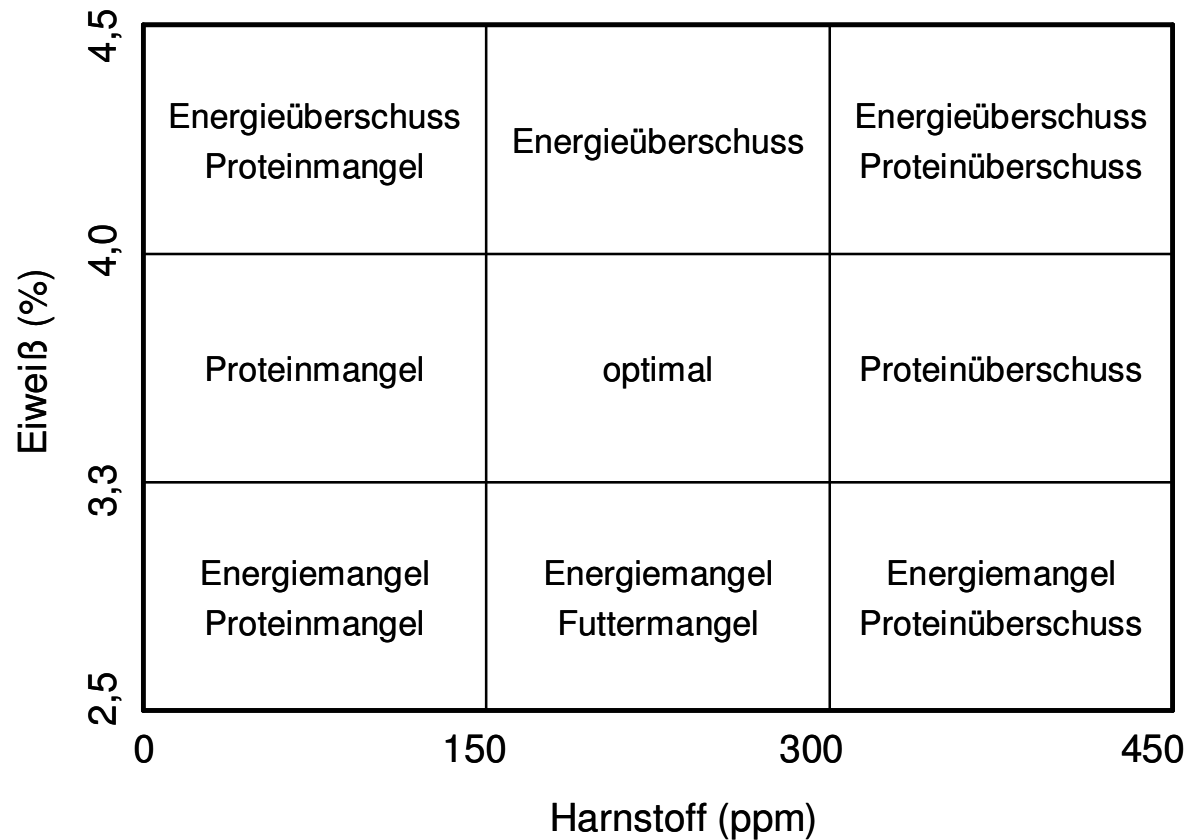


Abbildung 22: Anordnung der 9-Felder-Tafel zur Einstufung des Ernährungsstatus von Milchkühen in Anlehnung an den LKV Rheinland

Da in den verschiedenen Laktationsstadien unterschiedliche Stoffwechselverhältnisse vorliegen, wurden diese im Einzelnen betrachtet. Es wurden dabei die Daten aller Tiere einbezogen, außer während der Kolostralphase und bei Milchzellzahlen über 150.000 Zellen/ml.

Ob Unterschiede innerhalb der Laktationsstadien zwischen dem Optimum und anderen Feldern bestehen, wurde, da keine Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov vorlag, mit dem paarweisen Vergleich nach Mann-Whitney überprüft. Um die multiple Datenstruktur zu berücksichtigen wurde eine Korrektur nach Bonferroni durchgeführt.

3.1.1.2.2 Untersuchungen über den jahreszeitlichen Verlauf

Die Probennahme erfolgte von Anfang des Jahres (3. Kalenderwoche) bis zum Herbst (39. KW), so dass eine jahreszeitliche Entwicklung der untersuchten Parameter über diesen Zeitraum möglich ist. Hierbei wurden die Kolostralmilchproben nicht mit in die Berechnungen einbezogen. Zum Vergleich wurden dieselben Tiere wie zur Laktation ausgewertet. Dies entspricht 104 Kühen der Gruppe 1, die als gesund eingestuft wurden und deren Milch-Zellzahl unter 150.000 Zellen/ml liegt.

Es lag keine Normalverteilung der Werte nach Kolmogorov-Smirnov vor. Ob die Jahreszeit einen Einfluss auf die untersuchten Parameter der Milch nimmt, wurde demnach mit dem nicht-parametrischen H-Test nach Kruskal-Wallis überprüft.

3.1.1.2.3 Untersuchungen zur Trächtigkeit

Bei den Darstellungen und Berechnungen kamen Kühe aller Gruppen zum Einsatz, jedoch nur, wenn ihnen ein Zellgehalt < 150.000 zugeordnet werden konnte. Um Effekte durch das Kolostrum auszuschließen, wurde es nicht in die Auswertungen mit einbezogen.

Die Tiere sind in zwei Gruppen mit unterschiedlichem Besamungserfolg, ≤ 2 bzw. ≥ 3 Besamungen pro Tier bis zur erfolgten Trächtigkeit, eingeteilt. Um eine übersichtliche Darstellung zu erhalten, werden die Zeitabschnitte vor und nach der Besamung zusammengefasst dargestellt. Dabei werden drei Zeitabschnitte unterschieden:

- die 10 Wochen vor der erfolgreichen Besamung,
- die Wochen ab der erfolgreich verlaufenden künstlichen Besamung (KB) (Woche 0) bis zur Woche 10 danach,
- die folgenden Wochen 11 bis 20 nach der KB.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit eines direkten Vergleiches der Zeitabschnitte zwischen den Gruppen. Die Betrachtung eines längeren Zeitraums nach der Konzeption (Woche 0 bis 10 und 11 bis 20) wird vorgenommen, um mögliche weitere Entwicklungen, die mit der Laktation zusammenhängen, aufzeigen zu können.

Da eine Untersuchung über die einzelnen 10 Wochen vor und bis zur 10. Woche nach der Konzeption bei beiden Gruppen kein übersichtliches Ergebnis erbrachte, wird auf eine entsprechende Darstellung verzichtet.

Über alle Tiere lag keine Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov vor. In wie weit die Parameter Lactoferrin und IGFBP-2 durch eine Trächtigkeit beeinflusst werden wurde deshalb durch einen Vergleich der Zeitabschnitte vor und nach erfolgreicher künstlicher Besamung mit Hilfe des H-Test nach Kruskal-Wallis als nicht-parametrisches Testverfahren überprüft. Um zwischen den Besamungsgruppen die entsprechenden Zeitabschnitte paarweise miteinander zu vergleichen kam der U-Test nach Mann-Whitney, korrigiert nach Bonferroni für multiple Tests, zur Anwendung. Bei den jeweiligen Berechnungen innerhalb der verschiedenen Besamungsgruppen waren Normalverteilungen gegeben. Hier wurde weiter mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA und dem Mehrfachvergleichen nach Dunnett-T3 ausgewertet.

3.1.1.2.4 Untersuchungen zur Zellzahl

Zur Untersuchung, inwiefern die Zellzahl Einfluss auf die ermittelten Parameter nimmt, wurden die Tiere in die Zellzahlklassen des „Linear Somatic Cell Count Score“ (SCS) eingeteilt. Um näherungsweise eine Normalverteilung der Daten zu erreichen werden die Daten zur Zellzahl logarithmisch transformiert:

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

(STAATLICHES UNTERSUCHUNGSAMT HESSEN, 2002; BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2005)

Daraus ergibt sich die folgende Einteilung der Zellzahl/ml (in tausend):

Zellzahlklasse (SCS)

0 =	≥ 0	≤ 17
1 =	≥ 18	≤ 35
2 =	≥ 36	≤ 70
3 =	≥ 71	≤ 141
4 =	≥ 142	≤ 282
5 =	≥ 283	≤ 565
6 =	≥ 566	≤ 1.131
7 =	≥ 1.132	≤ 2.262
8 =	≥ 2.263	≤ 4.535
9 =	≥ 4.536	

Über alle betrachteten Daten lag nach Kolmogorov-Smirnov keine Normalverteilung vor, von daher wurde ein Einfluss über alle Zellzahlklassen (SCS) mit Hilfe des nicht-parametrischen H-Tests nach Kruskal-Wallis überprüft. In wie weit sich ein Unterschied von einer Zellzahlgruppe zur nächst höheren Gruppe ergibt, wurde paarweise mit dem U-Test nach Mann-Whitney ausgetestet. Der multiplen Datenstruktur wurde dabei durch eine Korrektur der Ergebnisse nach Bonferroni entsprochen.

Ob Unterschiede zwischen den Melkgruppen im Zellgehalt der Milch bestehen, wurde ebenfalls nach Kruskal-Wallis getestet. Ein direkter Vergleich von zwei Melkgruppen wurde durch Mann-Whitney überprüft. Auch hier wurden die Ergebnisse nochmals nach Bonferroni korrigiert, da insgesamt mehr als zwei Gruppen paarweise verglichen wurden.

Korrelationen zwischen den Zellzahlklassen und Lactoferrin bzw. IGFBP-2 wurden nicht-parametrisch nach Spearman überprüft.

3.1.2 Haltung und Milchprobennahme der Ziegen

Im Landwirtschaftszentrum Haus Riswick wird neben den Milchkühen eine Milchziegenherde mit 90 Milchziegen der Rassen Weiße Deutsche Edelziege und Bunte Deutsche Edelziege gehalten. Die Ziegen werden in einem Laufstall mit Auslauf auf Stroh gehalten. Sie werden 2-mal täglich in einem 1 x 12 Side by side-Melkstand gemolken. Die Ziegenmilch wird auf Haus Riswick in der hofeigenen Käserei verarbeitet.

Für die hier dargestellten Untersuchungen wurde über 2 Jahre von 10 Tieren und im zweiten Jahr von weiteren 10 Tieren Milchproben gezogen. Im ersten Jahr begann die Probenentnahme ab dem 07. März 2000, was der 8 ± 2 Laktationswoche entsprach. Im zweiten Jahr wurden die Milchproben ab dem Ablammen genommen. Wöchentlich wurde je Tier eine Probe von etwa 10 ml mit Hilfe des Milchflussmessgerätes Metatron 8 (Westfalia) während des Melkvorgangs gezogen. Hierbei wurde ein über die andere Woche zwischen dem morgendlichen und abendlichen Melken gewechselt. Die Proben wurden direkt bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Von den untersuchten Tieren stehen darüber hinaus folgende Daten aus der Milchleistungsprüfung zur Verfügung: Rohprotein (%), Rohfett (%) und Anzahl somatische Zellen pro ml Milch.

Die Tiere erhielten über das gesamte Jahr eine Ration nach den Bedarfswerten der GfE von 1996. Das Grundfutter in Form von Heu, Gerstenstroh und Maissilage sowie das Kraffutter in Form von Minipellets (Melasseschnitzel, 6 mm Pelletierung) und das Mineralfutter werden 2-mal täglich gefüttert. Im Melkstand bekommen die Ziegen 150 g Kraffutter je Melkgang. Weiteres Kraffutter wird über Abrufstationen nach Leistung angeboten. Es handelt sich hierbei um ein Milchleistungsfutter für Kühe mit 6,7 MJ NEL und 160 g nXP in der Frischmasse.

Die Tiere lamnten saisonal im Winter ab. Nach dem Ablammen wurde von allen Versuchs-Ziegen im Jahr 2001 innerhalb von 6 h nach der Geburt eine Kolostralmilchprobe genommen und unmittelbar bei -20°C tiefgefroren. Von allen Milchproben wurde der Lactoferrin- sowie von den Proben aus der Laktation 2001 auch der IGFBP-2-Gehalt mit den in Kapitel 2.1 und 2.2 vorgestellten Enzymimmunoassays ermittelt.

Darüber hinaus wurde die Anzahl der Laktationen (Laktationsnummer), Erkrankungen, die im direkten Zusammenhang mit der Laktation oder der Geburt

stehen wie z.B. Mastitiden, etc. (Datum, Art der Erkrankung, Behandlung), Impfmaßnahmen, Daten zur Geburt (Ablammdatum, Anzahl geborene Lämmer je Ziege, Geschlecht der geborenen Lämmer), alle Deckdaten (Datum, künstliche Besamung oder Natursprung, Deckbock, Häufigkeit), sowie alle Besonderheiten und Abweichungen im Arbeitsalltag erfasst.

3.1.2.1 Statistische Auswertungen der Ziegenmilchdaten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 10.0 bzw. 12. Das Vorgehen entspricht dem bei den Kuhmilchdaten.

3.1.2.1.1 Untersuchungen zur Laktation

Die Laktation der Ziegen lässt sich, wie die des Rindes, in vier Stadien unterteilen:

- I** Nachgeburtsphase: LW 0 (Woche der Geburt) bis 5. LW
- II** Mittlaktation, 1. Abschnitt: 6. bis 16. LW
- III** Mittlaktation, 2. Abschnitt: 17. bis 27. LW
- IV** letzter Laktationsabschnitt: 28. LW bis zum Ende der Laktation.

Zu Beginn des vierten Abschnittes werden die Ziegen der Riswicker Herde in der Regel das erste Mal in der laufenden Laktation belegt. Bei den Berechnungen der Daten und Darstellungen wurden nur Ziegen einbezogen, die nach äußerlichen Anzeichen keine Mastitis aufwiesen. Ein Tier zeigte jedoch extrem erhöhte Zellzahlen und im Verlauf des Versuches eine akute Mastitis, so dass aus diesen Gründen die ganze Laktation in Kapitel 3.2.2.4 separat dargestellt wird.

In der folgenden Tabelle 3 sind die Auswertungen über die Berechnung der Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov der in die Berechnungen zur Laktation 2001 eingegangenen Daten dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse des Testes auf Normalverteilung (+/-) nach Kolmogorov-Smirnov aller untersuchten Ziegenmilchproben der Laktation 2001 und unterteilt nach den vier Laktationsstadien, sowie Anzahl der untersuchten Ziegenmilchproben (n)

	alle Milchproben	Laktationsstadium			
		I 0 – 5. LW	II 6. – 16. LW	III 17. – 27. LW	IV 28. LW – Ende
Lf ($\mu\text{g/ml}$)	- (757)	- (106)	- (186)	- (169)	- (296)
Lf (log)	+ (757)	- (106)	+ (186)	- (169)	+ (296)
IGFBP-2 (ng/ml)	- (757)	- (106)	- (186)	- (169)	- (296)
IGFBP-2 (log)	- (757)	- (106)	+ (186)	+ (169)	+ (296)
Zellzahl	- (145)				
Protein (%)	+ (133)				
Fett (%)	- (133)				
Milch (kg)	+ (133)				

- Daten nicht normalverteilt
- + Daten normalverteilt

Wenn eine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde weiter mit parametrischen Testverfahren ausgewertet. Lag jedoch keine Normalverteilung vor oder konnte die Varianzhomogenität nach Levene nicht erfüllt werden, kamen nicht-parametrische Testverfahren zum Einsatz.

Ausnahme bildet die mehrfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (GLM) zur Untersuchung des Laktationsverlaufes und der Faktoren Alter (Laktationsnummer) bzw. Trächtigkeitsstatus. Da es kein nicht-parametrisches Messverfahren für mehrfaktorielle Fragestellungen gibt, wurde hier unter Berufung auf ZÖFEL (2001) auch bei nicht-normalverteilten Daten die Varianzanalyse zur Berechnung herangezogen. Diese wurde dann mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,001$ abgesichert.

In der Laktationswoche 0 wurde zusätzlich der Faktor Laktationsnummer mit dem U-Test nach Mann-Whitney, korrigiert nach Bonferroni, als Nicht-Messwiederholungsfaktor überprüft.

Der Faktor Zeit, d. h. die Laktationswochen, wurde bei der Auswertung des caprinen Lactoferrins und IGFBP-2 separat in den einzelnen Laktationsstadien getestet, weil ein Test über die gesamte Laktation über diesen Weg nicht möglich war. Bei nicht

vorliegender Normalverteilung wurde zusätzlich nochmals über das nicht-parametrische Testverfahren nach Friedman getestet.

Zur Überprüfung, ob sich die o.g. Parameter über den Laktationsverlauf verändern, wurden die aufeinander folgenden Laktationsstadien getestet. Bei den Auswertungen zur Laktation 2001 kam bei den Parametern IGFBP-2, dem Fettgehalt der Milch und der Zellzahl pro ml Milch der nicht-parametrische H-Test nach Kruskal-Wallis zur Anwendung. Der Lactoferrin- sowie der Proteingehalt der Milch und die Milchmenge wurden als normalverteilte Daten über den Laktationsverlauf mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA ausgewertet. Die Lactoferrin-Daten der Laktation 2000 wurden nicht-parametrisch nach Kruskal-Wallis ausgewertet.

Ein Vergleich der aufeinander folgenden Laktationsstadien des Jahres 2001 wurde bei den Auswertungen des Lactoferrins über Dunnett-T3 und bei den Parametern Protein bzw. Milch-kg über Bonferroni abgesichert. IGFBP-2 sowie die Parameter Fett und Zellzahl wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen U-Tests nach Mann-Whitney, korrigiert nach Bonferroni, durchgeführt.

Bei den Untersuchungen zur Laktation 2000 ($n = 10$) begann die Probenahme erst zu Beginn der Mittlaktation (6. LW). Somit liegen für das erste Laktationsstadium keine Daten vor. In den beiden Stadien der Mittlaktation liegt auch nach dem Logarithmieren der Daten keine Normalverteilung vor. Im letzten Stadium der Laktation wurde nach einem Logarithmieren der Werte eine Normalverteilung erreicht. So wurden die weiteren vergleichenden Auswertungen mit nicht-parametrischen Testverfahren nach Mann-Whitney, korrigiert nach Bonferroni, durchgeführt.

Die Verläufe der Einzelwerte von Protein, Fett, Milch-kg und der Zellzahl wurden zusätzlich über die Regressionsanalyse nach dem quadratischen Modell $y = b_0 + b_1x + b_2x^2$ (BÜHL & ZÖFEL, 2000) geschätzt.

3.1.2.1.2 Untersuchungen zur Trächtigkeit

In diese Untersuchungen flossen die Daten aller Ziegen der Laktation 2001 ein, ausgenommen der an Mastitis oder anderen Krankheiten erkrankten Tiere. Es wurden die Parameter Lactoferrin und IGFBP-2 in Zusammenhang mit der Gravidität

von Ziegen untersucht (Tab. 4). Hierbei wurde unterschieden zwischen Tieren, die ohne Komplikationen und im normalen Zeitfenster der Laktation tragend wurden ($n = 12$). Dieses Zeitfenster beginnt in der 26. und endet in der 32. Laktationswoche, was jahreszeitlich etwa im August einzuordnen ist. Alle Tiere, die erst nach der 35 LW erfolgreich belegt oder besamt werden konnten, wurden in der Gruppe der spättragenden Ziegen zusammengefasst ($n = 3$). Die dritte Gruppe enthält die nicht tragend gewordenen Tiere ($n = 2$).

Die Parameter wurden nach Logarithmieren der Daten ausgewertet.

Tabelle 4: Ergebnisse des Testes auf Normalverteilung (+/-) der einzelnen Trächtigkeitsgruppen nach Kolmogorov-Smirnov und Anzahl der untersuchten Ziegenmilchproben (n)

	alle Milchproben ($n = 757$)	normal tragend ($n = 244$)	spät tragend ($n = 45$)	nicht tragend ($n = 31$)
Lf ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	+	+
Lf (log)	+	+	+	+
IGFBP-2 (ng/ml)	-	-	+	+
IGFBP-2 (log)	-	+	+	+

- Daten nicht normalverteilt

+ Daten normalverteilt

Um die Daten mit den Auswertungen zu den Milchkühen vergleichen zu können, wurden auch hier die Zeiträume von 10 Wochen vor erfolgreicher Konzeption (Woche -10 bis -1) und 10 Wochen danach plus der Woche, in der die Konzeption erfolgte (Woche 0 bis 10) zusammengefasst. Bei den nicht tragend gewordenen Tieren wurde ein Zeitfenster der Laktation gewählt, welches jahres- und laktationszeitlich dem der normal tragend gewordenen Tiere entsprach.

Innerhalb einer Gruppe wurden die Daten vor und nach der erfolgreichen Konzeption mit Hilfe des t-Tests verglichen. Ein Vergleich der entsprechenden Zeitfenster zwischen den Gruppen wurde mit einer einfaktoriellem ANOVA und einem posthoc-Vergleich nach Dunnett-T3 durchgeführt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Untersuchungen der Kuhmilch bezüglich ihrer Inhaltsstoffe sowie dem Lactoferrin- und dem IGF1P-2-Gehalt

3.2.1.1 Milchinhaltstoffe bei der Kuh

3.2.1.1.1 Milchinhaltstoffe im Laktationsverlauf

In den Milchproben aus den einzelnen Laktationsstadien wurden für die untersuchten Inhaltsstoffe die in Tabelle 5 aufgeführten Mittelwerte \pm Standardfehler ermittelt. Im Folgenden wird auf die einzelnen Parameter separat eingegangen. Im Anhang sind die den einzelnen Laktationswochen zugeordneten Werte aufgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 5: Milchinhaltstoffe ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) und Anzahl der untersuchten Milchproben (n) in den vier verschiedenen Laktationsstadien der Kuh

Stadium Laktations- wochen	I 0-5	II 6-15	III 16-30	IV 31-Ende	p**
Protein (%)	3,14 \pm 0,03 (n = 171)	3,09 \pm 0,01 a (n = 469)	3,28 \pm 0,01 b (n = 651)	3,55 \pm 0,01 a (n = 504)	ab: < 0,001
Fett (%)	4,17 \pm 0,06 a (n = 171)	3,71 \pm 0,03 b (n = 469)	3,92 \pm 0,03 a (n = 651)	4,28 \pm 0,03 b (n = 504)	ab: < 0,001
ffa (mmol/100g Fett)	0,41 \pm 0,08 a (n = 52)	0,62 \pm 0,04 b (n = 123)	0,84 \pm 0,03 c (n = 255)	0,87 \pm 0,04 (n = 182)	ab: = 0,03 bc: < 0,001
Lactose (%)	4,75 \pm 0,02 a (n = 171)	4,83 \pm 0,01 b (n = 469)	4,76 \pm 0,01 a (n = 651)	4,74 \pm 0,01 (n = 504)	ab: < 0,001
Zellzahl (in 1000)*	58,0 \pm 2,85 (n = 171)	51,7 \pm 1,54 a (n = 469)	61,0 \pm 1,32 b (n = 651)	75,0 \pm 1,59 a (n = 504)	ab: < 0,001
Harnstoff (ppm)	210 \pm 3,93 a (n = 171)	258 \pm 2,69 b (n = 469)	254 \pm 2,41 (n = 651)	244 \pm 2,61 (n = 504)	ab: < 0,001

* nur Proben < 150.000 Zellen/ml

** paarweiser Vergleich der **jeweils aufeinander folgenden** Laktationsstadien

Alle vom LKV Rheinland ermittelten Daten zu den Milch Inhaltsstoffen (Tab. 5), zeigen eine Abhängigkeit vom Laktationsstadium ($p < 0,001$).

Während die Werte vom ersten auf das zweite Laktationsstadium bei Lactose, Harnstoff ($p < 0,001$) und freien Fettsäuren ($p = 0,03$) ansteigen, sinken die Fettgehalte der Milch ($p < 0,001$) ab. Im mittleren Bereich der Laktation (vom zweiten auf das dritte Stadium) steigen die Gehalte aller Milch Inhaltsstoffe ($p < 0,001$) bis auf Lactose und Harnstoff weiterhin an. Der Lactosegehalt der Milch sinkt in diesem Zeitraum wieder ab ($p < 0,001$) und der Harnstoffgehalt stagniert. Vom dritten Laktationsstadium zum Ende der Laktation zeigen noch Fett, Protein und die Zellzahl einen Anstieg ($p < 0,001$) in der Milch.

3.2.1.1.2 Milch Inhaltsstoffe im jahreszeitlichen Profil

Durch die Probennahme von Januar bis Ende September ist eine jahreszeitliche Einordnung der untersuchten Parameter möglich. Die den Kalenderwochen zugeordneten Werte sind im Anhang (Tabelle 10) aufgeführt.

Bei einer Betrachtung der einzelnen Parameter über das Jahr zeigt sich das im Folgenden dargestellte Verhalten.

Der **Harnstoffgehalt** in der Milch variiert über den Untersuchungszeitraum ($p < 0,001$). Zum Frühjahr sinkt der Gehalt von Ende Januar (3. Kalenderwoche) ausgehend bei $266 \pm 4,54$ ppm bis Ende März (13. KW) auf ein Plateau im Bereich von 200 ppm ab und steigt erst nach dem Ende Aprils (17. KW) bis zum Ende des Mai (22. KW) auf eine Jahresspitze von $350 \pm 6,13$ ppm an. Ende Juli (30. KW) hat er dann wieder ein niedriges Niveau von $236 \pm 4,42$ ppm erreicht und sinkt zum Herbst weiter langsam ab. Ende September (39. KW) ist ein Niveau von $173 \pm 3,93$ zu beobachten.

Auch der **Eiweißgehalt** der Milch zeigt eine jahreszeitliche Abhängigkeit ($p < 0,001$). Er liegt von Jahresanfang bis Anfang April konstant mit nur kleinen Abweichungen bei 3,4 %, fällt dann jedoch in der 15. Kalenderwoche abrupt auf $3,12 \pm 0,08$ % ab. Zum Ende April steigt er ein wenig an und erreicht ein Niveau von $3,28 \pm 0,04$ % (17. KW), welches jedoch Mitte Mai wieder auf 3,2 % absinkt. Erst zum Ende des Septembers ist wieder ein Anstieg der Eiweißkonzentration in der Milch zu beobachten, so dass in der 39. KW der Gehalt wieder auf dem Jahresanfangsniveau von 3,4 % liegt.

Mit der raschen Abnahme des Eiweißgehaltes in der 15. Kalenderwoche geht auch ein Abfall der **Lactosewerte** einher. Auffällig ist hierbei die große Varianz der Lactose- und Eiweißwerte in der 15. Kalenderwoche im Gegensatz zur Probennahme davor (13. KW) und danach (17. KW). In dieser Woche ist ein wesentlich höherer Standardfehler, als im übrigen Jahr zu beobachten. Auch der Mittelwert weicht in beiden Fällen stark nach unten ab. Betrachtet man die Einzelwerte, so stellt man fest, dass in dieser Woche ungewöhnlich tiefe Lactosewerte bis 3,1 % gemessen werden. Alle nach unten ausreißenden Eiweiß- und Lactosewerte wurden allerdings in der Melkgruppe Karussell gemessen. Dort beträgt in der 15. KW der Lactosegehalt durchschnittlich 4,2 % und der Eiweißgehalt 2,9 %. Im Gegensatz dazu sind in der Melkgruppe Melkautomat im Schnitt 4,8 % Lactose und 3,3 % Eiweiß in der Milch enthalten. In der nachfolgenden Probennahme (17. KW) beträgt der durchschnittliche Lactosegehalt in beiden Gruppen wieder ein Niveau von 4,7 – 4,8 %, wie auch vor der 15. KW.

Auch der Fettgehalt der Milch variiert in der 15. KW zwischen den beiden Melkgruppen. Beim Melkkarussell beträgt er 3,8 % und im Melkautomat 4,1 %. Bei den anderen Parametern sind zu diesem Zeitpunkt keine besonderen Abweichungen zu beobachten.

Die **Zellzahlen** zeigen keinen Bezug zur Jahreszeit.

Der **Fettgehalt** der Milch zeigt Abhängigkeiten ($p < 0,001$) von der Kalenderwoche. Betrachtet man jedoch die einzelnen Werte über das Jahr hinweg sind nur unregelmäßige Schwankungen der Parameter in den einzelnen Wochen zu beobachten. Diese ergeben aber über das Jahr kein Muster.

3.2.1.2 Lactoferrin in Kuhmilch

3.2.1.2.1 Lactoferrinkonzentration im Laktationsverlauf

Bei der Betrachtung der Lactoferrinkonzentrationen über eine Laktation zeigt sich der in Abb. 23 dargestellte Verlauf. Im Kolostrum sind Werte zu beobachten, die mehrere Milligramm betragen ($3,89 \pm 0,22$ mg/ml), aber schon in der ersten Laktationswoche fällt die Konzentration auf ein Niveau von durchschnittlich $199 \pm 54,9$ µg/ml ab. Nach einem Plateau bis um die 15. LW, auf dem die Werte zwischen 130 und 170 µg/ml mit geringen Abweichungen von Tier zu Tier schwanken, steigt der Lactoferringehalt kontinuierlich bis zum Ende der Laktation auf ca. 300 µg/ml (48. LW) an, wobei die

tierindividuellen Unterschiede immer größer werden. Im Anhang sind die den einzelnen Laktationswochen zugeordneten Werte aufgeführt (Tabelle 9).

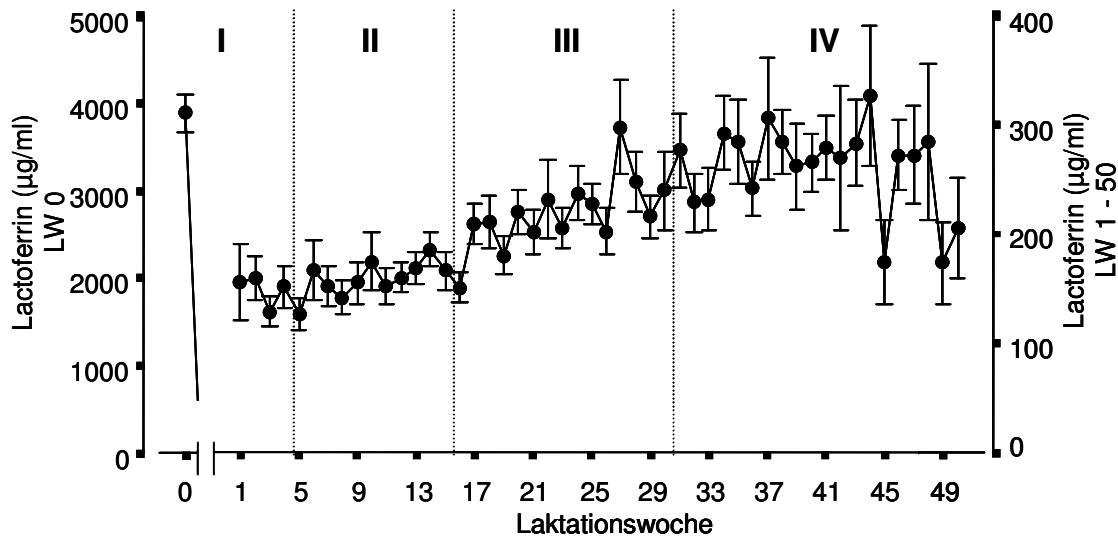


Abbildung 23: Verlauf der Lactoferrinkonzentration ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in Kuhmilch über eine Laktation.

Die Konzentration in Kolostrum sind auf der linken Y-Achse abzulesen, ab der 1. Laktationswoche folgt die Darstellung über die rechte Achse.

Über die vier Laktationsstadien der Kuh zeigt sich ein unterschiedlicher Verlauf der Lactoferrinkonzentration in der Milch ($p < 0,001$). Vergleicht man die aufeinander folgenden Laktationsstadien miteinander (Tab. 6), so zeigt sich, dass vom ersten zum zweiten Stadium ein Abfall der Werte von zu beobachten ist ($p = 0,012$). Danach folgt im weiteren Verlauf der Laktation vom zweiten zum dritten und vom dritten zum letzten Laktationsabschnitt ein Anstieg der Lactoferrinkonzentration in der Milch ($p < 0,001$).

Tabelle 6: Lactoferrinkonzentrationen ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) und Anzahl der untersuchten Milchproben (n) in den vier Laktationsstadien der Kuh

Stadium Laktations- wochen	I 0-5	II 6-15	III 16-30	IV 31-Ende	p^{**}
Lf ($\mu\text{g/ml}$)	976 ± 117 a (n = 217)	163 $\pm 5,82$ b (n = 460)	216 $\pm 6,37$ c (n = 641)	270 $\pm 8,95$ b (n = 503)	ab: = 0,012 bc: < 0,001

** paarweiser Vergleich der jeweils aufeinander folgenden Laktationsstadien

Zwischen dem Gesamtprotein der Milch und Lactoferrin wurde ein Korrelationskoeffizient ($p < 0,01$) von $r = 0,291$ ($n = 1769$) ermittelt.

Der Lactoferringehalt der Milch zeigt zwar eine Abhängigkeit ($p < 0,001$) von der Kalenderwoche (Tabelle 10 im Anhang), bei der Betrachtung der Werte über das Jahr hinweg sind jedoch nur unregelmäßige Schwankungen in den einzelnen Wochen zu beobachten. Diese ergeben über das Jahr kein Muster.

3.2.1.2.2 Lactoferrinkonzentration in Bezug zur Trächtigkeit

In die Berechnungen zum Lactoferringehalt flossen die Werte von 61 Tieren ein. 49 brauchten bis zur erfolgreichen Konzeption 1 bis 2 Besamungen, 12 benötigten mehr als 2. Es lagen jedoch keine wöchentlichen Daten von allen Tieren vor, bedingt durch die unterschiedlichen Gruppierungen und durch ausgeschlossene Proben, wenn die Zellzahl über 150.000 pro ml Milch lag.

Der Lactoferringehalt in der Milch zeigt über alle Tiere, unabhängig vom Besamungszeitpunkt einen Unterschied über die drei betrachteten Zeitabschnitte ($p < 0,001$).

In Abbildung 24 ist der Verlauf der Lactoferrinkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) in den Wochen vor und nach einer etablierten Trächtigkeit dargestellt. Während bei den Tieren mit ≤ 2 Besamungen bis zur Trächtigkeit ein Einfluss des Zeitabschnittes zu beobachten ist ($p < 0,001$), kann dieser bei der Tiergruppe mit einer höheren Anzahl von Besamungen nicht nachgewiesen werden. Bei der Gruppe $\text{KB} \leq 2$ steigt der Lf-Gehalt in der Milch nach der erfolgreichen Besamung in Bezug zu dem Zeitabschnitt vorher an ($p < 0,001$). Auch bei der langfristigen Betrachtung der Tiere kommt es in den Wochen nach der Konzeption, sprich von dem Zeitabschnitt der Wochen 0 – 10 zu 11 – 20, nochmals zu einem Anstieg ($p < 0,001$) der Lactoferrinkonzentration in der Milch. Der Anfangsgehalt vor der erfolgreichen Besamung liegt hier bei $167 \pm 6,6 \mu\text{g Lf/ml}$ und steigt im Anschluss auf $222 \pm 8,2 \mu\text{g/ml}$ an. Im weiteren Verlauf wird eine Konzentration von $259 \pm 12,3 \mu\text{g/ml}$ erreicht. Bei der Gruppe mit einer Anzahl von $\text{KB} \geq 3$ wird vor der Konzeption $209 \pm 4,4 \mu\text{g Lf/ml}$ Milch gemessen. In den beiden folgenden Zeitabschnitten beträgt der Gehalt $247 \pm 21,1 \mu\text{g/ml}$ und darauf folgend $251 \pm 39,4 \mu\text{g/ml}$.

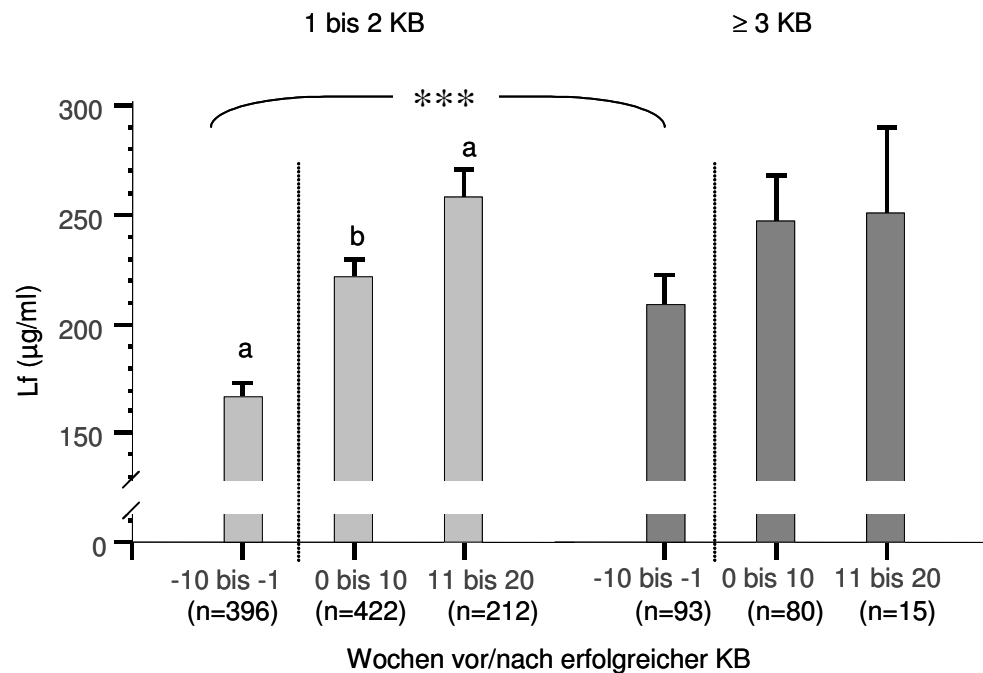


Abbildung 24: Lactoferrinkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) vor und nach erfolgreicher Besamung ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Hellgraue Balken stellen die Kühe mit 1 bis 2 KB bis zur Trächtigkeit dar, dunkelgraue Balken die mit ≥ 3 KB.

ab = Unterschiede innerhalb der Gruppen zum jeweils folgenden Zeitabschnitt: $p < 0,001$

*** = Unterschiede zwischen den entsprechenden Zeitabschnitten der beiden Gruppen: $p < 0,001$

n = Anzahl der gemessenen Proben

Tiere, die schnell nach der Kalbung wieder tragend wurden ($\text{KB} \leq 2$) haben somit im Gegensatz zu den Tieren mit einer höheren Anzahl von Besamungen ($\text{KB} \geq 3$) vor der Konzeption (Wochen -10 bis -1) ein niedrigeres Anfangsniveau in ihrem Lf-Gehalt in der Milch ($p < 0,001$). Im Vergleich zwischen den entsprechenden Stadien nach der etablierten Trächtigkeit ist kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen zu beobachten.

3.2.1.2.3 Lactoferrinkonzentration in Bezug zur Zellzahl

Bei der Darstellung der Lactoferrinwerte in Bezug zur Zellzahl (Abb. 25) ergibt sich ein klares Bild. Mit steigender Zellzahlklasse steigt die Lf-Konzentration ebenfalls an ($p < 0,001$). Im Einzelnen ist von der Zellzahlklasse 1 zu 2 und von 3 zu 4 ein Anstieg

($p < 0,001$) zu beobachten. Mit weiter steigender Zellzahl ist danach kein weiterer Einfluss zwischen den einzelnen Stufen mehr zu beobachten.

In den niedrigen Zellzahlklassen 0 bis 3, welche Zellzahlen unter 142.000 Zellen/ml erfassen, sind Werte bis um die 200 μg Lf/ml Milch zu beobachten (0 = $145 \pm 9,32$ μg Lf/ml; 1 = $167 \pm 6,04$; 2 = $213 \pm 5,72$; 3 = $233 \pm 6,11$). Danach steigt der Lf-Gehalt über 300 μg /ml an, was sich fortsetzt bis über 500 μg Lf/ml in der Zellzahlklasse 8, was über 2.263.000 Zellen/ml entspricht (4 = $304 \pm 9,74$ μg Lf/ml; 5 = $368 \pm 18,7$; 6 = $384 \pm 20,7$; 7 = $410 \pm 44,8$; 8 = 549 ± 113 ; 9 = $354 \pm 58,0$). Die Einzelwerte schwanken bei den Tieren dabei sehr stark, so werden z.B. bei der Zellzahlklasse 8 Lf-Werte zwischen 36 und 3.611 μg /ml gemessen (beides Tiere der 3. bis 4. Laktationswoche).

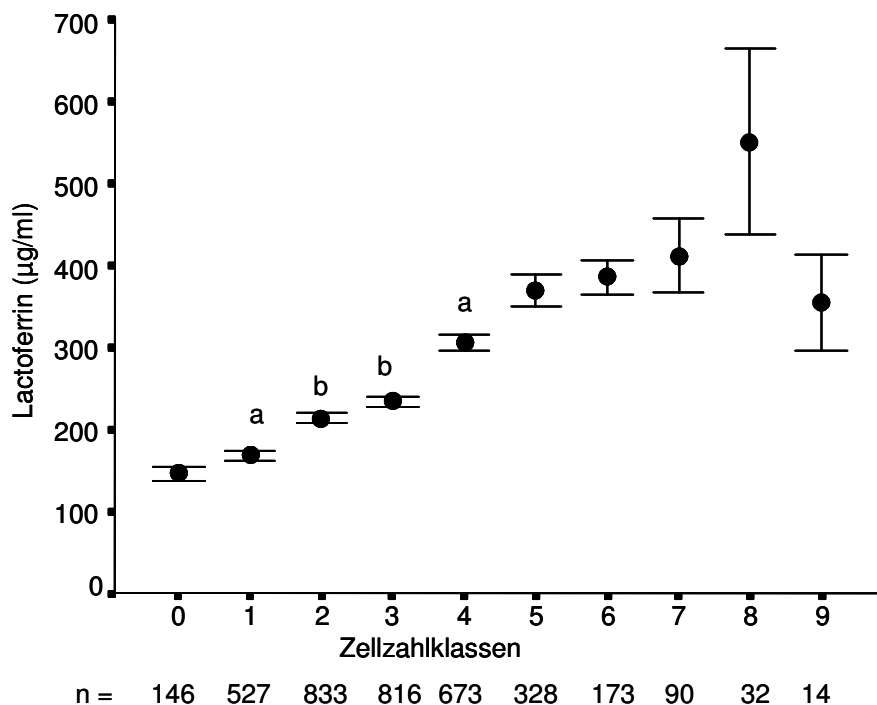


Abbildung 25: Entwicklung der Lactoferrinkonzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in Bezug zur Zellzahl, dargestellt über die Zellzahlklassen 1 bis 9 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

ab = Unterschied zur nächst höheren Klasse: $p < 0,001$

n = Anzahl der gemessenen Proben

Der Korrelationskoeffizient ($p < 0,01$) zwischen der Zellzahlklasse und der Lactoferrinkonzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in der Milch beträgt $r = 0,36$ ($n = 3635$).

3.2.1.3 IGFBP-2 in Kuhmilch

3.2.1.3.1 IGFBP-2-Konzentration im Laktationsverlauf

In Abbildung 26 ist der Verlauf des IGFBP-2 in der Milch von Kühen über eine Laktation dargestellt. Im Kolostrum wird die höchste Konzentration ($595 \pm 69,2$ ng IGFBP-2/ml) in der Laktation gemessen. Bis zur 6. Laktationswoche sinken die Werte langsam auf ein Niveau von etwa 18 ng/ml ab. Bis zur 18. Laktationswoche schwanken sie dann mit geringen tierindividuellen Unterschieden zwischen 15 und 18 ng IGFBP-2/ml. Im Anschluss an dieses Plateau steigt der IGFBP-2-Gehalt der Milch langsam an. Am Ende der Laktation (45 - 49. LW) werden Konzentrationen zwischen 20 und 40 ng/ml erreicht. Hier schwanken die Werte stark von Tier zu Tier. Im Anhang sind die den einzelnen Laktationswochen zugeordneten Werte aufgeführt (Tabelle 9).

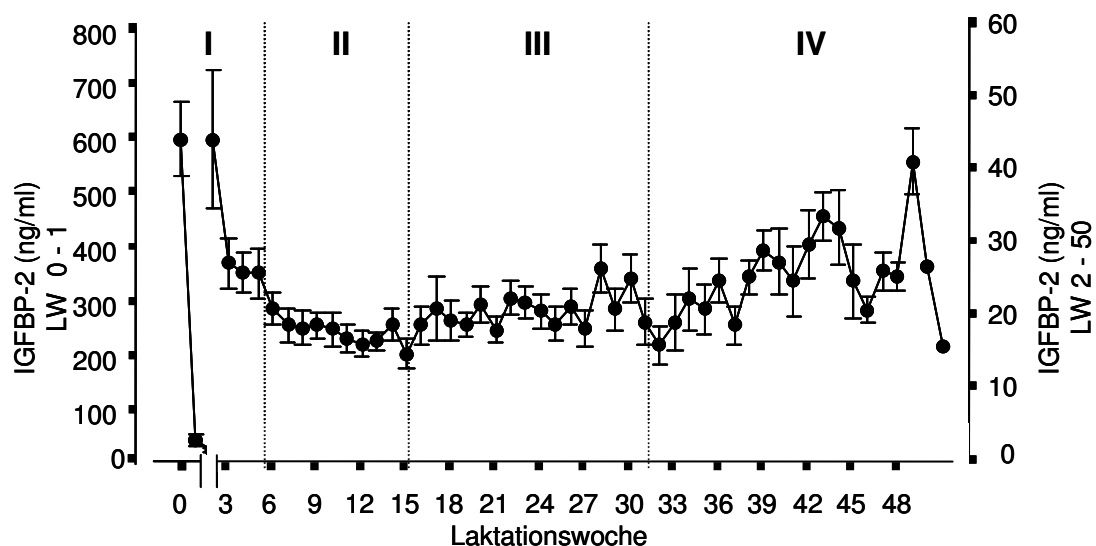


Abbildung 26: Verlauf der IGFBP-2-Konzentration (ng/ml) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in Kuhmilch über eine Laktation.

Die Konzentrationen in den ersten zwei Wochen sind auf der linken Y-Achse abzulesen, ab der 2. Laktationswoche folgt die Darstellung über die rechte Achse.

Über die vier Laktationsstadien (Tab. 7) betrachtet, zeigt sich ein Einfluss auf den IGFBP-2-Gehalt der Milch ($p < 0,001$).

Bei einem Vergleich der aufeinander folgenden Laktationsabschnitte lässt sich der Abfall der Werte von dem ersten auf das zweite Laktationsstadium absichern ($p < 0,001$). Im Verlauf der Mittlaktation (II. zum III. Laktationsstadium) steigen die

Werte dann wieder an ($p = 0,012$). Dieses Verhalten setzt sich zum Ende der Laktation fort. Vom zweiten Abschnitt der Mittlaktation zum letzten Laktationsstadium ist ebenfalls ein Anstieg der IGFBP-2-Konzentrationen der Milch zu beobachten ($p = 0,006$).

Tabelle 7: IGFBP-2-Konzentrationen ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) und Anzahl der untersuchten Milchproben (n) in den vier Laktationsstadien der Kuh

Stadium Laktations- wochen	I 0-5	II 6-15	III 16-30	IV 31-Ende	p**
IGFBP-2 (ng/ml)	131 $\pm 26,9$ a (n = 87)	17,1 $\pm 0,66$ b (n = 181)	20,4 $\pm 0,70$ c (n = 274)	23,6 $\pm 0,94$ d (n = 97)	ab: < 0,001 bc : = 0,012 cd : = 0,006

** paarweiser Vergleich der **jeweils aufeinander folgenden** Laktationsstadien

Zwischen dem Gesamtprotein der Milch und IGFBP-2 beträgt der Korrelationskoeffizient ($p < 0,01$) $r = 0,195$ ($n = 622$).

Der IGFBP-2-Gehalt der Milch zeigt eine Abhängigkeit ($p < 0,001$) von der Kalenderwoche (Tabelle 10 im Anhang). Über das Jahr sind jedoch nur unregelmäßige Schwankungen zu beobachten, die kein Muster ergeben.

3.2.1.3.2 Einfluss des Ernährungsstatus auf den IGFBP-2-Gehalt der Kuhmilch

Um den Ernährungsstatus bei der Darstellung der IGFBP-2-Gehalte in der Milch mit in die Ausführungen über die Laktation zu berücksichtigen, werden die Tiere unter Berücksichtigung des Laktationsstadiums in die praxisübliche 9-Felder-Tafel eingeordnet (Abb. 42 im Anhang).

Da Kühe, wie in dem vorangegangenen Kapitel aufgeführt, in den verschiedenen Laktationsstadien Unterschiede im IGFBP-2-Gehalt der Milch aufweisen, werden die verschiedenen Laktationsabschnitte separat dargestellt. Zudem befinden sich laktierende Tiere während der verschiedenen Stadien in der Regel in unterschiedlichen leistungsbezogenen Fütterungsphasen.

In Abbildung 27 ist zu sehen, dass sich die meisten Tiere in den ersten drei Laktationsphasen (1. - 30. LW) in einem Energiemangelzustand befinden. In der Phase der höchsten Milchleistung (Laktationsabschnitt II) lässt sich bei vielen Tieren zudem nach der Auswertung der Milchinhaltsstoffe zusätzlich zur Energiemangelversorgung noch ein Überschuss an Protein in der Ration vermuten. In der zweiten Hälfte der Laktation ist der Fütterungsstatus der Kühe bei einem großen Teil im Optimum. Im letzten Laktationsstadium weisen einige Tiere einen Energie- oder Proteinüberschuss durch die Fütterung auf.

Vergleicht man die Werte zwischen den Tieren, die optimal versorgt sind und denen, bei denen Defizite in der Fütterung vorliegen (Abb. 27), so sind nur in einem Fall signifikante Abweichungen im IGFBP-2-Gehalt der Milch nachweisbar. Lediglich im dritten Laktationsstadium ist zwischen den optimal versorgten Tieren und denen im Energiedefizit und gleichzeitigem Proteinüberschuss eine Abweichung, die sich bei $p < 0,035$ absichern lässt, nachweisbar. Ansonsten ist hier der IGFBP-2-Gehalt der Milch unbeeinflusst vom Fütterungsstatus der Kühe, unabhängig davon in welchem Laktationsstadium sie sich befinden.

Insgesamt zeigen sich auch hier, unabhängig von Fütterungsstatus, die Variationen des IGFBP-2-Gehaltes zwischen den Laktationsstadien. In der Mitte der Laktation (III), weist ein einzelnes Tier einmalig einen sehr stark erhöhten IGFBP-2-Gehalt in der Milch auf, der mit einem Energie- und Proteinüberschuss in der Fütterung einhergehen könnte.

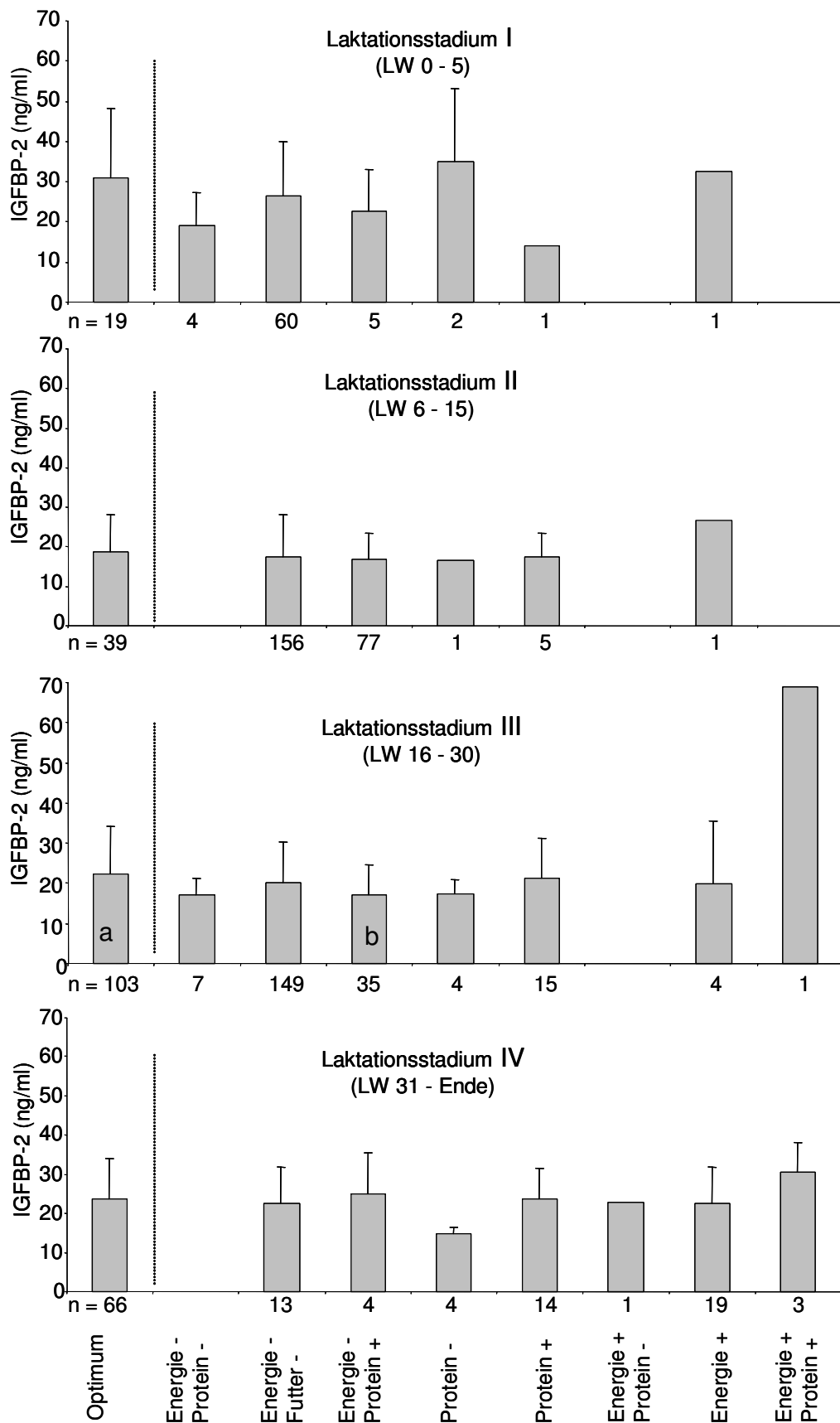


Abbildung 27: Darstellung der IGFBP-2-Gehalte (ng/ml) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in der Milch von Kühen in den einzelnen Laktationsstadien, eingeteilt in verschiedene Fütterungssituationen nach der 9-Felder-Tafel (s. Abb. 22, S.50).

ab = Unterschiede des jeweiligen Fütterungsstatus vom Optimum innerhalb der Gruppe: $p < 0,05$.

n = Anzahl der untersuchten Milchproben

3.2.1.3.3 IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Trächtigkeit

Bei den Auswertungen zum IGFBP-2-Gehalt in der Milch wurden 30 Tiere berücksichtigt, wovon 21 bis zu 2 und 9 mehr als 2 Besamungen bis zur Konzeption benötigten. Es lagen keine wöchentlichen Daten von allen Tieren vor, bedingt durch die unterschiedlichen Gruppierungen und durch ausgeschlossene Proben, wenn die Zellzahl über 150.000 pro ml Milch lag.

Bei der Betrachtung des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch aller Kühe zeigt sich bezüglich des Trächtigkeitsstatus eine Abhängigkeit vom Zeitabschnitt ($p = 0,005$).

Stellt man die beiden Besamungsgruppen einzeln dar (Abb. 28), so zeigt sich bei den früh wieder tragend gewordenen Kühen und den spät tragend gewordenen ein anderes Bild. Zwar ist auch hier bei der Tiergruppe mit einer Anzahl von 1 bis 2 Besamungen bis zur Trächtigkeit eine Abhängigkeit vom Zeitabschnitt zu beobachten ($p = 0,034$), dies trifft aber bei den Tieren, die erst nach mehreren Besamungen erfolgreich belegt wurden, nicht zu.

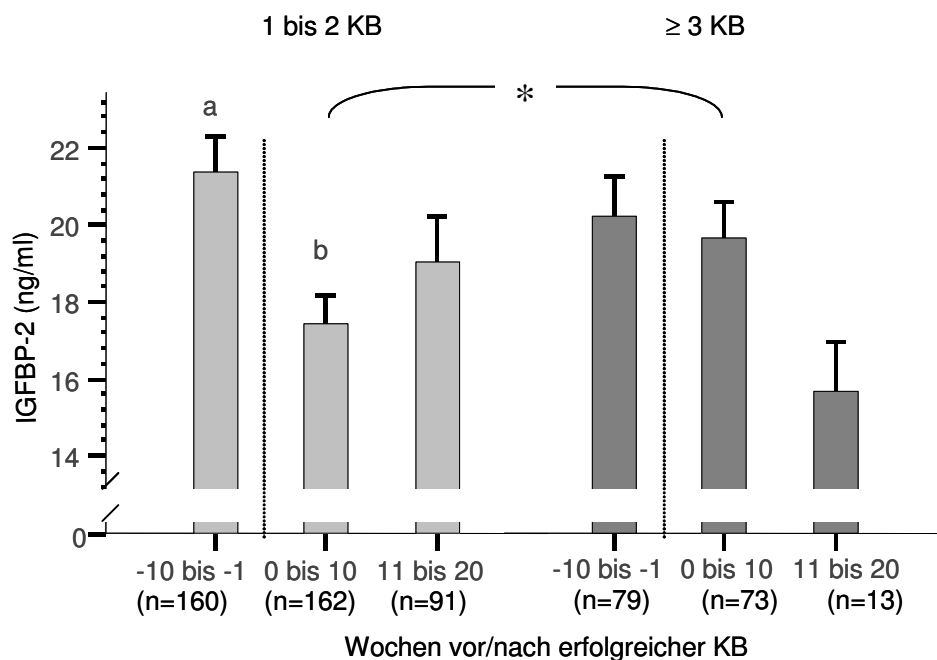


Abbildung 28: IGFBP-2-Konzentrationen (ng/ml) vor und nach erfolgreicher Besamung ($\bar{X} \pm \text{SEM}$). Hellgraue Balken stellen die Kühe mit 1 bis 2 KB bis zur Trächtigkeit dar, dunkelgraue Balken die mit ≥ 3 KB.

ab = Unterschiede der jeweils aufeinander folgenden Zeitabschnitte innerhalb der Gruppen: $p < 0,05$

* = Unterschiede zwischen den entsprechenden Zeitabschnitten der beiden Gruppen: $p < 0,05$

n = Anzahl der gemessenen Proben

Nach der Besamung sinkt die IGFBP-2-Konzentration bei der Tiergruppe mit $KB \leq 2$ von $21,4 \pm 0,95$ ng/ml auf $17,4 \pm 0,73$ ng/ml ab ($p = 0,032$). Im weiteren Verlauf ist keine weitere Veränderung mehr abzusichern. Hier werden noch $19,1 \pm 1,19$ ng IGFBP-2/ml Milch gemessen.

Die Gruppe mit mehr Besamungen (≥ 3) hat vor der Konzeption eine Konzentration von $20,2 \pm 1,03$ ng IGFBP-2/ml Milch. In den ersten 10 Wochen nach der erfolgreichen Besamung werden $19,7 \pm 0,93$ ng/ml gemessen und im Anschluss $15,7 \pm 1,29$ ng IGFBP-2/ml.

Vor der erfolgreichen Besamung zeigt sich zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied im IGFBP-2-Gehalt. In den ersten 10 Wochen nach der Konzeption weisen die Tiere mit ≥ 3 Besamungen einen höheren Gehalt auf ($p = 0,048$). Danach lässt sich kein Unterschied zwischen den beiden Besamungsgruppen mehr beobachten.

3.2.1.3.4 IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Zellzahl

Die IGFBP-2-Gehalte (Abb. 29) in Milch sind mit steigender Zellzahlklasse erhöht. Dies ist im Vergleich aller Zellzahlklassen mit $p < 0,001$ abgesichert.

Bis zur Zellzahlklasse 4 steigen die IGFBP-2-Werte nur geringfügig von $18,5 \pm 1,48$ ng/ml in der Zellzahlklasse 0 (bis 17.000 Zellen/ml) auf $22,9 \pm 0,93$ ng/ml bei der Klasse 4 (142.000 bis 283.000 Zellen/ml) an (1 = $19,8 \pm 0,87$ ng/ml; 2 = $20,5 \pm 0,62$; 3 = $21,5 \pm 0,68$). Danach ist ein Anstieg ($p < 0,001$) auf $27,1 \pm 0,97$ ng IGFBP-2/ml Milch in der Klasse 5 (283.000 bis 565.000 Zellen/ml) zu beobachten. Weiter ansteigende Zellzahlen in der Milch gehen zwar ebenfalls mit ansteigenden IGFBP-2-Konzentrationen einher, diese lassen sich jedoch nicht mehr von einer auf die nächst höhere Zellzahlklasse signifikant absichern (6 = $27,7 \pm 1,22$ ng IGFBP-2/ml; 7 = $29,7 \pm 1,83$; 8 = $34,2 \pm 4,40$; 9 = $50,3 \pm 12,3$).

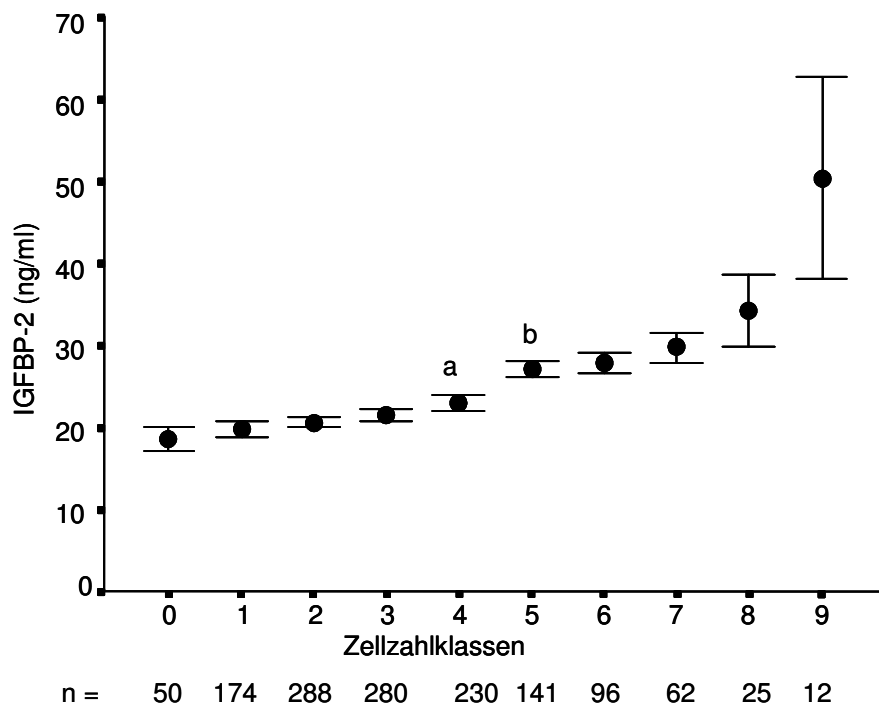


Abbildung 29: Entwicklung der IGFBP-2-Konzentration (ng/ml) in Bezug zur Zellzahl, dargestellt über die Zellzahlklassen 1 bis 9 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).
 ab = Unterschied zur nächst höheren Klasse: $p < 0,001$
 n = Anzahl der gemessenen Proben

Der Korrelationskoeffizient ($p < 0,01$) zwischen der Zellzahlklasse und dem IGFBP-2-Gehalt (ng/ml) in der Milch beträgt $r = 0,27$ ($n = 1360$).

3.2.1.4 Verhalten von Lactoferrin, IGFBP-2 und Inhaltsstoffen der Kuhmilch während einer Mastitis

Als Mastitis wird die Entzündung der Milchdrüse in der Gesamtheit ihrer milchbildenden, speichernden und ableitenden Abschnitte bezeichnet. Diese Entzündung kann sich in einem akuten oder in einem chronischen Stadium befinden. Ihre Symptome können einer klinisch manifesten Mastitis (durch Sinnesprüfung feststellbar) oder einer subklinischen Mastitis (nur durch labordiagnostische Untersuchungen der Milch bzw. durch mastitisbedingte Leistungsminderung einzelner Euterviertel zu ermitteln) entsprechen. Die Gesamtzahl klinisch euterkrankter Kühe beträgt auch in Herden mit wenigen Eutergesundheitsstörungen ständig 1 bis 2 %. Aber auch wenn der klinische Eutergesundheitszustand gut ist,

muss mit 10 bis 15 % Eutervierteln gerechnet werden, welche subklinische Mastitiden aufweisen (WENDT et al., 1994).

Zieht man die Zellzahl als Parameter zur Einstufung der Eutergesundheit heran, so weisen WENDT et al. (1994) darauf hin, dass nach heutigen Erkenntnissen bereits Zellgehalte von über 150.000/ml Milch von Gesundheitsstörungen zeugen. Betrachtet die Zellzahlen aller hier untersuchten Einzeltiere so zeigt sich an Hand der repräsentativ für die Laktation heraus gegriffenen 10. Laktationswoche, dass sich 71 % der Tiere zu diesem Zeitpunkt in den Zellzahlklassen 1 bis 3 (bis 141.000 Zellen/ml Milch) befinden, 20 % in den Klassen 4 bis 5 (142.000 bis 565.000 Zellen/ml Milch) und 9% darüber liegen. Dieses Bild spiegelt sich etwa während der restlichen Laktation der Kühe wider, wobei am Ende der Anteil der Tiere mit erhöhten Zellzahlen in der Milch ansteigt.

In den folgenden Abbildungen 30 bis 32 sind die ermittelten Parameter exemplarisch an zwei an Mastitis erkrankten Kühen dargestellt. Auf Grund der Tierzahl und wegen des unterschiedlichen Krankheitsverlaufs ist eine statistische Auswertung nicht möglich. Die Entzündung der Milchdrüse der beiden hier vorgestellten Kühe wurde auf Grund von Zellzahl und klinischer Symptome wie Schwellung, Erwärmung, Schmerzhaftigkeit sowie Veränderung in der Milch diagnostiziert. Eine bakteriologische Untersuchung zu Erregeridentifikation hat nicht statt gefunden.

Von der Kuh mit der Stallnummer **779** ist der Zeitraum von der 2. bis zur 40. Laktationswoche dargestellt (Abb. 30 bis 32). Sie dient als Beispiel für eine Kuh, die fast über eine ganze Laktation Probleme mit der Gesundheit der Milchdrüse aufweist. Schon wenige Wochen nach dem Kalben stieg bei ihr der **Zellgehalt** schnell und stark auf ein Niveau von über 3 Millionen Zellen pro ml Milch an (in Abb. 30 bis 32 dunkelgrau unterlegter Zeitabschnitt). Nach 10 Wochen fiel die Zellzahl wieder auf unter 100.000 Zellen/ml und das Tier konnte nach der Definition der DVG (1994) als gesund angesehen werden. Weitere 4 Wochen später stieg der Gehalt an somatischen Zellen in der Milch auf Werte zwischen 145.000 und 225.000 Zellen/ml an. Von der 25. auf die 26. Laktationswoche war dann ein rapider Anstieg auf eine Zellzahl von ca. 2 Millionen zu beobachten, der sich innerhalb einer Woche noch auf 3,8 Millionen steigerte. Erst zur 40. Laktationswoche sanken die Werte wieder auf ein Niveau von 300.000 Zellen/ml ab. Eine weitere Beobachtung dieser Kuh war versuchstechnisch nicht möglich.

Die andere hier dargestellte Kuh mit der Nummer **813** hat in ihrer ganzen Laktation Zellzahlen unter 60.000 Zellen/ml, was für eine gute Gesundheit der Milchdrüse spricht (DVG, 1994). Lediglich in der 33. Laktationswoche stiegen die Werte in Folge einer akuten Mastitis auf 860.000 Zellen/ml Milch (in Abb. 30 bis 32 hellgrau unterlegter Zeitabschnitt). Danach pendelten sie sich jedoch wieder auf dem vorherigen niedrigen Niveau ein.

Bei beiden Tieren ist schon vor einem Anstieg der Zellzahl, eine Erhöhung des **Lactoferringehaltes** in der Milch zu beobachten (Abb. 30). Bei Kuh 779 ist in der Woche vor der ersten Zellzahlspitze, wo noch 100.000 Zellen/ml gemessen wurden, ein Anstieg auf ca. 380 µg Lf/ml zu sehen. Höchstwerte des Lactoferrins über ein Milligramm (1.250 µg/ml) werden dann zeitgleich mit dem Erreichen der ersten Zellzahlspitze gemessen. Danach sinken die Lactoferrinkonzentrationen langsamer als die Zellzahl in der Milch ab. In der 26. LW, welches der Woche vor der zweiten Erhöhung der Zellzahl entspricht, wird ein Lactoferringehalt von 800 µg/ml gemessen. Auch hier sinken die Konzentrationen nur langsam wieder ab.

Im Gegensatz dazu hat die Kuh Nr. 813 über den ganzen dargestellten Zeitraum erhöhte Lactoferrinkonzentrationen in der Milch. Schon drei Woche vor der akuten Mastitis steigen die Werte auf über 400 µg/ml und erreichen ihre Spitze in der Woche nach der erhöhten Zellzahl mit 878 µg Lf/ml. Danach pendeln die Konzentrationen von Woche zu Woche zwischen einem Wert um 300 µg/ml und 700 - 850 µg/ml.

Der Laktationsverlauf der Lactoferrinkonzentration in Milch gesunder Kühe ist in Kapitel 3.2.1.2.1 dargestellt.

Die **IGFBP-2**-Konzentrationen in der Milch steigen während der akuten Mastitis bei beiden Tieren an, aber zeigen auch danach eine steigende Tendenz (Abb. 30). Vor der Erhöhung der Zellzahl liegen hier die Gehalte in der Milch zwischen 20 und 30 ng/ml und erreichen während der akuten Entzündung eine Konzentration von 40 ng/ml. Obwohl nach der akuten Erkrankung die Zellzahlen wieder auf unter 100.000 Zellen/ml sinken, erreichen die Konzentration an IGFBP-2 in der Milch bei beiden Tieren immer wieder erhöhte Werte um die 40 ng/ml.

Das Verhalten von IGFBP-2 in der Milch gesunder Kühe über eine Laktation ist in Kapitel 3.2.1.3.1 aufgeführt.

Der **Lactose**gehalt sinkt vor bzw. während der akuten Mastitis von ca. 4,45 % auf bis zu 3,5 % bei Kuh 779 und von 4,93 auf 4,7 % bei Kuh 813 ab (Abb. 31).

Die Konzentration des **Milchfettes** (Abb. 31) schwankt bei Kuh 779 sehr stark. In der Woche extrem hoher Zellzahl steigt das Milchfett ebenfalls an (4,47 %, 11. LW und 4,83 %, 28. LW) und sinkt in den Wochen zwischen den Mastitiden teilweise auf ein sehr niedriges Niveau von um die 2,5 % ab. Nach der zweiten starken Zellzahlerhöhung ist kein so starkes Absinken mehr zu beobachten. In der 40. LW beträgt der Milchfettgehalt 4,51 %. Obwohl bei Kuh 813 die Fettgehalte nicht so stark variieren, wiederholt sich das Bild hier in etwa. In der Woche der akuten Mastitis liegt hier der Fettgehalt bei 5,5 % im Gegensatz zu den Wochen davor und danach (4,75 - 4,9 %) mit Ausnahme der 40. Laktationswoche, wo der Fettgehalt bei 5,45 % liegt.

Von einem Niveau von 3,47 % startend, sinkt der **Milchproteingehalt** (Abb. 31) bei Kuh 779 vor dem ersten dargestellten Mastitisfenster in der 5. LW stark auf 2,4 % ab. Ab diesem Zeitpunkt steigt der Proteingehalt bis auf ein Niveau von 4,15 % in der 40. LW an. Kuh 813 zeigt in den Wochen vor und nach der akuten Mastitis einen relativ konstanten Proteingehalt von 3,85 - 3,96 % in der Milch. In der Woche mit der höchsten Zellzahl steigt das Protein auf 4,07 % an.

Der **Harnstoff** (Abb. 32) weist in der ersten Periode erhöhter Zellzahlen bei Kuh Nr. 779 einen hohen Gehalt um Werte über 350 ppm in der Milch auf. Nach der zweiten Phase erhöhter Zellzahlen sinkt er allerdings auf bis 90 ppm ab, und steigt im Anschluss daran wieder leicht bis 280 ppm (40. LW) an. Bei Kuh 813 schwanken die Werte zwischen 170 und 300 ppm. In der Woche der Mastitis wird ein Wert von 286 ppm ermittelt mit einem Einbruch auf 170 ppm vor und auch nach dieser Spitze.

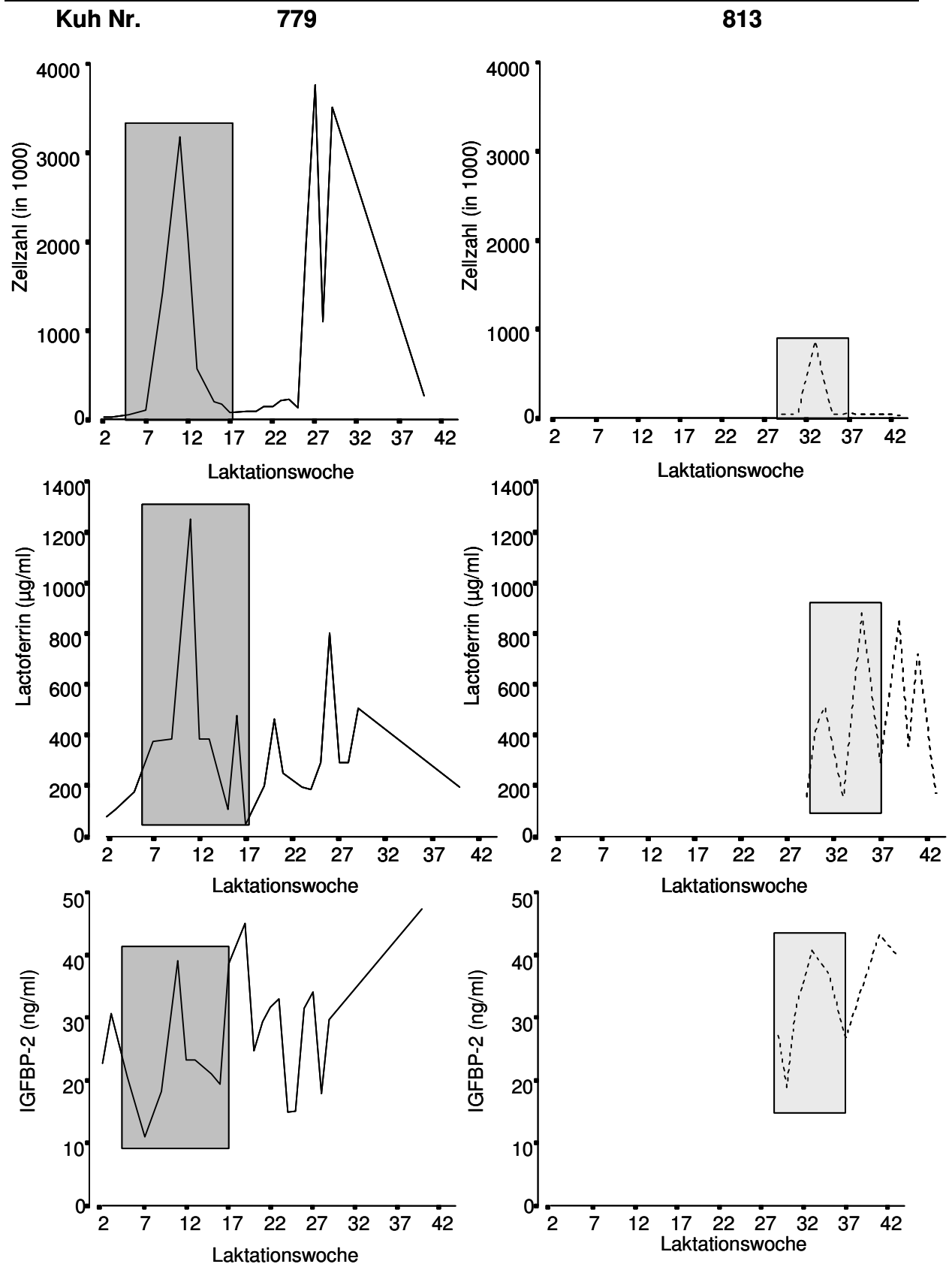


Abbildung 30: Verhalten von Zellzahl, Lactoferrin und IGFBP-2 im Verlauf einer Mastitis (grau hinterlegter Bereich), dargestellt an Hand von zwei Kühen:

779: durchgezogene Linie; akute Mastitis dunkelgrau hinterlegt

813: gestrichelte Linie; akute Mastitis hellgrau hinterlegt

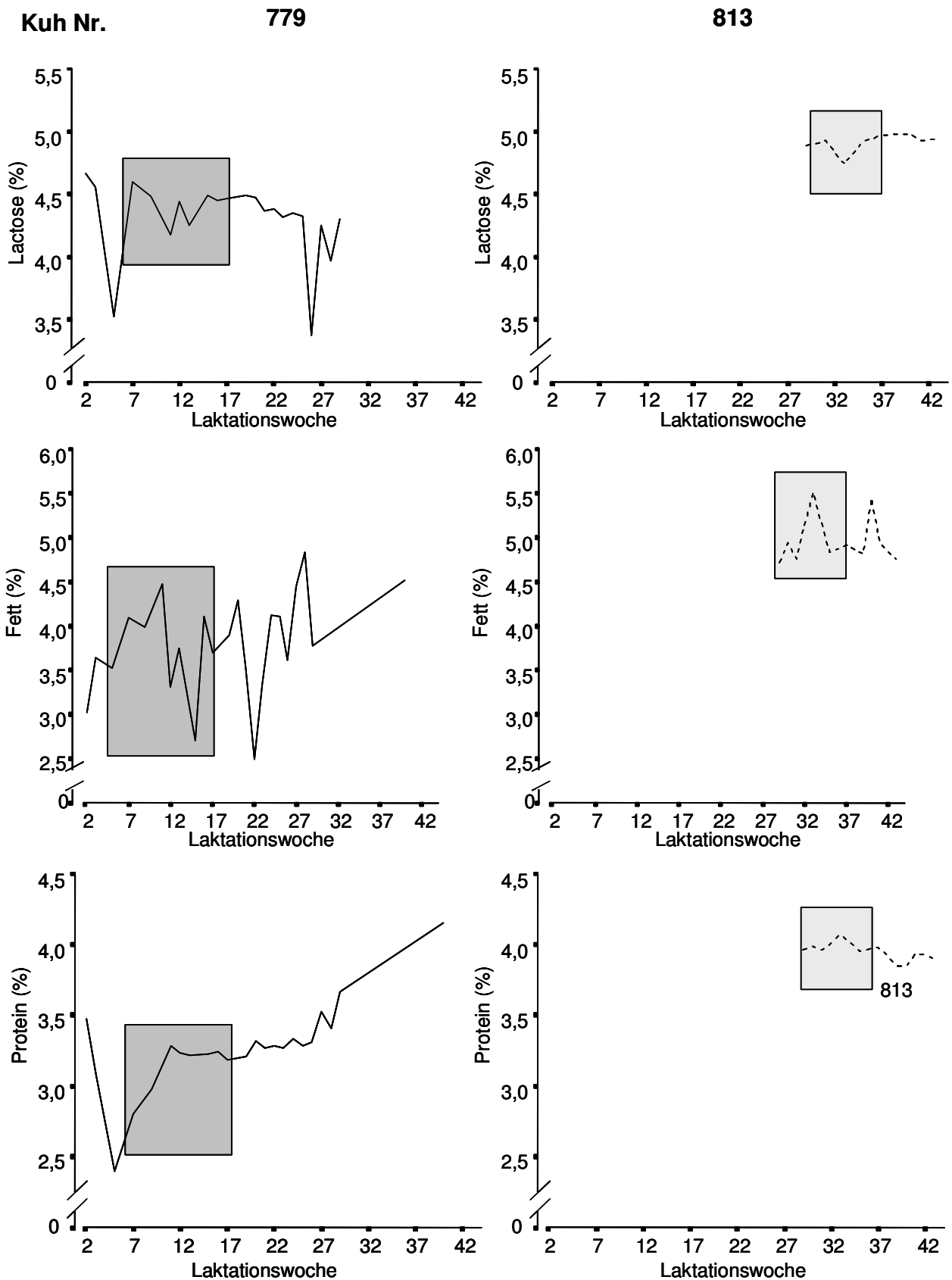


Abbildung 31: Verhalten von Lactose, Fett und Protein im Verlauf einer Mastitis (grau hinterlegter Bereich), dargestellt an Hand von zwei Kühen:

779: durchgezogene Linie; akute Mastitis dunkelgrau hinterlegt

813: gestrichelte Linie; akute Mastitis hellgrau hinterlegt

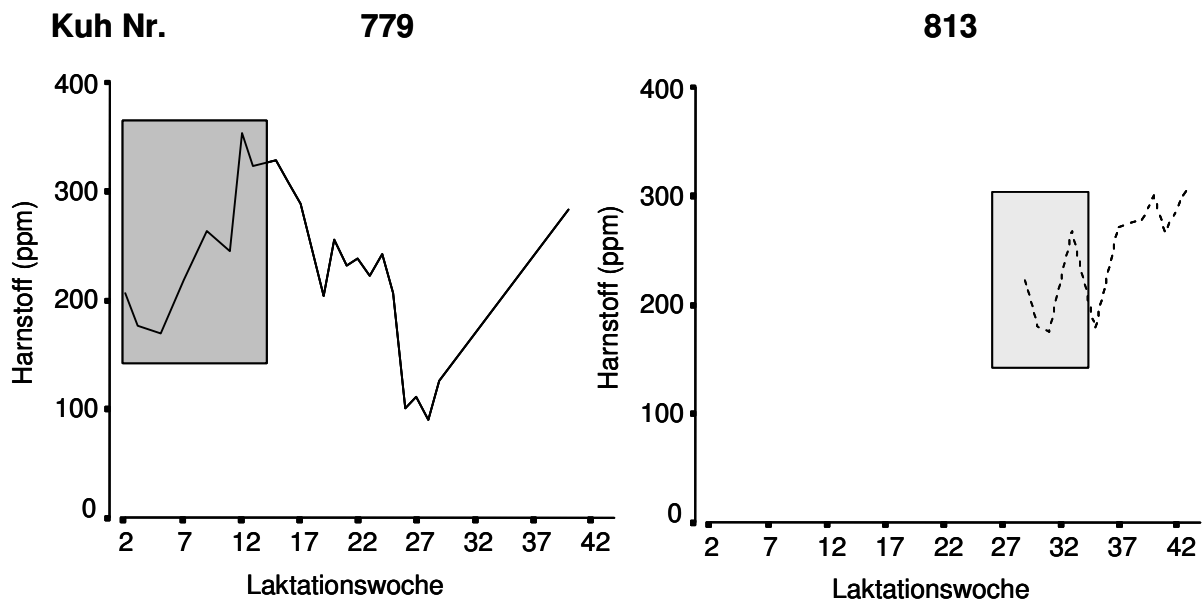


Abbildung 32: Verhalten von Harnstoff im Verlauf einer Mastitis (grau hinterlegter Bereich), dargestellt an Hand von zwei Kühen:

779: durchgezogene Linie; akute Mastitis dunkelgrau hinterlegt

813: gestrichelte Linie; akute Mastitis hellgrau hinterlegt

3.2.1.5 Verteilung der Zellzahlen auf die verschiedenen Melkgruppen der Milchkühe

Da in diesen Versuch die Daten von Tiere aus verschiedenen Melkgruppen einfließen, wird hier die Verteilung der Zellzahlen auf die verschiedenen Gruppen dargestellt (Abb. 33).

Es zeigt sich eine Abhängigkeit ($p < 0,001$) der Zellzahlklasse von der Melkgruppe. Bis auf die Tiere der Gruppen I und II, die im Melkkarussell gemolken wurden, weisen alle einen Unterschied ($p < 0,001$) beim paarweisen Vergleich zwischen den Melkgruppen auf. Auch innerhalb der Versuchsgruppe I, die sich aus den Tieren des Automatischen Melksystems und des Melkkarussells zusammensetzt und dessen Tiere wöchentlich beprobt wurden, besteht ein Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Tieren der verschiedenen Melksysteme.

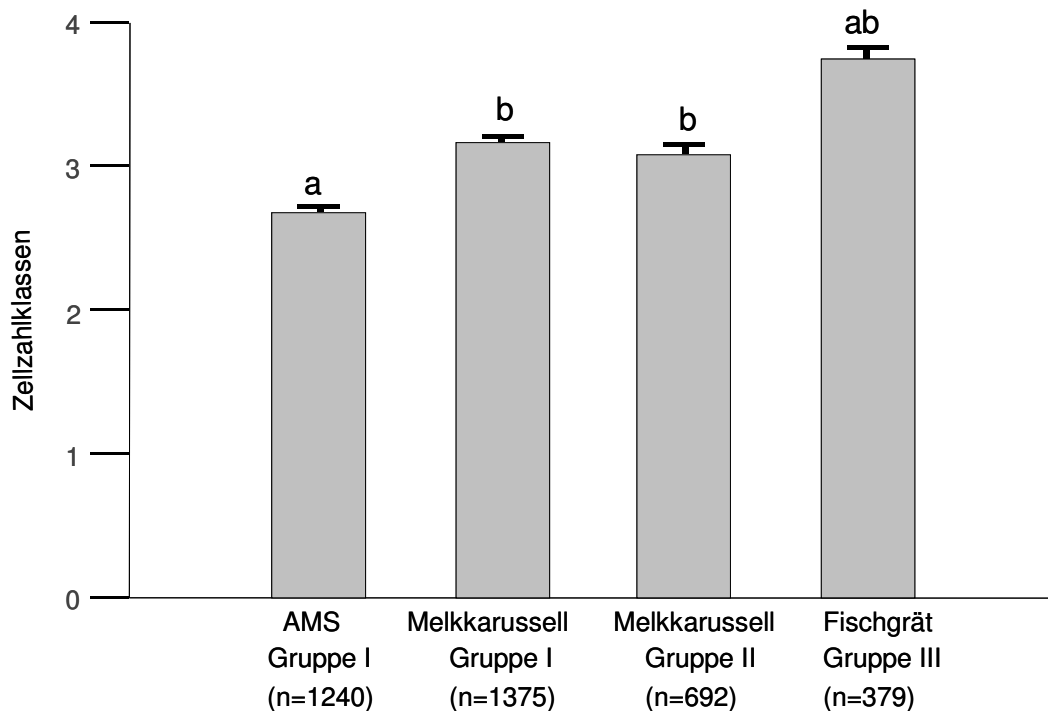


Abbildung 33: Zellzahlklassen in den verschiedenen Melk- bzw. Versuchsgruppen ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) über den Versuchszeitraum (Januar bis September 2001).

ab = Unterschiede zwischen den Melkgruppen: $p < 0,001$

n = Anzahl der Proben

Insgesamt weisen die Tiere, die im AMS gemolken werden, die niedrigste durchschnittlichste Zellzahlklasse mit $2,67 \pm 0,04$ auf. Die im Melkkarussell gemolkenen Tiere aus der Gruppe I haben eine Zellzahlklasse von $3,16 \pm 0,05$ und die aus der Versuchsgruppe II von $3,08 \pm 0,07$. Bei den Tieren der Gruppe III, deren Daten nur aus der Milchleistungsprüfung stammen und die keine homogene Gruppe von Versuchskühen darstellt, ist ein wesentlich höherer Gehalt an Zellen in der Milch, Zellzahlklasse $3,74 \pm 0,09$, nachgewiesen.

Die Altersstruktur der Tiere variiert zwischen den Melkgruppen. So werden in der Gruppe I jeweils Tiere mit vergleichbarer Laktationsnummer von $2,31 \pm 0,04$ (AMS) und $2,54 \pm 0,04$ (Melkkarussell) gemolken. In Versuchsgruppe II sind die Tiere im Durchschnitt in der $2,90 \pm 0,08$ Laktation und in der Gruppe III steigt die Anzahl der Laktationen noch mal auf $2,94 \pm 0,11$.

3.2.2 Untersuchungen der Ziegenmilch bezüglich ihrer Inhaltsstoffe, dem Lactoferrin- und dem IGFBP-2-Gehalt

3.2.2.1 Milchinhaltsstoffe und Milchleistung der Ziegen im Verlauf der Laktation

In den verschiedenen Laktationsstadien der Ziegen im Jahr 2001 ($n = 18$) wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Mittelwerte der untersuchten Milchinhaltsstoffe und der täglichen Milchleistung ermittelt.

Tabelle 8: Milchinhaltsstoffe und Milchleistung ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in den vier Laktationsstadien der Ziege

Laktationsstadium	I	II	III	IV	
LW	0 – 5	6 – 16	17 – 27	28 – Ende	p*
Protein (%)	4,13 $\pm 0,15$	3,73 $\pm 0,09$	3,61 $\pm 0,09$ a	4,08 $\pm 0,10$ b	ab: = 0,002
Fett (%)	3,39 $\pm 0,06$ a	3,15 $\pm 0,04$ b	3,08 $\pm 0,03$ b	3,62 $\pm 0,07$ c	ab: = 0,012 bc: < 0,001
Zellzahl (in 1000)	438 $\pm 69,3$	418 $\pm 73,6$	595 $\pm 85,6$ a	1894 ± 299 b	ab: < 0,001
Milch (kg/Tag)	4,03 $\pm 0,27$	4,06 $\pm 0,29$	4,79 $\pm 0,23$ a	3,06 $\pm 0,20$ b	ab: < 0,001

* paarweiser Vergleich der **jeweils aufeinander folgenden** Laktationsstadien

Milchmenge, Protein, Fett und Zellzahl sind abhängig vom Stadium der Laktation ($p \leq 0,001$) (Tab. 8).

Während zu Beginn der Laktation noch keine Änderung in der **Milchleistung** zu beobachten ist, fällt die tägliche Milchmenge zwischen dem dritten und vierten Stadium dann ab ($p < 0,001$).

Der **Fett**-Gehalt der Milch fällt vom ersten auf das zweite Laktationsstadium ab ($p = 0,012$). Daraufhin ist erst zum Ende der Laktation, d. h. vom dritten auf das vierte Laktationsstadium, ein erneuter Anstieg des Fettes in der Milch ($p < 0,001$) zu beobachten. Auch der **Protein**-Gehalt ($p = 0,002$) sowie die **Zellzahl** ($p < 0,001$) steigen vom dritten auf den letzten Laktationsabschnitt an.

Der Verlauf von **Milchmenge**, **Protein-** und **Fettgehalt** sowie **Zellzahl der Milch** während der Laktation 2001 sind in der Abbildung 34 dargestellt. Dabei sind die Einzelwerte durch Kreuze gekennzeichnet. Darüber hinaus wird die daraus geschätzte Regressionskurve, die nach dem quadratischen Modell $y = b_0 + b_1x + b_2x^2$ (BÜHL & ZÖFEL, 2000) berechnet wird, dargestellt. Die jeweiligen Formeln sind in der Abbildung aufgeführt.

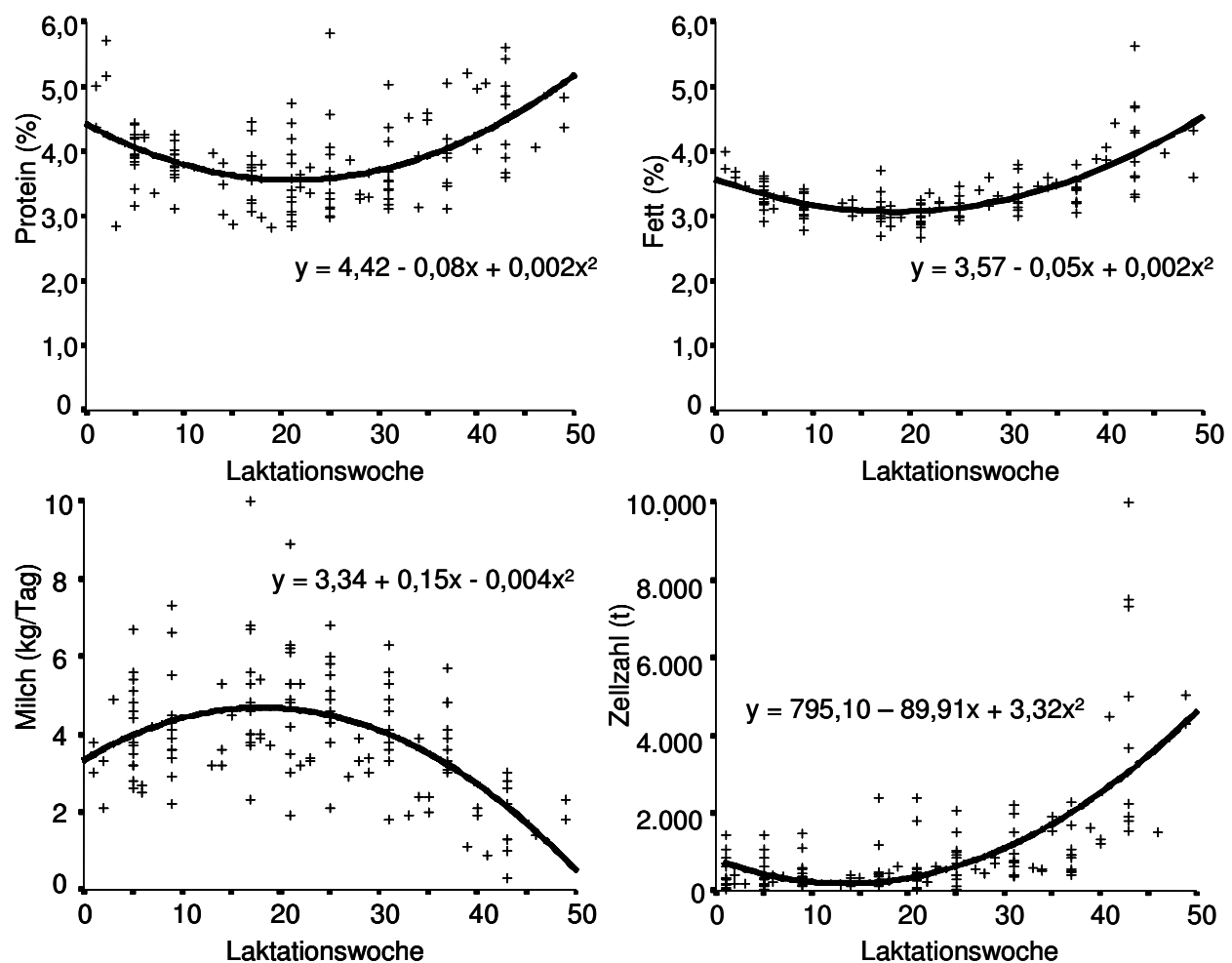


Abbildung 34: Verlauf von Protein, Fett und Zellzahl in Ziegenmilch sowie der täglichen Milchleistung in der Laktation 2001, dargestellt mit den Gleichungen der entsprechenden Regressionskurven

Die tägliche Milchleistung steigt ausgehend von durchschnittlich 3,34 kg bis um die 20. Laktationswoche auf ein geschätztes Niveau von 4,7 kg an und sinkt von da an bis zum Ende der Laktation auf 2 kg/Tag (45. LW) ab. Die Regressionskurven der vom LKV Rheinland ermittelten Inhaltsstoffe zeigen dazu einen eher inversen Bezug.

Der Proteingehalt in der Milch sinkt von 4,3 % (1. LW) auf ein geschätztes Niveau von 3,6 % in der 20. LW und steigt zur 45. LW bis auf 4,8 % an. Bei der Schätzung des Fettgehaltes der Milch ergibt sich aus der Regressionskurve ein Ausgangswert von 3,5 % in der ersten Laktationswoche, der in der 20. LW auf 3,1 % absinkt und am Ende der Laktation jedoch auf 4,1 % Fett in der Milch ansteigt. Bei der Beobachtung der Zellzahlen in der Ziegenmilch der Tiere, die nicht an klinischen Symptomen einer Mastitis leiden, ergibt sich eine Kurve, die ebenfalls invers zur Milchmenge verläuft und vor allem am Ende der Laktation stark ansteigt. Ausgehend von 708.000 Zellen/ml sinkt der Gehalt in der 13. LW auf rund 187.000 ab, steigt im Laufe der Laktation bis zur 25. LW auf rund 622.000 Zellen/ml an und erreicht in der 45. LW über 3,4 Millionen Zellen pro ml Milch.

Ein jahreszeitlicher Vergleich der Parameter entspricht den Ausführungen zur Laktation, da die Ziegen saisonal zum Jahreswechsel ablammen und somit alle weitgehend synchron laktieren.

3.2.2.2 Lactoferrin in Ziegenmilch

3.2.2.2.1 Lactoferrinkonzentration im Laktationsverlauf

Bei der Betrachtung der Lactoferrinkonzentrationen in der Milch der 18 untersuchten Ziegen im Jahr 2001 zeigt sich im ersten (I = LW 0 - 5) und letzten (IV = LW 28 - 39) Laktationsstadium ein Einfluss ($p \leq 0,001$) der Laktationswoche auf die Konzentration. Am Anfang der Mittlaktation (II = LW 6 - 16) ist ebenfalls noch ein Einfluss nachweisbar ($p < 0,05$). Im anschließenden dritten Laktationsstadium (LW 17 - 27) ist jedoch kein Zusammenhang zwischen der Lactoferrinkonzentration und der Laktationswoche mehr zu beobachten.

Eine Berechnung über die Laktationswoche 39 hinaus war nicht möglich, da nach diesem Zeitpunkt die Tiere nach und nach trocken gestellt wurden.

Die Lactoferrinkonzentration (Abb. 35) fällt in der Nachlammphase (I) von $392 \pm 76,6$ $\mu\text{g/ml}$ im Kolostrum auf etwa 10 $\mu\text{g/ml}$ in der 3. LW stark ab und hält dieses Niveau bis um die 10. LW. Danach steigt sie im mittleren Abschnitt der Laktation bis zur 14. LW auf $26,2 \pm 10,4$ $\mu\text{g/ml}$ an, pendelt sich aber schon ab der 15. bis zur 20. LW auf einem Niveau von etwa 13 $\mu\text{g/ml}$ ein. Danach ist ein langsamer Anstieg bis auf $23,9 \pm 4,69$ in der 32. LW zu beobachten. Ab hier steigt die

Konzentration in der Milch dann kontinuierlich und stark bis zum Ende der Laktation an (39. LW: $61,3 \pm 11,8 \mu\text{g/ml}$; 48. LW: $152 \pm 68,8 \mu\text{g/ml}$). Im Anhang sind die den einzelnen Laktationswochen zugeordneten Werte aufgeführt (Tabelle 11).

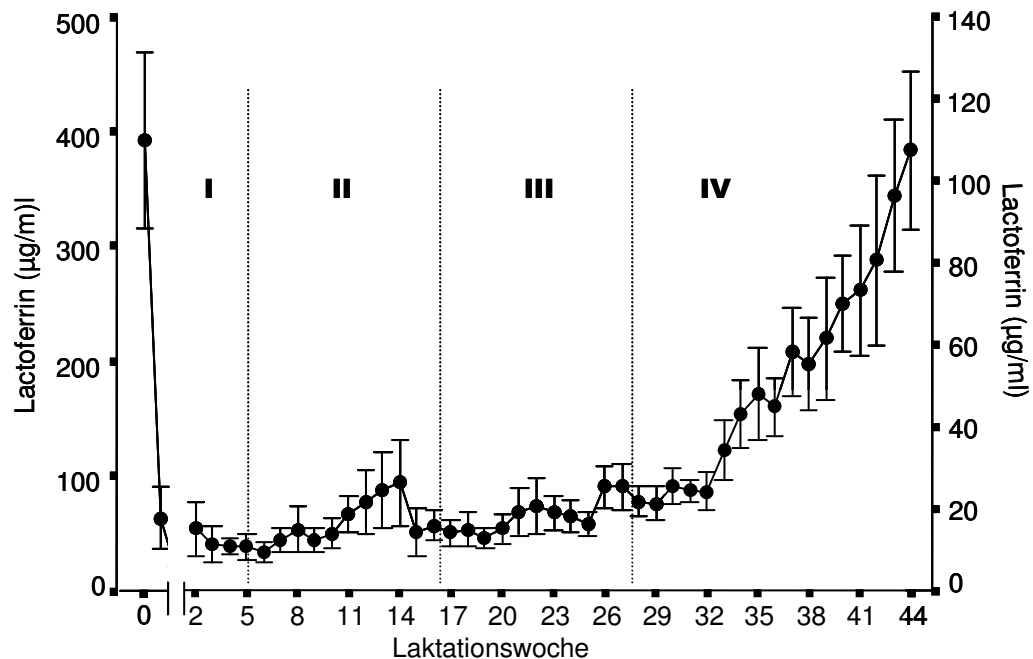


Abbildung 35: Verlauf der Lactoferrinkonzentration ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in Ziegenmilch während der Laktation. Daten aus der Erhebung zur Laktation 2001, $n = 18$ Ziegen.

Die Konzentrationen in den ersten zwei Wochen sind auf der linken Y-Achse abzulesen, ab der 2. Laktationswoche folgt die Darstellung über die rechte Achse.

Das Lactoferrin zeigt über alle Laktationsstadien betrachtet eine Abhängigkeit vom Laktationsstadium ($p < 0,001$).

Zwischen dem ersten (0 – 5. LW) und zweiten Abschnitt der Laktation (6. – 16. LW) fällt die Konzentration in der Milch von $85,2 \pm 19,3$ auf $16,6 \pm 1,78 \mu\text{g Lf/ml}$ ab, was sich mit $p = 0,003$ absichern lässt. Innerhalb des mittleren Laktationsabschnittes veränderte sich der Lactoferringehalt in der Milch nicht. Zum Ende der Laktation, zwischen dem III. (17. – 27. LW) und dem IV. (28. LW – Ende) Stadium, ist ein erneuter Anstieg von $17,4 \pm 1,40$ auf $56,3 \pm 3,64 \mu\text{g Lf/ml}$ ($p < 0,001$) zu beobachten.

Das Alter der Tiere wird über die Laktationsnummer beschrieben. Es wurden im Rahmen dieses Versuches zwei Gruppen von Tieren verglichen. Die erste setzt sich aus 10 Tieren zusammen, die in der 2. Laktation gemolken wurden und die zweite Gruppe aus 8 Tieren, die in der 3. ($n = 6$), 4. ($n = 1$) bzw. 5. ($n = 1$) Laktation waren.

Bei der Analyse der Messwiederholungen nach Greenhouse-Geisser zeigt sich dabei kein Einfluss des Alters auf den Lactoferringehalt.

In der Laktation des Jahres 2000 ($n = 10$) liegen für das erste Laktationsstadium keine Daten vor, weil die Probennahme erst zu Beginn der Mittlaktation begonnen hat (6. LW). Über die drei untersuchten Stadien bestätigt sich der Einfluss des Laktationszeitraumes ($p < 0,001$). Zwischen den beiden Stadien der mittleren Laktation ist noch kein signifikanter Unterschied zu beobachten, aber zum Ende der Laktation im letzten Laktationsstadium steigt die Konzentration des Lactoferrins auch hier stark an, was sich auf einem Niveau von $p < 0,001$ absichern lässt.

Auffällig bei der Betrachtung der Einzelwerte der Ziegen (Tabelle 12 im Anhang) ist, dass die Tiere unterschiedliche Lactoferrin-Niveaus zeigen. Dies zeigt sich vor allem im zweiten Laktationsabschnitt, wo der Gehalt nach der Nachlammphase auf ein relativ konstantes Niveau abgesunken ist. Während eine Gruppe von Ziegen in den Laktationen 2000 und 2001 in diesem Abschnitt nur wenige μg Lf pro ml Milch aufweist, zeigen die Tiere einer anderen Gruppe zwischen 15 und 20 μg Lf/ml Milch. Mehrere Tiere der Laktation 2000 wiesen sogar zwischen 50 und 70 μg Lf pro ml Milch sowie ein Tier der Laktation 2001 über 40 μg Lf pro ml Milch auf. Diese Unterschiede lassen sich nicht unmittelbar mit unterschiedlichen Laktationsnummern in Verbindung bringen. Allerdings weisen eher Tiere mit fortgeschrittener Laktationsnummer höhere Lf-Gehalte in der Milch auf.

3.2.2.2 Lactoferrinkonzentration in Bezug zur Trächtigkeit

Lactoferrin wurde in der Ziegenmilch ebenfalls hinsichtlich eines Zusammenhangs mit der Trächtigkeit ausgewertet. Dabei wird zwischen Tieren unterschieden, die normal (26. - 32. LW) tragend bzw. trotz mehrmaligen Belegungen nicht tragend wurden und Tieren, die erst später in der Laktation erfolgreich belegt wurden.

Bei den normal tragend gewordenen Tieren steigt der Lactoferringehalt in der Ziegenmilch (Abb. 36) von dem Zeitfenster vor zu nach der Konzeption an ($p < 0,001$). In den Wochen vor der Konzeption wird eine mittlere Lactoferrinkonzentration von $18,9 \pm 1,62 \mu\text{g/ml}$ Ziegenmilch gemessen. In den

Wochen nach der Konzeption steigt der Gehalt an Lactoferrin auf das Doppelte in Höhe von $38,4 \pm 3,02 \mu\text{g/ml}$ an.

Das gleiche Bild zeigt sich auch bei den nicht tragend gewordenen Tieren. Hier weisen die entsprechenden Fenster der Laktation ebenfalls einen ($p < 0,001$) Anstieg des Lactoferrins von $14,4 \pm 1,84$ auf $32,0 \pm 6,01 \mu\text{g/ml}$ auf.

Im Gegensatz dazu ist bei den spät tragend gewordenen Tieren kein Unterschied zwischen den beiden Zeitabschnitten zu beobachten. Vor der Konzeption beträgt der mittlere Lactoferringehalt $55,9 \pm 9,63 \mu\text{g/ml}$ und nach der Konzeption werden $58,0 \pm 7,87 \mu\text{g/ml}$ Ziegenmilch gemessen.

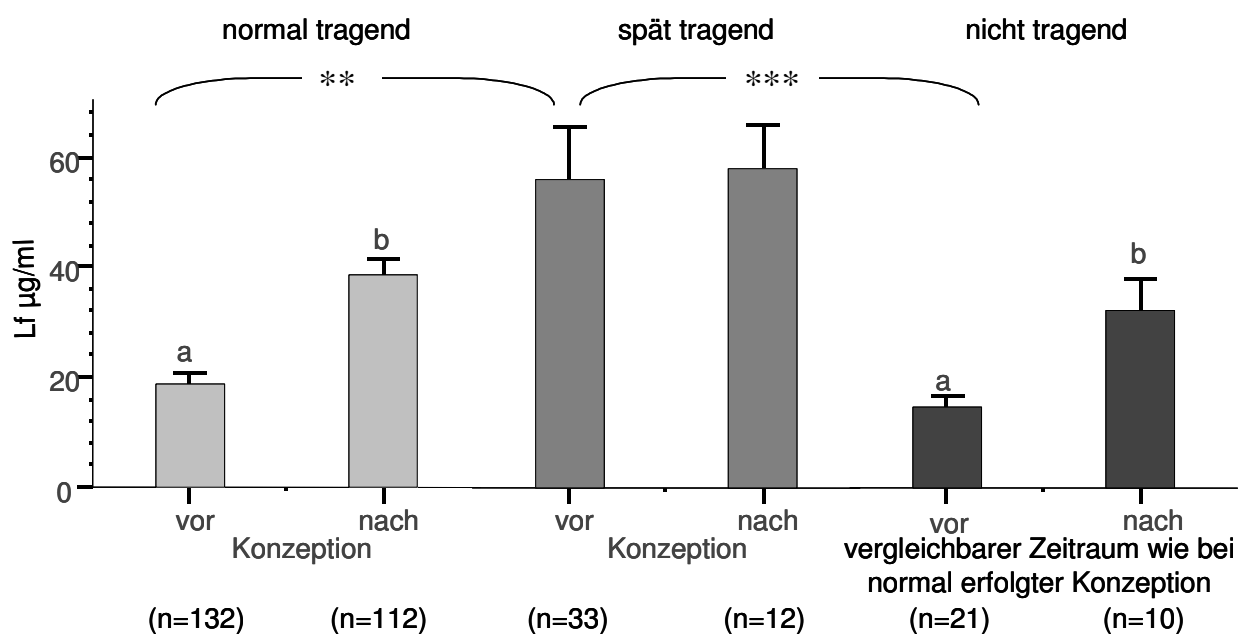


Abbildung 36: Lactoferrinkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in Ziegenmilch in den Wochen vor (-10 bis -1) und nach (0 bis 10) der Konzeption bzw. bei nicht tragend gewordenen Tieren den entsprechenden Laktationsfenstern wie normal tragende Tiere (17. - 27. LW und 28. - 37. LW).

Hellgraue Balken stellen die Ziegen dar, die normal tragend (27. - 32. LW) wurden; dunkelgraue Balken die, die spät in der Laktation (> 35. LW) tragend wurden und schwarze Balken die Ziegen, die nicht tragend wurden.

ab = Unterschiede innerhalb der Gruppen: $p < 0,001$

* = Unterschiede zwischen den entsprechenden Zeitabschnitten der Gruppen: ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

n = Anzahl der gemessenen Proben

Bei einem Vergleich der drei Gruppen zeigt sich, dass in dem Zeitraum vor der Konzeption bzw. dem entsprechenden Laktationsfenster nicht tragend gewordener Tiere ein Unterschied ($p < 0,001$) im Lactoferringehalt der Milch zwischen den Gruppen besteht. Nach der Konzeption normal und spät tragend gewordener Ziegen bzw. dem Laktationsabschnitt 28. - 37. LW nicht tragend gewordener Tiere ist kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr zu beobachten.

Zwischen den vergleichbaren Zeitfenstern normal und nicht tragend gewordener Tiere ist kein Unterschied nachweisbar. Die absoluten Werte liegen jeweils eng beieinander. Bei einem Vergleich der normal und spät tragend gewordenen Tiere ist vor der Konzeption ein Unterschied ($p = 0,002$) zu beobachten. Bei einem Vergleich der nicht tragend und den spät tragend gewordenen Tieren ist dieser Unterschied sogar noch etwas stärker ($p < 0,001$). Insgesamt ist bei den spät tragend gewordenen Tieren der Lactoferringehalt in der Milch in beiden Zeitfenstern wesentlich höher als in den entsprechenden Zeitfenstern der anderen Gruppen.

Betrachtet man die Darstellung der drei Besamungsgruppen in dem zur Trächtigkeit untersuchten Zeitfenster der Laktation von der 16. bis zur 39. Laktationswoche (Abb. 37), so zeigen die Gruppen ein vergleichbares Bild beim Verlauf des Lf-Gehaltes in der Milch. Bei allen Gruppen steigen nach der 25. LW die Werte stark bis zum Ende der Laktation an. Bei den spät tragend gewordenen Tieren, sind größere tierindividuelle Unterschiede zu beobachten. Das nicht tragend gewordene Tier zeigt im Verlauf der Laktation noch mal Einbrüche in der tendenziell steigenden Konzentration.

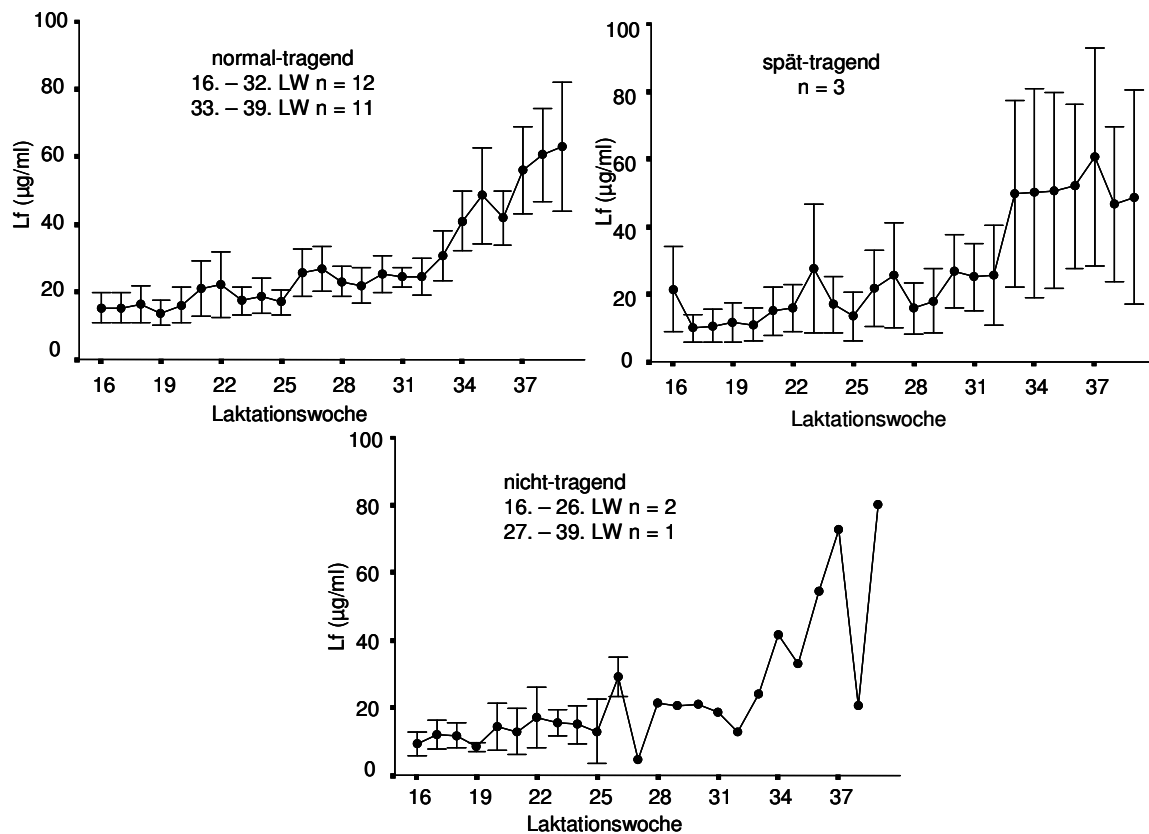


Abbildung 37: Darstellung des Lactoferrin-Gehaltes ($\mu\text{g/ml}$) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in der Milch von Ziegen in den Laktationswochen 16 bis 39 der drei verschiedenen Trächtigkeitsgruppen: normal tragend (27. - 32. LW) gewordene Tiere, spät in der Laktation (> 35. LW) tragend gewordene und nicht tragend gewordene Tiere.

n = Anzahl Tiere

3.2.2.3 IGFBP-2 in Ziegenmilch

3.2.2.3.1 IGFBP-2-Konzentration im Laktationsverlauf

Bei der Betrachtung der IGFBP-2-Konzentrationen in der Ziegenmilch von 18 Tieren im Laktationsverlauf des Jahres 2001 zeigt sich ein Einfluss der Laktationswoche innerhalb und zwischen ($p < 0,001$) den betrachteten Laktationsstadien auf die IGFBP-2-Konzentration.

Dabei ist im ersten (0 - 5. LW) und letzten (28. LW - Ende der Laktation bei LW 39) Laktationsstadium ein Einfluss ($p < 0,01$) der Laktationswoche auf den IGFBP-2-Gehalt der Ziegenmilch zu beobachten. In der Mittlaktation ist zu Beginn (6. - 16. LW)

kein und in den Laktationswochen 17 bis 27 ein geringer Einfluss der Laktationswoche auf die IGFBP-2-Konzentration in der Milch der Ziegen ($p < 0,05$) nachweisbar.

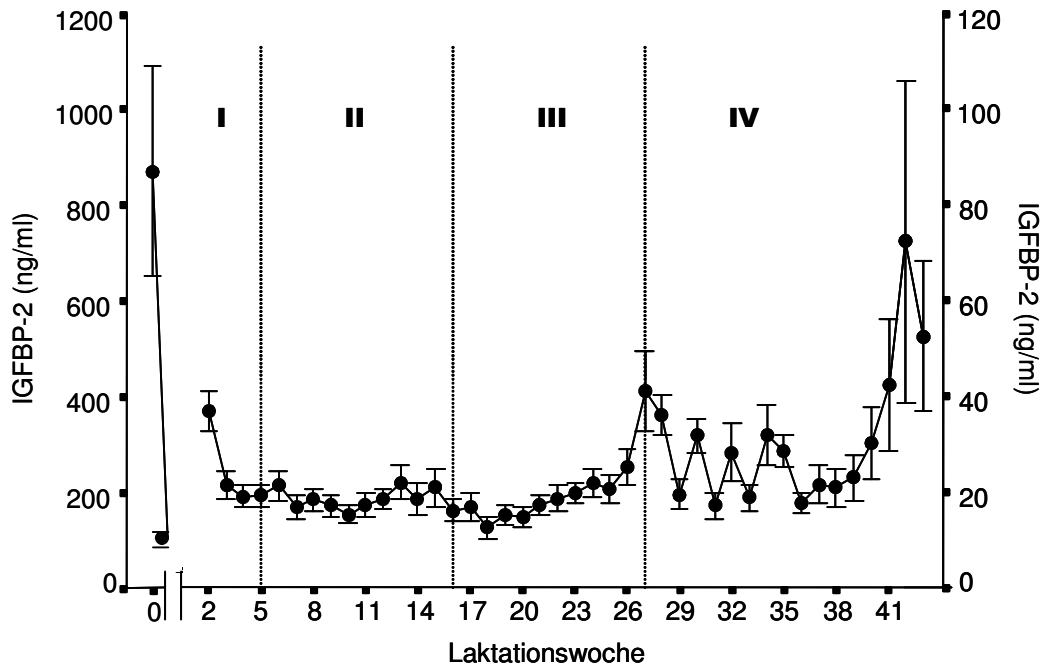


Abbildung 38: Verlauf der IGFBP-2-Konzentration ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in Ziegenmilch während der Laktation. Daten aus der Erhebung zur Laktation 2001, $n = 18$ Ziegen.

Die Konzentrationen in den ersten zwei Wochen sind auf der linken Y-Achse abzulesen, ab der 2. Laktationswoche folgt die Darstellung über die rechte Achse.

Im Kolostrum (Abb. 38) finden sich IGFBP-2-Konzentrationen von 870 ± 220 ng/ml. Diese sinken dann ab und zwischen der 3. bis zur 25. LW schwankt der Gehalt zwischen 14 und 21 ng/ml. Zur 27. LW steigt das IGFBP-2 auf $41,0 \pm 8,40$ ng/ml an und verläuft dann schwankend zwischen 19 und 31 ng/ml bis zur 35. LW. Danach bleibt es bis zur 39. LW auf einem Niveau von 17 bis 22 ng/ml, steigt dann jedoch stark an. Am Ende der Laktation können Konzentrationen von bis zu 366 ± 246 (44. LW) gemessen werden. Im Anhang sind die den einzelnen Laktationswochen zugeordneten Werte aufgeführt (Tabelle 11).

Bei einem Vergleich der Laktationsstadien untereinander ist vom ersten auf das zweite Laktationsstadium ein Absinken der IGFBP-2-Konzentrationen in der Milch von $174 \pm 47,7$ auf $18,3 \pm 0,83$ ng/ml zu beobachten ($p < 0,001$). Zum Ende der

Laktation steigt der Gehalt an IGFBP-2 in der Milch wiederum von $18,1 \pm 0,87$ ng/ml im dritten Stadium auf $53,2 \pm 10,3$ ng/ml im vierten Stadium an ($p < 0,001$).

Das Alter hat zu keinem Zeitpunkt Einfluss auf den IGFBP-2-Gehalt in der Milch während der untersuchten Laktation 2001.

3.2.2.3.2 IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Trächtigkeit

Bei der Darstellung der IGFBP-2-Gehalte in der Milch von Ziegen (Abb. 39) in Zusammenhang mit der Trächtigkeit zeigt sich in den verschiedenen Gruppen ein differenziertes Bild.

Die normal tragend gewordenen Tiere und die nicht tragend gewordenen Tiere unterscheiden sich zwischen den beiden Zeitfenstern vor und nach der Konzeption, bzw. bei dem für die nicht tragend gewordenen Tiere entsprechendem Fenstern der Laktation, nicht voneinander.

Die normal tragend gewordenen Ziegen haben vor der Konzeption einen IGFBP-2-Gehalt von $22,7 \pm 1,29$ ng/ml in der Milch. In den Wochen nach der Konzeption beträgt er $20,3 \pm 1,30$ ng/ml.

Bei den nicht tragend gewordenen Tiere beträgt die IGFBP-2-Konzentration in den entsprechenden Wochen anfangs $11,5 \pm 0,76$ ng/ml und später $18,6 \pm 3,42$ ng/ml.

Die Gruppe der spät tragend gewordenen Tiere weist im IGFBP-2-Gehalt der Milch vor und nach der Konzeption einen Abfall ($p < 0,05$) der Konzentration von $53,7 \pm 8,10$ auf $28,5 \pm 5,39$ ng/ml auf. Hierbei ist jedoch, die geringe Anzahl untersuchter Milchproben ($n = 12$) zu berücksichtigen. Da die Tiere erst sehr spät im Jahr tragend wurden, entspricht diese Zeit dem Ende der Laktation. Dem Ende der Milchprobennahme und den großen tierindividuellen Unterschieden in der IGFBP-2-Konzentration müssen hier Rechnung getragen werden.

Vor der Konzeption ist zwischen den Gruppen ein Einfluss des Trächtigkeitsstatus (normal/spät/nicht tragend) zu beobachten ($p < 0,001$), der jedoch nach der erfolgreichen bzw. nicht erfolgreichen Belegung nicht mehr nachzuweisen ist.

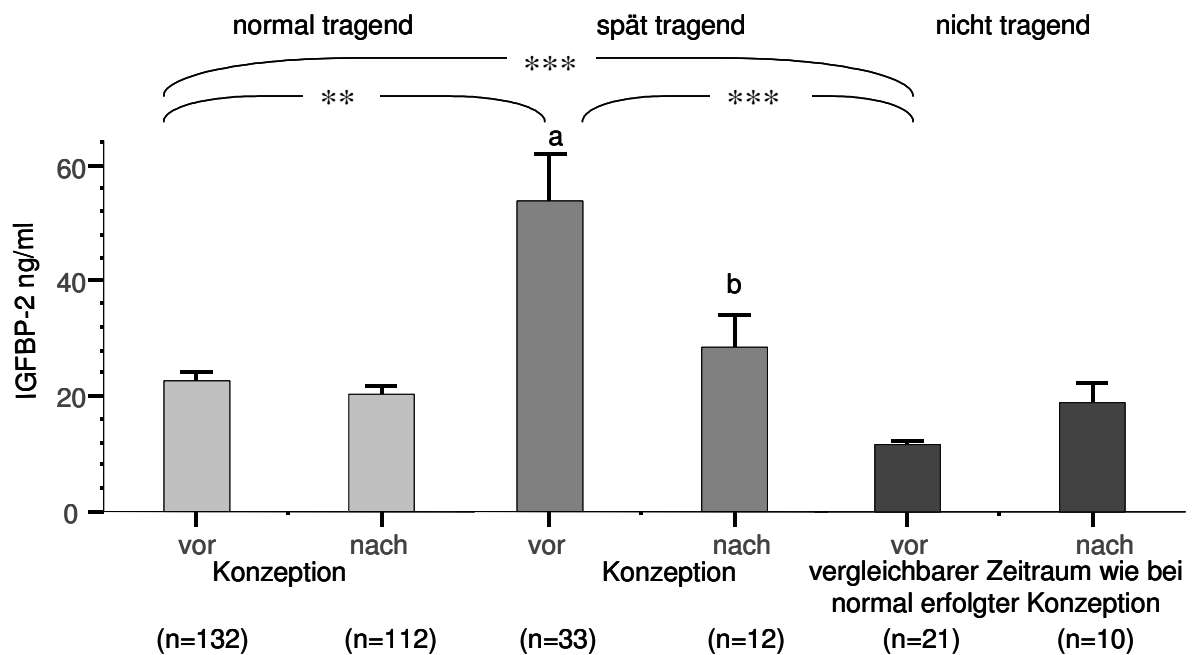


Abbildung 39: IGFBP-2-Konzentrationen (ng/ml) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in Ziegenmilch in den Wochen vor (-10 bis -1) und nach (0 bis 10) der Konzeption bzw. bei nicht tragend gewordenen Tieren den entsprechenden Laktationsfenstern wie normal tragende Tiere (17. - 27. LW und 28. - 37. LW).

Hellgraue Balken stellen die Ziegen dar, die normal tragend (27. - 32. LW) wurden; dunkelgraue Balken die, die spät in der Laktation (> 35. LW) tragend wurden und schwarze Balken die Ziegen, die nicht tragend wurden.

ab = Unterschiede innerhalb der Gruppen: $p < 0,001$

* = Unterschiede zwischen den entsprechenden Zeitabschnitten der Gruppen: ** : $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$

n = Anzahl der gemessenen Proben

Im Einzelnen zeigt ein Vergleich der IGFBP-2-Konzentrationen in der Milch von normal tragend gewordenen Tiere vor der erfolgreich verlaufenden Konzeption mit den der 17. bis 27. LW nicht tragend gewordener Tiere einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,001$). Die nicht tragend gewordenen Tiere weisen zu diesem Zeitpunkt etwa die Hälfte des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch auf wie die normal tragend gewordenen Tiere.

Im Vergleich der normal und spät tragend gewordenen Tiere weisen die spät tragend gewordenen vor der Konzeption ebenfalls höhere IGFBP-2-Konzentrationen auf ($p = 0,002$).

Betrachtet man in diesem Zusammenhang den IGFBP-2-Gehalt der einzelnen Gruppen über den Laktationsabschnitt ab der 16. Laktationswoche bis zur 39. LW, was den normalen Besamungszeitraum umfasst, so zeigt sich das in Abb. 40 dargestellte Bild.

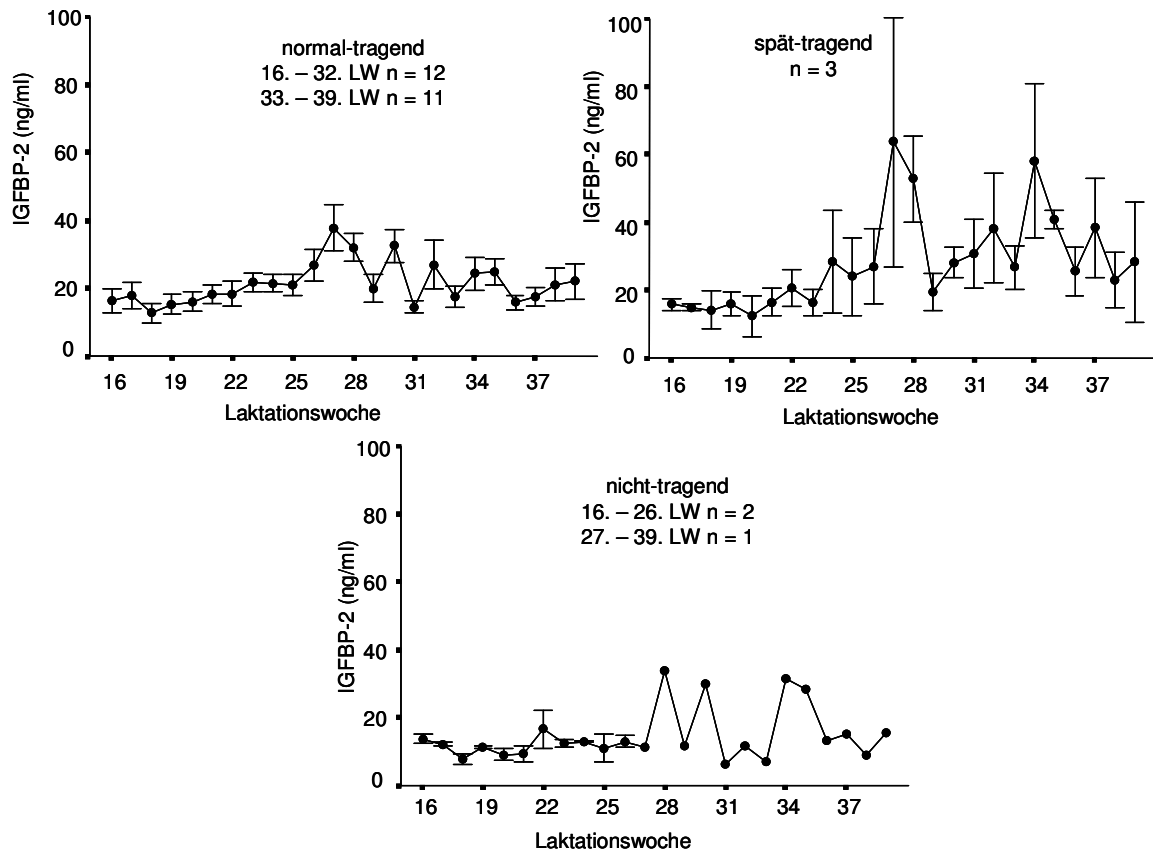


Abbildung 40: Darstellung des IGFBP-2-Gehaltes ($\mu\text{g/ml}$) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in der Milch von Ziegen in den Laktationswochen 16 bis 39 der drei verschiedenen Trächtigkeitsgruppen: normal tragend (27. - 32. LW) gewordene Tiere, spät in der Laktation (> 35. LW) tragend gewordene und nicht tragend gewordene Tiere.

n = Anzahl Tiere

Die Konzentration des IGFBP-2 in der Milch der Tiere, die nicht tragend wurden, beträgt im Gegensatz zu den Tieren, die normal tragend wurden, am Anfang etwa nur die Hälfte. Der Gehalt steigt nach der 27. LW jedoch ebenfalls bei dem untersuchten Tier an und ist vergleichbar mit dem Durchschnitt der tragend gewordenen Tiere. Im weiteren Verlauf zeigt sich ein identisches Bild der IGFBP-2-Konzentration in der Milch beider Gruppen. Auch die Tiere, die zu einem späteren Abschnitt der Laktation tragend wurden, zeigen ein ähnliches Bild zum entsprechenden Zeitpunkt der Laktation. Hier sind nur stärkere tierindividuelle

Schwankungen zu beobachten, was sich durch höhere Durchschnittsgehalte nach der 25. LW äußert. Aber auch hier steigt der Gehalt an IGFBP-2 in diesem Abschnitt der Laktation an, ausgehend von einer Konzentration, die der normal tragend gewordener Tiere entspricht.

3.2.2.4 Untersuchungen zur Mastitis bei der Ziege

Aus den zur Laktation untersuchten Ziegen fiel im Jahr 2001 ein Tier wegen extrem erhöhten Zellzahlen und einer klinischen Mastitis auf. An Hand dieser Ziege wird im folgenden Kapitel beispielhaft das Verhalten der untersuchten Parameter bei einer klinischen bzw. subklinischen Mastitis dargestellt.

Die ausgesuchte Ziege wies schon zu Beginn der Laktation so extrem hohe Zellzahlen in der Milchleistungsprüfung auf, dass sie durch die Messungen des LKV nicht mehr erfassbar waren. Der messbare Grenzwert liegt hier bei 10 Millionen Zellen pro ml Milch. In Abbildung 41 ist die Zellzahl als gestrichelte Linie dargestellt, die alle Werte über dem messbaren Bereich von 10 Millionen Zellen/ml markiert. Die hier gewählte Ziege hatte zu Beginn der Laktation trotz der hohen Zell-Werte keine äußerlich erkennbaren Merkmale einer Mastitis. Erst als akute Symptome einer klinischen Mastitis auftraten, wurde sie mehrmals mit Antibiotika behandelt (20. – 29. LW). Dieser Zeitraum ist in der Grafik grau unterlegt.

Die **Lactoferrinkonzentration** (Abb. 41) in der Milch ist zu Beginn der Laktation beim Beispielstier höher als im Normalfall bei den anderen Tieren. Während es normalerweise schon in der ersten Woche nach der Lammung zu einem starken Abfall der Lf-Konzentration in der Milch kommt, ist hier ein langsamerer Abfall der Konzentration zu beobachten, der erst um die 12. LW auf einem geringen Niveau stagniert. Danach folgt ein extrem starker Anstieg der Werte. Im folgenden Verlauf der Laktation sind solche starken Reaktionen nicht mehr zu beobachten, jedoch schwankt die Lactoferrinkonzentration weiterhin stark, was nicht durch den normalen Laktationsverlauf erklärbar ist.

Auch die **IGFBP-2-Konzentration** (Abb. 41) ist während der ganzen Laktation ungewohnt schwankend und hoch. Genau wie beim Lf wird hier ebenfalls um die 12. LW ein niedriges Niveau erreicht, bevor es zu einem starken Anstieg der Konzentration kommt. Erst am Ende der Laktation ist wieder ein Abfall auf ein

niedriges Niveau zu beobachten. Im Bereich der akuten Mastitis (grau unterlegt) sind die Werte des IGFBP-2 wie auch des Lactoferrins etwas geringer.

Während die Zellzahl nach der Behandlung der akuten Erkrankung abfällt und auch für dieses Tier auf einem niedrigen Niveau bleibt, reagieren die anderen beiden Parameter sehr sensibel mit Konzentrationserhöhungen auf Störungen im letzten Drittel der Laktation.

Bei dem Verlauf der anderen vom LKV während der Milchleistungsprüfung erfassten **Milchinhaltsstoffen** und **Milchleistung** (Abb. 41) fällt auf, dass in der täglichen Milchabgabemenge zwischen der Prüfung in der 9. (3,9 kg) und der in der 17. LW ein Einbruch (3,2 kg) in der Leistung zu beobachten ist, obwohl es sich hier um die Zeit der höchsten Milchleistung in der Laktation einer Ziege handelt. Danach steigt die Milchmenge wieder auf das vorherige Niveau (3,9 kg) an und die Laktationskurve nimmt einen ganz normalen Verlauf ohne Einbrüche. Fett und Eiweiß zeigen keine vom normalen Laktationsverlauf abweichenden Werte.

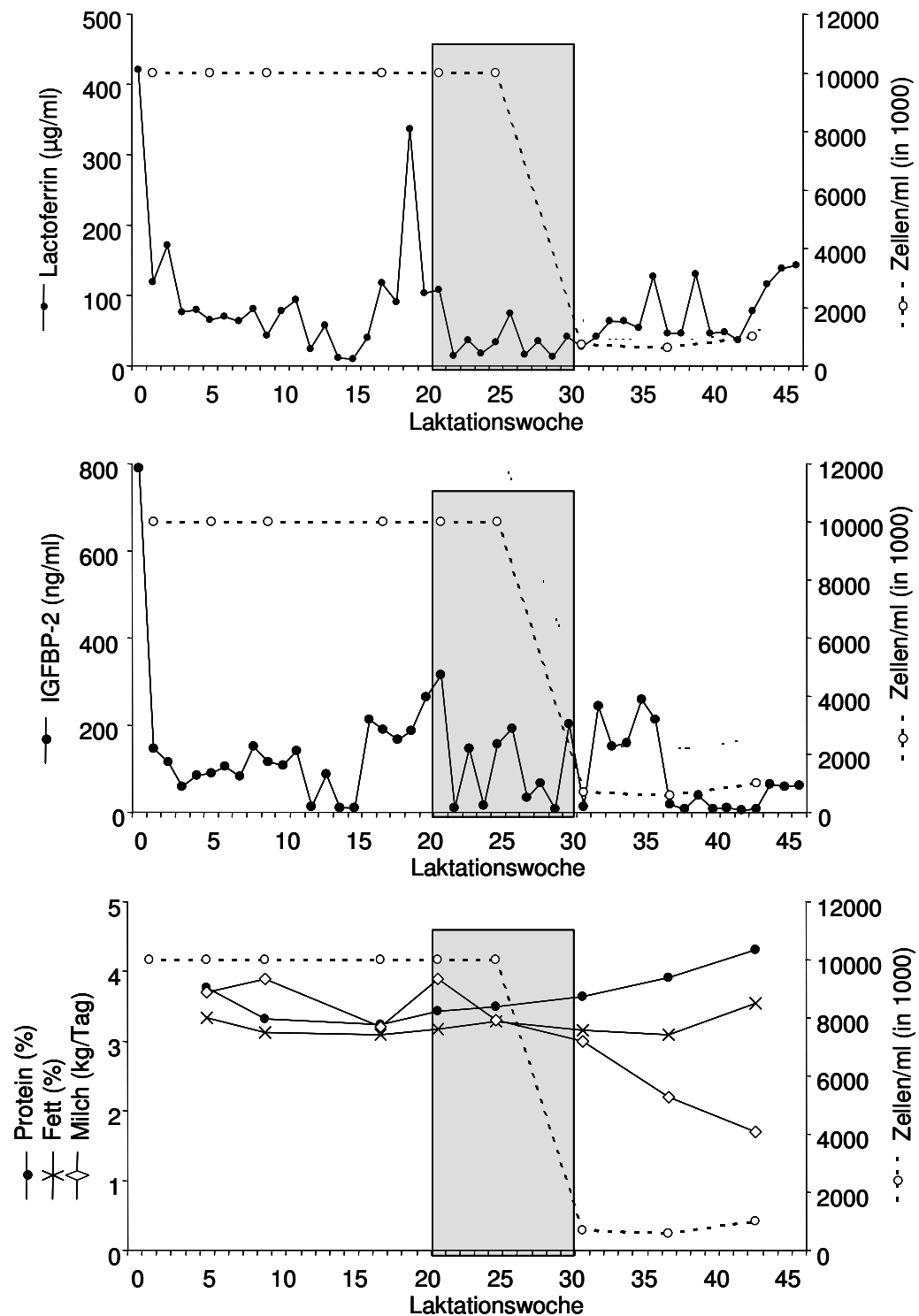


Abbildung 41: Verhalten von Lactoferrin-, IGFBP-2-, Protein- und Fett-Gehalt der Milch sowie der täglichen Milchleistung bei einer an Mastitis erkrankten Ziege, dargestellt über eine Laktation.

Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet die antibiotisch behandelte klinische Mastitis, vorher subklinischer Verlauf ohne äußere Symptome.

3.3 Diskussion

Untersuchungen zur Laktation

Festlegung des Zellzahl-Grenzwertes in Kuhmilch

In die Untersuchungen zur Laktation gingen nur die Messwerte von Kühen ein, deren Zellgehalt unter 150.000 Zellen/ml Milch lag. Der Grenzwert wurde so gewählt, weil viele Einflussfaktoren mit der Zellzahl korrelieren, die nicht mit einer Erkrankung der Milchdrüse einhergehen, wie z. B. Rasse, Alter, Laktationsnummer, Stress, Melktechnik usw. (KÖHLER, 2002). Der von der DVG (1994) festgelegte Gehalt von kleiner 100.000 Zellen/ml für normale Sekretion bei den einzelnen Messungen beim Einzeltier war auf Grund der Herdenstruktur nur schwer einzuhalten. Solange die Zellzahl unter 150.000 Zellen/ml eingehalten wurde und die Kühe keine Erkrankungserscheinungen zeigten, wurden ihre Daten mit in die Berechnungen miteinbezogen.

Lactoferrinkonzentration in der Kuhmilch im Verlauf der Laktation

HAGIWARA et al. (2003) beschreiben für die verschiedenen Laktationsstadien Absolutwerte im Lactoferringehalt der Kuhmilch, die niedriger liegen als in der hier vorliegenden Untersuchung. Zur Nachgeburtsphase werden von den Autoren keine Angaben zum Lf-Gehalt gemacht. Im ersten Abschnitt der Mittlaktation, von ihnen als „Höchststandperiode“ beschrieben, haben sie, bei jedoch nur 8 untersuchten Milchproben, eine um ca. 40 µg/ml geringere durchschnittliche Lf-Konzentration als in der vorliegenden Untersuchung, mit n = 460 Proben, in der Milch bestimmt. In dem folgenden zweiten Abschnitt der Mittlaktation wird die Differenz beider Untersuchungen geringfügig größer. So wurden bei HAGIWARA et al. (2003) in 59 Proben durchschnittlich 45 µg weniger Lf pro ml Milch nachgewiesen als bei den 641 hier untersuchten Proben. Diese Tendenz setzt sich zum Ende der Laktation fort. Im letzten untersuchten Laktationsabschnitt wurden hier im Schnitt 70 µg/ml mehr in 503 untersuchten Proben nachgewiesen als von HAGIWARA et al. (2003) in dieser Zeitperiode in 32 Milchproben. Die Autoren beschreiben zwar eine Tendenz des zum Ende der Laktation ansteigenden Lactoferrins, aber diese lässt sich von ihnen nicht statistisch nachweisen. Im Gegensatz dazu kann in den eigenen Untersuchungen

der Anstieg des Lactoferrins von dem zweiten auf das dritte, sowie vom dritten auf das letzte Laktationsstadium signifikant abgesichert werden.

In anderen Studien wird die Abhängigkeit des Lactoferringehaltes in Kuhmilch vom Laktationsstadium bestätigt (SENFT & KLOBASA, 1973, HARMON et al, 1975).

SENFT & KLOBASA (1973) beschreiben, dass die Lactoferrinkonzentration in der Milch in den ersten Tagen nach der Kalbung von über 1 mg Lf pro ml Kolostrum stark abfällt, und sich dann ab dem 10. (2. LW) bis zum 150. (22. LW) Laktationstag auf ein Niveau um 100 µg/ml einpendelt. In der vorliegenden Untersuchung konnten wesentlich höhere Lactoferringehalte von mehreren mg pro ml im Kolostrum beobachtet werden. WENDT et al. (1994) bestätigen diese Werte. Bei den hier untersuchten Kühen sinken die Werte schon in der Woche nach der Kalbung auf ein Niveau von durchschnittlich 160 µg/ml ab. In reifer Kuhmilch wird von WENDT et al. (1994) eine Spannweite 100 bis 1000 µg/ml an Lactoferrin angegeben. Dabei wird keine Aussage über den Gesundheitsstatus der Kühe gemacht. Auch auf weitere Angaben über das Laktationsstadium wird von ihnen verzichtet.

SENFT & KLOBASA (1973) beschreiben dann einen relativ starken Anstieg des Lf-Gehaltes zum Ende der Laktation, der dann bis über 400 µg/ml betragen kann. REIJMAN et al. (1989) nennen für die letzte Melkung einen noch höheren Gehalt von durchschnittlich 820 mg Lf/ml Milch, allerdings mit einer hohen Standardabweichung (350 µg/ml). Starke Unterschiede zwischen den Tieren wurden auch von SENFT & KLOBASA (1973) während der ganzen Laktation beobachtet. In der vorliegenden Untersuchung steigen ab der 16. Laktationswoche, also etwas früher als von SENFT & KLOBASA (1973) beschrieben, die Lf-Werte ebenfalls langsam und stetig bis zum Ende der Laktation an. Allerdings wird zum Ende der Laktation auch in der vorliegenden Studie nur ein Niveau von durchschnittlich 400 µg Lf/ml erreicht. Der Gehalt am Ende der Laktation ist also nicht so hoch wie bei REIJMAN et al. (1989), aber höher als bei HAGIWARA et al. (2003) beschrieben.

SANCHEZ et al. (1988) ermittelten zwar ebenfalls in der Kolostralmilch der Kuh die höchsten Lf-Konzentrationen, aber diese lagen dort nur bei 830 µg/ml. Nach einem schnellen Absinken in den ersten Tagen nach der Kalbung wurden auch von ihnen nach drei Wochen nur noch durchschnittlich 90 µg Lf/ml Milch gemessen. Noch niedrigere Konzentrationen ermitteln YE & YOSHIDA (1995). Bei ihnen sinkt der

Gehalt bis zum achten Tag nach der Geburt bei gesunden Kühen auf ein Niveau von 50 µg/ml ab, in reiferer Kuhmilch werden sogar nur noch 36 µg Lf pro ml Milch gemessen. Allerdings wurden nur drei Tiere untersucht und die Lf-Konzentrationen wurden chromatographisch, d. h. ohne Antikörper, bestimmt.

Differenzen in den Angaben zu den Lactoferrinkonzentrationen zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen und auch zu den eigenen Untersuchungen lassen sich durch die unterschiedlichen Messverfahren erklären (siehe Kapitel 2.1, Testentwicklung des Lactoferrins). Allen gleich ist das schnelle Absinken des hohen Gehaltes im Kolostrum in den ersten Tagen nach der Geburt. Angaben zum weiteren Verlauf werden nur selten gemacht. Ein exakter Zeitpunkt zu einem erneuten Anstieg des Lf ist nur bei SENFT & KLOBASA (1973) zu finden. Dieser liegt etwa sechs Wochen später in der Laktation als bei den eigenen Untersuchungen.

Lactoferrinkonzentration in der Ziegenmilch im Verlauf der Laktation

Da keine Untersuchungen zum Lactoferrin während der Laktation der Ziege vorliegen, seien vergleichend Daten zum Schaf angeführt. BUCHTA (1991) beschreibt, dass bei dem von ihm mittels ELISA untersuchten Schafmilchproben in der Woche nach der Geburt nicht über 500 µg Lf/ml nachgewiesen werden konnten, allerdings wurden nur Proben vier Tage post partum untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Lf-Konzentration in der hier untersuchten Ziegenmilch schon stark abgesunken. Lediglich das Kolostrum weist erhöhte Werte von 390 ± 76 µg/ml auf. Weiterhin sanken die Werte in der Schafmilch schnell unter 100 µg/ml ab. Im Gegensatz dazu werden bei den hier vorgestellten Untersuchungen zur Ziege in der dritten Laktationswoche nur noch durchschnittlich rund 10 µg/ml gemessen.

Bisher wurde noch kein Laktationsverlauf des Lactoferrins für die kleinen Wiederkäuer veröffentlicht.

Lactoferrinkonzentration vergleichend im Laktationsverlauf von Kuh und Ziege

Vergleicht man den Laktationsverlauf des Lactoferrins bei den beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tierarten, so zeigt sich ein differenzierter Verlauf. Im Gegensatz zum Rind sind bei der Ziege generell niedrigere Lactoferrinkonzentrationen in der Milch zu beobachten. Schon zu Beginn der Laktation wird bei der Ziege nur etwa ein Zehntel des Gehaltes wie beim Rind, was

mehreren 100 µg Lactoferrin pro ml Kolostrum entspricht, gemessen. Auch hier sinkt die Konzentration wie in der Kuhmilch schnell ab und erreicht ein Niveau von durchschnittlich rund 17 µg/ml (II. Laktationsabschnitt), was dem um den Faktor 10 verringerten Gehalt im Gegensatz zur Kuhmilch weiterhin entspricht. Außer einem kurzfristigen Anstieg zur 14. LW in der Laktation 2001, hält sich bei der Ziegenmilch dieses Niveau aber bis zur ca. 27. Laktationswoche. In diesem Zeitabschnitt kommen die Ziegen der Riswicker Herde in der Regel das erste Mal in die Brunst und werden belegt. In der untersuchten Kuhmilch ist der Anstieg schon um die 15. LW zu beobachten. Auch dieser Zeitpunkt entspricht in etwa der ersten nutzbaren Brunst der Kühe. Im Anschluss steigt der Gehalt des Lactoferrins in der Milch jeweils an. So werden am Ende der Laktation, mit Beginn der Involution der Milchdrüse, bei der Ziege rund 60 µg Lf pro ml Milch (39. LW) gemessen. Bei länger laktierenden Tieren steigt der Gehalt in der 48. Laktationswoche sogar auf durchschnittlich 151 µg Lf/ml an, allerdings mit größeren Schwankungen von Tier zu Tier. Bei der Kuh sind am Ende der Laktation (48. LW) 300 µg Lf/ml Milch nachweisbar. So zeigt sich bei der Ziege ein wesentlich stärkerer Anstieg an Lactoferrin in der Milch in einem wesentlich kürzeren Zeitabschnitt.

Bei einem Vergleich der Laktationskurven von Rind und Ziege ist auffällig, dass der Anstieg des Lactoferrins in der Milch jeweils mit dem Zeitpunkt der ersten Brunst oder beginnender Trächtigkeit zusammenfällt.

MOLENAAR et al. (1996) schreiben, dass Lactoferrin sowohl in der sich entwickelnden wie auch in der statischen Milchdrüse in den Epithelzellen nachweisbar ist, wobei der Gehalt an Lf mRNA in den Eutern von laktierenden Schafen und Kühen ähnlich dem in der Milchdrüse während der Trächtigkeit ist. Die Autoren spekulieren, dass Lactoferrin sowohl eine Rolle in der Entwicklung während der Trächtigkeit spielt wie auch bei der lokalen Involution. Sie vermuten, dass die Transkription der Lf mRNA bei beginnender Laktation nicht generell stattfindet. So erklären sie sich die Reduktion von Lactoferrin aus der Trächtigkeit mit 5 bis 10 mg/ml im Sekret auf 2 mg/ml im Kolostrum des Rindes. Über weitere Transkriptionsvorgänge bei parallel verlaufender Trächtigkeit und Laktation bzw. über die Brunst oder Trächtigkeit induzierende Faktoren wird von ihnen nicht geschrieben.

MASSON & HEREMANS (1971) ermittelten mittels radialer Immundiffusion für Kuh sowie Ziege Lactoferrinkonzentrationen von 20 bis 200 µg/ml in der Milch, womit sie den Gehalt deutlich niedriger einstufen, als in von ihnen untersuchter humaner Milch (> 2 mg/ml) und in muriner bzw. equiner Milch (0 - 2 mg/ml). Die hier mittels Enzymimmunoassay untersuchte Kuhmilch enthält höhere und die Ziegenmilch niedrigere Konzentrationen an Lactoferrin. Von MASSON & HEREMANS (1971) wird jedoch keine weitere Aussage über Laktationsstadium, Alter, Gesundheitsstaus oder andere möglichen Einflussfaktoren der von ihnen getesteten Tiere gemacht. CHEN et al. (2004) liegen bei den mit Hilfe eines ELISAs durchgeführten Untersuchungen von Lf in Tankmilch bei Ziegen etwa in gleichen Bereich von 69 bis 265 µg/ml (167 ± 49) bei von ihnen als hoch qualitativ eingestufte Milch (siehe nächsten Diskussionsabschnitt) wie MASSON & HEREMANS (1971).

Einteilung der Ziegenmilch in verschiedene Klassen nach dem Lactoferringehalt

CHEN et al. (2004) beschreiben, dass die von ihnen mittels eines Methylenblau-Reduktions-Tests, der die Keimzahl in der Milch mittels Farbumschlag bestimmt, in die Qualitätsklassen hoch, normal oder niedrig eingestufte Ziegenmilch signifikant verschiedene Lactoferrinkonzentrationen hat. So hat die Milch hoher Qualität einen niedrigeren Lf-Gehalt als normal oder niedrig eingestufte Milch. Dieser Umstand veranlasst die Autoren, Lf als Index zur Qualitätsbeurteilung von Ziegenmilch vorzuschlagen. Auch in den eigenen Untersuchungen lassen sich unterschiedliche Lf-Klassen in der Ziegenmilch ausmachen. Über die weitere Qualität kann jedoch keine Aussage gemacht werden. Auffällig ist nur, dass Ziegen mit fortgeschrittenen Laktationsnummern eher, jedoch nicht generell, höhere Lf-Werte aufweisen als in niedrigeren Laktationsnummern. Dies könnte eine Folge von überwundenen Entzündungen der Milchdrüse zu werten sein (siehe Diskussion zu Einfluss von Mastitis auf Lf-Gehalt der Milch).

IGFBP-2-Konzentration in Kuh- und Ziegenmilch im Verlauf der Laktation

Bei der Darstellung der IGFBP-2-Konzentrationen in der Milch über die Laktation von Kuh und Ziege zeigt sich ein ähnliches Bild. Im Kolostrum der beiden Spezies sind sehr hohe Konzentrationen an IGFBP-2 zu finden. Bei der Ziege liegt der Gehalt zu Beginn der Laktation etwas höher als bei der Kuh, jedoch treten größere

tierindividuelle Unterschiede auf. Die IGFBP-2-Konzentration in der Milch sinkt langsam in den ersten Wochen nach der Geburt ab und erreicht in der sechsten Laktationswoche bei der Kuh und in der vierten Laktationswoche bei der Ziege ihren Tiefstand von durchschnittlich etwa 18 ng IGFBP-2 pro ml Milch mit nur noch geringen Abweichungen von Tier zu Tier. Nach einem Plateau auf diesem Niveau steigt bei der Ziege im zweiten Abschnitt der Mittlaktation (Laktationsstadium III) der IGFBP-2-Gehalt in der Milch bis zur durchschnittlich doppelten Konzentration an. Bei der Kuh zeigt sich zwar auch eine leicht steigende Tendenz, es treten jedoch vor allem von Woche zu Woche stark schwankende Konzentrationen auf. Dies setzt sich bei dem bovinen Bindungsprotein-2 bis zum Ende der Laktation entsprechend fort. Im letzten Abschnitt der Laktation sind ab der 29. LW diese Schwankungen auch bei der Ziege zu beobachten, wobei es nach der 36. LW nochmals zum stetigen Anstieg des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch kommt. Zum Ende der Laktation ist in der Ziegenmilch ein etwa doppelt so hoher Gehalt an IGF-Bindungsprotein-2 wie in der Kuhmilch zu beobachten (durchschnittlich etwa 50 ng cIGFBP-2/ml im Gegensatz zu 24 ng bIGFBP-2/ml).

BLUM & BAUMRUCKER (2002) erwähnen, dass bei Kühen die IGFbps im Kolostrum hoch konzentriert sind, aber in der reiferen Milch nur noch in geringeren Konzentrationen vorliegen, wobei die am meisten sekretierten Bindungsproteine IGFBP-2, -3 und -4 sind (BAUMRUCKER et al., 1993). SEJRESEN et al. (2001) ermittelten mit Hilfe eines Western Liganden Blots ebenfalls für das Kolostrum die höchsten Konzentrationen an IGFBP-2 in Kuhmilch. Nach ihren Ausführungen sind diese sogar höher als im Sekret vor der Geburt. In den ersten zwei Tagen nach der Kalbung sinkt der Gehalt stark ab und steigt erst in der Woche vor dem Trockenstellen wieder an. Dieses Bild einer Laktation entspricht in etwa den hier mittels Enzymimmunoassay ermittelten IGFBP-2-Gehalten für Kühe.

POSSER & SCHWANDER (1996) vermuten, dass wie bei der Kuh (COHICK & TURNER, 1998) auch bei der Ziege der größte Anteil an Milch-IGFBP-2 in der Milchdrüse synthetisiert wird. Zu Konzentrationen des IGFBP-2 in Ziegenmilch liegen bisher jedoch keine Informationen vor. KLEMPET et al. (1993) beschreiben für Mutterschafe, die allerdings nicht während der Trächtigkeit laktieren, dass die Konzentration von mRNA in der Milchdrüse laktierender Schafe gegenüber der der tragenden Tiere niedriger ist.

In der Milchdrüse von Mäusen wurde von ALLAR & WOOD (2004) in der frühen Trächtigkeit die mRNA des IGFBP-2 hauptsächlich im Bindegewebe um die Epithelzellen lokalisiert. In der späteren Trächtigkeit und Laktation ist sie in den Zellen um die Alveolen zu finden. Im Gewebe der Milchdrüse der Mäuse ($n = 3$) wurde von ihnen ebenfalls mittels Western Immunoblot der Gehalt an IGFBP-2 in verschiedenen Phasen der Trächtigkeit untersucht. Die Konzentration des IGFBP-2 sinkt zum Ende der Trächtigkeit und weiter im Laufe der Laktation ab und steigt während der Involution der Milchdrüse wieder an. ALLAR & WOOD (2004) weisen darauf hin, dass die Expression der mRNA der IGFBPs mit entsprechend signifikanten Proteinkonzentrationen der jeweiligen Bindungsproteine in der Milchdrüse einhergehen.

In humaner Milch ist IGFBP-2 das dominierende Bindungsprotein insulinartiger Wachstumsfaktoren (ERIKSSON et al., 1993). Dort sind 5- bis 10-fach höhere Gehalte an IGFBP-2 in der Milch als im Plasma zu finden (BREIER et al., 1993). So sind am dritten Tag nach der Geburt mit Hilfe eines RIAs Werte über $2 \mu\text{g/ml}$ messbar (ELMLINGER et al., 1999). Im Gegensatz zu den untersuchten Wiederkäuern steigt der Gehalt in den zwei Wochen nach der Geburt nochmals auf $2,6 \mu\text{g/ml}$ an und sinkt dann langsam im Laufe der folgenden Monate ab. Drei Monate nach der Geburt werden noch $1,2 \mu\text{g}$ IGFBP-2 pro ml in humaner Milch gemessen und nach sechs Monaten ist die Konzentration auf 70 % des Anfangsgehaltes gesunken (ELMLINGER et al., 1999).

Da in den Untersuchungen zu humaner Milch keine parallel verlaufende Laktation und Gravidität vorlagen, lassen sich Unterschiede im Laktationsverlauf der IGFBP-2-Konzentration in der Milch im Gegensatz zu den untersuchten Wiederkäuern evtl. darauf zurückführen. Möglich ist zudem, dass nach sechs Monaten beim Menschen die Involution der Milchdrüse nur bedingt oder noch nicht begonnen hat und dass der starke Anstieg des IGFBP-2-Gehalts im Sekret der Milchdrüse wie bei der Maus (ALLAR & WOOD, 2004) erst dadurch angeregt wird.

WENDT et al. (1994) schreiben schon, dass die Frauenmilch reicher an Energielieferanten aber deutlich ärmer an Aufbaustoffen ist als Kuhmilch, bedingt dadurch dass das menschliche Neugeborene wesentlich langsamer wächst. Humane Milch enthält zwar wesentlich weniger Gesamtprotein als die Kuh, aber dies ist auf den geringeren Caseingehalt zurück zu führen. Der Anteil an Molkenproteinen ist bei beiden Spezies gleich.

IGFBP-2-Konzentration in der Milch bezüglich der verschiedenen Phasen der leistungsbezogenen Fütterung

Viele Studien haben gezeigt, dass der Fütterungsstatus von Kühen Einfluss auf den Gehalt des IGF-Bindungsproteins-2 im Serum hat. So haben McGUIRE et al. (1995) gezeigt, dass ein zweitägiger Futterentzug zu einem steigenden Gehalt an IGFBP-2 im Blut von Kühen führt. Betrachtet man die IGFBP-2-Serum-Konzentrationen bei der Kuh im Laufe der Laktation, so drückt sich dieser Einfluss durch die höchsten Konzentrationen in der frühen Laktation aus (VICINI et al., 1991), was möglicherweise auf die negative Energiebilanz von Kühen in dieser Phase der Laktation zurückzuführen ist. Da das IGFBP-2 direkt in der bovinen Milchdrüse durch Epithelzellen synthetisiert und sekretiert wird (COHICK & TURNER, 1998), muss sich dieser Einfluss der Fütterung nicht unbedingt im Milch-IGFBP-2 widerspiegeln. Auch die IGFBP-2 mRNA in der Milchdrüse von Rindern wird durch ein hohes Fütterungsniveau nicht beeinflusst (WEBER et al., 2000). In der vorliegenden Untersuchung ist ebenfalls kein Einfluss des Fütterungsstatus auf den Gehalt des IGFBP-2 sichtbar. Bei der Auswertung der IGFBP-2-Gehalte angelehnt an die 9-Felder-Tafel nach dem LKV-Rheinland (2001), zeigen sich im Wesentlichen keine Unterschiede zwischen den optimal versorgten Tieren und den Fütterungsfeldern, die ein Defizit anzeigen, innerhalb der verschiedenen Laktationsstadien. Die unterschiedlichen IGFBP-2-Milch-Konzentrationen in der Laktation erscheinen somit weniger durch den sich aus den verschiedenen Abschnitten der Laktation ergebenden Ernährungsstatus erklärt zu werden, sondern durch andere laktationsphysiologische Vorgänge bedingt zu sein.

Milchinhaltsstoffe in Kuh- und Ziegenmilch im Laktationsverlauf

Sowohl bei der Ziege als auch bei der Kuh verlaufen die Protein- und Fettgehalte in der Milch über die Laktation betrachtet invers zur Milchmengenkurve. Allerdings verläuft die Laktationsleistungskurve der hier untersuchten Ziegen über die Laktation etwas runder als bei der Kuh, wo der obere Leistungsbogen etwa von der 3. bis zur 11. Laktationswoche einzuordnen ist (HUTH, 1995). So wird bei den Ziegen in der vorliegenden Untersuchung erst um die 20. LW (III. Laktationsstadium) der Zeitpunkt der höchsten Milchleistung beobachtet.

Die **Eiweiß- bzw. Fettgehalte** verlaufen in den verschiedenen Abschnitten der Laktation entsprechend gegenläufig. So sind im zweiten Laktationsabschnitt die

geringsten Konzentrationen von Fett und Eiweiß bei der Kuh zu beobachten, während bei der Ziege die geringsten Gehalte im dritten Laktationsabschnitt gemessen werden. JUAREZ & RAMOS (1986) beschrieben bei der Ziege ebenfalls den Abfall von Fett und Protein in der Milch bis zum 4. oder 5. Monat der Laktation, entsprechend dem III. Laktationsabschnitt, und einen Anstieg zum Ende hin. Bei der Kuh steigen beide Parameter schon in der zweiten Hälfte der Mittlaktation bis zum Ende der Laktation kontinuierlich an, wobei bei der Ziege erst zum letzten Abschnitt der Laktation wieder ein Anstieg in der Milch zu beobachten ist.

In der Ziegenmilch liegt im Gegensatz zur Kuhmilch über die ganze Laktation eine höhere Proteinkonzentration vor. Vor allem in der Nachgeburtsphase ist eine Differenz von 1 % zu beobachten, danach beträgt die Differenz 0,3 bis 0,6 %. PUENTE et al. (1994) ermittelten zu Beginn der Laktation sogar noch höhere Eiweißgehalte in der Ziegenmilch, die jedoch schon in der zweiten Laktationswoche denen der hier untersuchten Ziegen entsprechen. Bei den o.g. Autoren weisen die Ziegen aber auch höhere Fettgehalte in der Milch auf als hier. Bei der vorliegenden Untersuchung weist die Kuhmilch über die ganze Laktation höhere Fettkonzentrationen in der Milch (0,6 bis 0,8 %) auf.

Da das Milcheiweiß vor allem durch die Fütterung beeinflusst wird, lässt sich auch die gegenläufig zur Milchleistungskurve verlaufende Eiweißkonzentration erklären. Ein Absinken des Eiweißgehaltes in der Milch ist in der Regel auf eine Energieunterversorgung zurückzuführen, wie diese zu Beginn der Laktation bzw. in der Phase der höchsten Milchleistung häufig vorliegt. Ein Energieüberschuss, wie er häufig am Ende der Laktation vorliegt führt dahingegen zum Anstieg des Eiweißes in der Milch (KIRCHGESSNER, 1997).

Die Höhe des Fettgehaltes wird neben dem genetischen Potenzial in erster Linie durch eine ausreichende Versorgung der Kuh mit Rohprotein und Energie bestimmt, wobei dem Anteil an pflanzlichen Gerüstsubstanzen in der Gesamtration eine überragende Bedeutung zukommt (KIRCHGESSNER, 1997). So ist wie schon beim Eiweißgehalt ein Absinken durch eine mögliche Energieunterversorgung bzw. die für diesen Laktationsabschnitt nicht ausreichende Höhe der Gesamtfuttermittelaufnahme der Tiere in diesem Stadium zu erklären.

Die bei der Kuh zusätzlich untersuchten **freien Fettsäuren** steigen über die ersten drei Laktationsstadien an. Zum Ende der Laktation ist daraufhin kein weiterer Anstieg in der Milch zu beobachten. Nach dem MILCHWIRTSCHAFTLICHEN KONTROLL-

UND UNTERSUCHUNGSVERBAND UELZEN E. V. (2001) sind die Ergebnisse hier im ersten und zweiten Laktationsabschnitt mit gut (kein Fettverderb) und später mit befriedigend (geringer Fettverderb) zu beurteilen.

Die **Lactose-Konzentrationen** in der bovinen Milch weisen lediglich in der Phase der höchsten Milchleistung (II. Laktationsstadium) erhöhte Werte auf, ansonsten bleiben sie konstant bei rund 4,75 %. GASPARDY et al. (2004) ermittelten für den Lactosegehalt bei Kühen einen Höchstwert am 66. Tag der Laktation, was in den II. Laktationsabschnitt fällt. Bei der Ziege werden im ersten Laktationsmonat (ausgenommen Kolostrum) von PUENTE et al. (1994) auch Lactosegehalte zwischen 4,6 und 4,8 % gemessen. Diese sinken am Tag 60 der Laktation auf 4,2 % ab.

Die **Zellzahl** weist bei beiden Tierarten ein ähnliches Verhalten auf. So ist vor allem zum Ende der Laktation ein Anstieg der Zellgehalte in der Milch zu beobachten. Bei den Ziegen ist der Anstieg jedoch wesentlich höher. Er steigt um über das 4fache im Bezug zum Anfangsgehalt der Milch an. DULIN et al. (1983) sowie DAVID et al. (1994) bestätigen den Einfluss des Laktationsstadiums auf die Zellzahl in Ziegenmilch. Bei der Kuh beträgt der Zellgehalt der Milch im letzten Laktationsabschnitt etwa das 1,5-fache in Bezug zum Laktationsbeginn, so dass hier ein mittlerer Gehalt von 75.000 Zellen/ml vorlag. Da nur Daten von Ziegen ohne klinisch nachweisbare Mastitis bzw. Kuhmilch, deren Gehalt unter 150.000 Zellen/ml Milch lag in die Berechnungen eingingen, ist dies als normale Entwicklung der Laktation zu betrachten. Die Zellzahlen in der Kuhmilch sind mit denen der Ziegenmilch nicht vergleichbar. Auf diese Problematik wird in der Diskussion der Mastitis von Kuh und Ziege näher eingegangen.

Der **Harnstoffgehalt** in der untersuchten Kuhmilch ist in der Nachgeburtsphase etwas geringer als in der restlichen Laktation, wo er in etwa konstant bleibt. Da der Harnstoffgehalt vor allem in Zusammenhang mit dem Eiweißgehalt zur Diagnose von Fehlernährung genutzt wird können hier Rückschlüsse auf eine Protein- bzw. Energiefehlversorgung getroffen werden. Der niedrige Harnstoffgehalt der Milch in der Nachgeburtsphase weist dabei vor allem auf einen Proteinmangel in der Ration hin (KIRCHGESSNER, 1997). Die Veränderungen im Eiweißgehalt der Milch zeigen zeitgleich Zeichen eines Energiemangels (s.o.). Eine Protein- und Energiefehlversorgung bedeutet allerdings, wie in diesem Fall, nur geringe Veränderung im Harnstoffgehalt der Milch.

Milchinhaltsstoffe der Kuh im jahreszeitlichen Profil

Betrachtet man den Verlauf der Harnstoffkonzentration in der Kuhmilch über das Jahr, so ist Ende Mai ein sehr hoher Gehalt an Harnstoff von 350 ppm zu beobachten. Da die Harnstoffkonzentration in der Milch durch die Fütterung beeinflusst wird, spricht dies für einen Proteinüberschuss in der Futterration (KIRCHGESSNER, 1997) evtl. durch stark gedüngten Aufwuchs.

Auch bei der Beobachtung des Eiweiß- und Lactosegehaltes der Kuhmilch über das Jahr ist ein Einbruch der Werte in der 15. Kalenderwoche, was der Woche vom 10. bis 16. April entspricht, auffällig. Da der Lactosegehalt der Milch im Gegensatz zum Eiweißgehalt nur im Extremfall durch die Fütterung beeinflusst wird, doch in der Regel weitgehend unbeeinflusst bleibt (KIRCHGESSNER, 1997), lassen sich hier erst einmal andere Einflüsse vermuten.

Da ein Lactoseabfall in der Milch einen Indikator für die Permeabilität der Blut-Euter-Schranke darstellt (SCHULZ et al., 1998), wie dies bei Mastitiden der Fall ist, könnte eine Häufung dieser Erkrankung eine Erklärung sein. Nachdem aber kein Anstieg der Zellzahl in der entsprechenden Woche zu beobachten war und viele Tiere einer Melkgruppe in diversen Laktationsstadien von den extrem nach unten abweichenden Werten betroffen waren, müssen hier Einflüsse auf die ganze Gruppe vorliegen, was auf systematische Fehler bei der Probenziehung und -analyse hinweisen könnte. ONTSOUKA et al. (2003) beschreiben z.B., dass in den verschiedenen Fraktionen der Milch die Inhaltsstoffe teilweise unterschiedlich hoch vertreten sind. Die Eiweiß- und Lactosegehalte in reifer Milch sind am Ende des Melkvorganges am geringsten. Der Fettgehalt steigt zum Ende hin an. Probleme bei der Probennahme wären demnach eine Erklärung für die geringen gleichzeitig auftretenden Lactose- und Eiweißwerte in der 15. Kalenderwoche, vor allem da die geringen Lactosegehalte und die extrem tiefen Eiweißwerte alle aus einer Melkgruppe stammen.

Da sich der Eiweißgehalt in der Milch insgesamt erst jedoch im Laufe des Sommers wieder erholt, muss hierfür zusätzlich die Möglichkeit eine Energieunterversorgung der Gruppe in Betracht gezogen werden. Der stark abgesunkene Eiweißgehalt auf 2,9 % und auch ein leichter Abfall des Fettgehaltes in der Milch dieser Gruppe kann dadurch erklärt werden. Der Harnstoffgehalt bleibt in dieser Zeit unbeeinflusst im physiologischen Bereich um 200 ppm (LKV RHEINLAND, 2001), so ist eine Proteinfehlversorgung der Kühe zu diesem Zeitpunkt auszuschließen.

Untersuchungen zur Trächtigkeit

Aus den Erläuterungen zur Laktation ergeben sich neue Fragestellungen im Hinblick auf Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern Lactoferrin bzw. IGFBP-2 und Trächtigkeit oder Brunst von Kuh und Ziege. Auf diese Fragestellungen soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

Lactoferrinkonzentrationen in der Milch von Kuh und Ziege während der Trächtigkeit

Der Zeitpunkt des Anstiegs der Lactoferrinkonzentration in der Milch geht bei beiden Tierarten mit dem Zeitpunkt der erneuten Trächtigkeit, aber auch mit der einsetzenden Brunst einher. Zwar setzt bei der Kuh die erste Brunst mitunter schon 3 bis 4 Wochen nach dem Abkalben ein, dennoch ist auf Grund der Nachgeburtsphase und der physiologischen Regeneration erst ab dem 60. bis 80. Laktationstag mit einer erfolgreichen Konzeption zu rechnen, was sich bei Hochleistungstieren aber auch noch weiter verzögern kann (LOTTHAMER & WITTKOWSKI, 1994). Bei den hier untersuchten Ziegen fiel die Zeit der ersten Brunst auf Ende August, was um die 28. Laktationswoche einzuordnen ist. Diese Zeiträume entsprechen denen, in denen der Lactoferringehalt in der bovinen und caprinen Milch bei der Darstellung der Laktation wieder ansteigt.

Da der Lactoferrin-Gehalt nach SCHANBACHER et al. (1993) im Eutersekret von Kühen vor allem in der späten Trächtigkeit wesentlich höher ist, als während der Laktation, spricht dies für einen solchen Einfluss. BAUMRUCKER & ERONDU (2000) bestätigen ebenfalls, dass im letzten Stadium der Trächtigkeit, d.h. während des Trockenstehens, bovines Lactoferrin in hohen Konzentrationen von 1 bis 2 mg/ml im Sekret der Milchdrüse zu finden ist. Da Lf sowohl in sich entwickelnden wie statischen Epithelzellen der Milchdrüse exprimiert ist, unterstützen MOLENAAR et al. (1996) die These, dass Lactoferrin in der Milchdrüse sowohl eine Rolle in der Trächtigkeit als auch bei der lokalen Involution einnimmt.

Da bei den beiden untersuchten Tierarten ein Teil der Laktation und Trächtigkeit parallel verlaufen, stellt sich die Frage, ob nur die Trächtigkeit den steigenden Lactoferringehalt in der Milch bedingt.

In der vorliegenden Untersuchung steigt bei den Kühen, die früh in der Laktation wieder tragend werden (bis zu 2 Besamungen bis zur Trächtigkeit), die Lactoferrinkonzentration in der Milch in den Wochen nach der Besamung stark an.

Der Verlauf setzt sich in den weiteren Wochen nach der Konzeption fort. Dies entspricht dem Bild für das entsprechende Laktationsfenster, in dem ab der ca. 15. LW ein kontinuierlicher Anstieg in der Milch zu beobachten ist. Betrachtet man nun die Tiere, die später in der Laktation tragend werden (≥ 3 KB), so steigen bei ihnen die Absolutwerte geringfügig an, dies lässt sich aber nicht signifikant absichern. Der Ausgangswert vor der erfolgreichen Besamung der Kühe ist jedoch schon höher als bei den Tieren mit einer niedrigeren Anzahl von Besamungen bis zur Trächtigkeit. Die höheren Lf-Konzentrationen in der Milch dieser Tiere vor der Konzeption müssen also auf das spätere Laktationsfenster, in dem sie sich befinden, zurückgeführt werden. Der Einfluss der einsetzenden Trächtigkeit kann, wenn er bestehen sollte, nur so gering sein, dass er sich bei der täglichen hohen Milchabgabemenge verliert und somit in der Milch nicht nachweisbar ist. Die hohen Abweichungen der Lactoferrinwerte zwischen den Tieren mit ≥ 3 künstlichen Besamungen lassen sich demnach auch durch die unterschiedlichen Laktationszeiträume erklären, in denen sich die Einzeltiere befinden.

Bei der Ziege wird der Einfluss der Laktation wesentlich deutlicher. Da hier auch Tiere untersucht werden konnten, die in der laufenden Laktation nicht tragend wurden, konnten diese zum Vergleich herangezogen werden. Hier steigt bei normal tragend gewordenen Tieren im Zeitfenster nach der Konzeption der Gehalt sogar auf mehr als das doppelte an, aber dieser Anstieg ist auch bei den Tieren zu beobachten, die nicht tragend werden und sich in dem entsprechenden Laktationsfenster befinden. Auch hier steigt der Gehalt von einem geringfügig niedrigerem Ausgangswert um über das doppelte in den entsprechenden Zeitfenstern der Laktation an. Bei den später in der Laktation tragend gewordenen Ziegen ist nach der Konzeption kein wesentlicher Anstieg mehr zu beobachten. Die Lactoferrinkonzentrationen in der Milch sind jedoch schon vor der Konzeption wie auch nachher wesentlich höher. Demnach handelt es sich auch hier nicht um einen Einfluss der etablierten Trächtigkeit, sondern offenbar des Laktationsstadiums. Gestützt wird die Aussage dadurch, dass die Lactoferrinverläufe der drei Gruppen in der Laktation bei den Ziegen ein gleiches Bild zeigen.

Der mögliche Einfluss einer ersten Brunst kann nicht belegt oder widerlegt werden, da hierzu Daten fehlen.

IGFBP-2-Konzentration in der Milch von Kuh und Ziege während der Trächtigkeit

Bei von BAUMRUCKER & ERONDU (2000) mittels Western Blot untersuchten Kühen zeigt sich, dass bei den Tieren, die während der Laktation trächtig werden, die Konzentrationen von IGFBP-2 und -3 in der Milch auf sehr tiefe Gehalte absinken im Vergleich zu den Tieren, die nicht tragend werden. Während der Gehalt an IGFBP-2 in der Milch jeweils vor der Besamung absinkt, steigt er bei den erfolgreich besamten Tieren in den ersten 10 Wochen nach der Konzeption mit geringen Abweichungen zwischen den 24 untersuchten Tieren nicht mehr an. Diese Tiere hatten einen Besamungsindex von 1,5. Sie wurden also früh in der Laktation wieder tragend. Bei den anderen Tieren steigt der IGFBP-2-Gehalt nach erfolgloser Besamung wieder langsam an und erreicht in der achten Woche nach der Besamung ein Plateau. Die 8 dargestellten Tiere dieser Gruppe hatten einen Besamungsindex von 3,2. Da dieses Verhalten nicht von den Blut-IGFBPs reflektiert wird, vermuten die Autoren, dass die Veränderung in den Milch-IGFBPs durch einen die Milchsynthese modulierenden Faktor beeinflusst wird, der durch die Trächtigkeit und Laktation gelenkt wird.

BAUMRUCKER et al. zeigten schon 1993 an Hand von Zellkulturen, dass bovine Epithelzellen der Milchdrüse IGF-Bindungsproteine produzieren, wobei die Konzentration im Milchdrüsensekret vor dem Abkalben stark ansteigt.

Während WEBER et al. (2000) die Synthese von IGFBP-2 mRNA in der Milchdrüse von Färsen noch vor der Geschlechtsreife beschreiben, vermuten PLATH-GABLER et al. (2001), dass bovines IGFBP-2 keine signifikante physiologische Rolle in der Milchdrüse einnimmt, da es nur schwach exprimiert ist.

Die eigenen Untersuchungen zeigen wie die von BAUMRUCKER & ERONDU (2000), dass sich bei den Tieren, die früh in der Laktation wieder tragend werden ($KB \leq 2$) ein durchschnittlich geringerer Gehalt an IGFBP-2 in der Milch in den 10 Wochen nach der Konzeption feststellen lässt, als bei Tieren, die mehr Besamungen benötigen. Wäre dies jedoch durch die erfolgte Trächtigkeit beeinflusst, so müsste sich das gleiche Verhalten auch bei den Tieren zeigen, die später in der Laktation tragend werden. Hier ist jedoch in der vorliegenden Untersuchung bei den Kühen mit mehr als 2 KB bis zur Trächtigkeit kein Abfall der IGFBP-2-Konzentration in der Milch nach der Konzeption zu beobachten.

Beobachtet man den weiteren Verlauf bei den Tieren, die früh in der Laktation tragend wurden, so zeigt sich der für dieses Laktationsfenster schon oben

beschriebene Anstieg des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch. Das Absinken der Absolutwerte bei den Tieren mit ≥ 3 KB lässt sich durch die geringe Tierzahl in diesem Untersuchungsabschnitt erklären und ist auf Grund dessen auch nicht signifikant abzusichern.

Bei den normal tragend gewordenen Ziegen ist kein Absinken des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch nach der Konzeption zu beobachten. Zwar zeigt sich bei den später im Jahr erfolgreich belegten bzw. besamten Tieren in den 10 Wochen nach der Konzeption ein Absinken der IGFBP-2-Konzentration in der Milch, diese lässt sich allerdings dadurch erklären, dass nur Daten weniger Gemelke vorlagen, da die vorangegangene Laktation zu Ende ging. Dies spiegelt sich auch in den hohen Abweichungen von Tier zu Tier in dieser Gruppe wider. Vor der Besamung liegen die für diesen Laktationsabschnitt typisch stark erhöhten Werte vor. Zwei während der ganzen Laktation nicht wieder tragend gewordene Ziegen zeigen den gleichen Anstieg in einem entsprechenden Zeitraum der Laktation auf wie die normal belegten Tiere. Die IGFBP-2-Konzentration der Milch ist jedoch geringer als bei den gleichzeitig laktierenden und tragenden Tieren. Bei der optischen Darstellung über den entsprechenden Laktationszeitraum (Abb. 40) von der 16. LW bis zum Ende der Laktation (39. LW) zeigen alle Gruppen ein ähnliches Bild.

KLEMPT et al. (1993) beschreiben, dass in der ovinen Milchdrüse während der Laktation die Expression an IGFBP-2 mRNA niedriger ist als während der Trächtigkeit. Das Bindungsprotein-2 scheint also, zumindest für die kleinen Wiederkäuer, eine physiologische Rolle bei Laktation und Trächtigkeit in der Milchdrüse zu besitzen. Bei parallel verlaufender Laktation und Trächtigkeit, wie dies bei den Ziegen im dargestellten Versuch vorliegt, könnte dies eine vermehrte Expression von IGFBP-2 in die Milch in Folge einer etablierten Trächtigkeit vermuten lassen, was sich geringfügig in der Milch widerspiegelt. Ansonsten scheint die synchron verlaufende Trächtigkeit keinen entscheidenden Einfluss auf die IGFBP-2-Konzentration in der Ziegenmilch zu haben.

Untersuchungen zur Zellzahl und Mastitis

Bei den Untersuchungen zu Zusammenhängen zwischen den Proteinen Lactoferrin und IGFBP-2 in der Milch von Kühen und Ziegen und Entzündungen der Milchdrüse konnte ein eindeutiger Einfluss festgestellt werden.

Lactoferringehalt der Milch von Kuh und Ziege im Zusammenhang mit Entzündungen der Milchdrüse

Als eine der wichtigsten Funktionen des Lactoferrins wurde schon früh die antibakterielle Aktivität erwähnt (MASSON et al., 1966). Mehrere Studien beschreiben erhöhte Konzentrationen von Lf in Euter-Vierteln mit erhöhter Zellzahl bei Kühen (HARMON et al., 1975, MEYER & SENFT, 1979). Auch mit dem hier entwickelten Testverfahren wurden analoge Zusammenhänge bereits dokumentiert (SCHMITZ et al., 2004a). HARMON et al. (1975) stellen einen Korrelationskoeffizienten von 0,57 ($p < 0,01$) zwischen der Zellzahl und dem Lactoferringehalt in Kuhmilch fest.

Bei Untersuchungen von CHEN et al. (2004) zu Lactoferrin in Ziegenmilch ermitteln sie in mit *Staphylococcus aureus* experimentell infizierten Euterhälften einen Korrelationskoeffizient von 0,97 (48 h nach Infektion) und 0,89 (72 h nach Infektion) zwischen den Zellzahlklassen und Lf in der Ziegenmilch. Aber auch in Milch aus natürlich entzündeten Eutern ist der Lf-Gehalt signifikant höher als in normaler Milch. Über die letzten Jahrzehnte sind viele Untersuchungen zu dieser Thematik durchgeführt worden, wobei festgestellt wurde, dass ein Anstieg des Lactoferringehaltes von der Keimart abhängig ist (HARMON et al., 1975, RAINARD, 1986, IYER & LÖNNERDAL, 1993, KAWAI et al., 1999, FANG et al, 2000). Als kritische Grenze ist eine niedrige Konzentration von unter 200 µg Lactoferrin /ml Kuhmilch zu bewerten, da schnell wachsende Keime, wie z. B. *E. Coli*, nicht ausreichend über Lf bekämpft werden können und so klinische Symptome die Folge sind (HAGIWARA et al., 2003). SURIYASATHAPRON et al. (2000) beschreiben diese Gefahr für einen niedrige Zellzahl, wobei diese mit niedrigen Lf-Konzentrationen einhergeht.

KAWAI et al. (1999) ermittelten für die Milch von Kühen mit einer klinischen Mastitis Werte von 318 bis 2.270 µg Lactoferrin pro ml Milch und bei einer subklinischen Mastitis eine Spannweite von 199 bis 1.229 µg/ml. Diese Lactoferrinkonzentrationen sind signifikant höher als bei den von ihnen untersuchten gesunden Tieren

(68 bis 419 µg/ml) (< 70.000 Zellen/ml). Aussagen über das Laktationsstadium der Tiere wurden hierbei nicht gemacht. Die Autoren meinen, dass vor allem die Ausprägung der Infektion und der Erreger auf den Lactoferringehalt Einfluss nehmen. HAGIWARA et al. (2003) bestätigen diese Aussagen. Sie zeigten, dass die mittlere Lf Konzentration in mit *Staphylococcus aureus* und in mit anderen *Streptococci* (als *Streptococcus agalactiae*) infizierten Eutervierteln signifikant höher ist als bei denen mit Koagulase-negativen *Staphylococci* und *Corynebacterium bovis* infizierten Vierteln. Alle, bis auf die mit *Corynebacterium bovis* infizierten Viertel, unterschieden sich dabei hinsichtlich des Lf-Vorkommens signifikant von normaler Milch. HAGIWARA et al. (2003) beschreiben ebenso, dass mit zunehmenden Zellzahlen auch die Lf-Konzentration in der Milch anzusteigen scheint.

Diese Tendenz lässt sich in der hier vorliegenden Untersuchung eindeutig belegen. Mit zunehmender Zellzahlklasse steigt der Lf-Gehalt in Kuhmilch signifikant an. Bei einer Betrachtung der einzelnen Zellzahl-Kategorien fällt auf, dass vor allem bei noch relativ geringer Zellzahl im physiologisch gesunden Bereich (Zellzahlklasse 1 zu 2) eine Erhöhung der Zellzahl in der Milch eindeutig mit höheren Lf-Werten einhergeht. Diese vermehrte Synthese von Lactoferrin zeigt die schnelle Regulation in der Milchdrüse als Vorbeugung gegen eine Entzündung. Hierbei werden bei einer Zellzahlklasse 2 durchschnittlich Werte von 213 µg Lf /ml erreicht, die laut HAGIWARA et al. (2003) Voraussetzung dafür sind, dass schnell wachsende Keime umgehend bekämpft werden können. Während in Untersuchungen zur Laktation von HAGIWARA et al. (2003) mittels radialer Immunodiffusion generell niedrigere Werte gemessen wurden als bei dem hier entwickelten ELISA, ermittelte die Arbeitsgruppe für die Zellzahlklasse 2 Lactoferrinkonzentrationen von 186 µg/ml (n = 39) bei normal laktierenden Tieren und von 257 µg/ml (n = 29) bei Tieren mit subklinischer Mastitis, was im gleichen Bereich der hier vorgestellten Ergebnisse liegt.

Bei einem Vergleich der Zellzahlklassen 3 und 4 ist bei den hier untersuchten Kühen dann nochmals ein weiterer signifikanter Anstieg zu beobachten, wobei dieser Bereich genau die Zellzahlbereiche umfasst, die laut DVG (1994) charakteristisch für eine erkrankte Milchdrüse sind.

Die starken Schwankungen der Lactoferrinwerte auch bei extrem hohen Zellzahlen geben Hinweise auf wahrscheinlich unterschiedliche Erreger der Entzündungen. Wie schon beschrieben ist Lactoferrin nicht bei jedem Erreger gleich wirksam, so dass der Lactoferringehalt nicht unbedingt von der Stärke einer Entzündung (hier über die

Zellzahl definiert) abhängt, sondern vor allem stark von dem Erregerspezies und deren Pathogenität bestimmt wird.

Bei einer experimentell angeregten Mastitis bei Kühen ist von SCHMITZ et al. (2004a) mittels des hier entwickelten ELISAs ein höherer Korrelationskoeffizient ($r = 0,56$) zwischen der Zellzahl und dem Lactoferringehalt festgestellt worden als der in der vorliegenden Untersuchungen ($r = 0,36$) in Zusammenhang mit natürlichen Erhöhungen der Zellzahl in Kuhmilch.

Bei den beiden in dieser Arbeit dargestellten Beispielkühen für das Verhalten der untersuchten Parameter während einer Mastitis ist schon vor einem Anstieg der Zellzahl eine Erhöhung des Lactoferringehaltes in der Milch zu beobachten. Damit wird nochmals die schnell einsetzende Regulation der Lf-Synthese und Sekretion in die Milch schon vor der Erkrankung bei einer natürlichen Infektion unterstützt. Zudem liegen hier wahrscheinlich entsprechende Erregertypen vor, auf die die Lf-Synthese sensibel reagiert.

Der starke Anstieg des Lactoferrins liegt bei beiden Tieren um den Zeitpunkt der Zellzahlspitze während der akuten Mastitis. Danach fällt auf, dass die Lactoferrinkonzentrationen langsamer als die Zellzahl in der Milch absinken. So ist auch in der laut Zellzahl und auf Grund fehlender Symptome gesunden Milchdrüse noch ein erhöhter Lf-Gehalt zu finden. Die folgenden immer wieder stark steigenden Lf-Werte sind als Reaktionen auf die überwundene Mastitis zu werten; so geht ein starker Anstieg des Zellgehaltes bei Kuh 779 hier zwar nochmals mit einem starken aber nicht mehr so hohen Anstieg des Lactoferrins einher wie während der vorangegangenen Infektion. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein und mit Erregertypus, geschwächter Synthese oder anderen Dingen zusammenhängen und lassen sich an dieser Stelle nicht klären.

In Versuchen wurde die Reaktion des Lactoferrins auf Infektionen mit bestimmten Erregern oder Toxinen über mehrere Stunden bzw. Tage beobachtet (HARMON & NEWBOULD, 1980; CARLSSON et al., 1989; SCHMITZ et al., 2004 a u. b.). Diese Untersuchungen dienen der Einstufung der Zusammenhänge zwischen Erreger und Lactoferrin bzw. der Einstufung der Reaktionen innerhalb der Milchdrüse, sie geben aber keine Auskunft über die natürlichen Infektionen und über weiteres Verhalten des Lactoferrins in der Laktation. Mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit kann

gezeigt werden, dass auch bei einer wöchentlichen Beobachtung des Lactoferrinwertes schon Aussagen über mögliche Entzündungsvorgänge in der Milchdrüse gemacht werden können, obwohl die Zellzahl noch keine Hinweise für Erkrankungen gibt. Dabei müssen vor allem die vorangegangenen Lactoferringehalte der Milch beachtet werden, um Schwankungen beim Einzeltier zu erkennen und das Laktationsstadium muss berücksichtigt werden. So sind die Werte ganz am Anfang und zum Ende der Laktation kritisch zu betrachten. Die genauesten Aussagen lassen sich bei der Betrachtung der Verläufe des Einzeltieres machen.

KUTILA (2004) kam in ihrer Arbeit sogar zu der Erkenntnis, dass die Gabe von exogenem Lactoferrin zur Vorbeugung einer Mastitis bei trockenstehenden und auch laktierenden Kühen dient, vor allem wenn die eigene Konzentration an Lf bei der Kuh gering ist. Vor allem zu Beginn des Trockenstellens soll es die Tiere vor Entzündungen schützen, da hier möglicherweise mit Pathogenen angereicherte Milch im Euter verbleibt und die Gefahr einer Infektion sehr hoch ist.

Wenn man die Zellzahlwerte aus Kuhmilch zu Grunde legt ist eine Einstufung der Eutergesundheit von Ziegen ist auf Grund ihres Zellgehaltes in der Milch nicht möglich. Milch gesunder Tiere weist schon einen hohen Gehalt von somatischen Zellen auf. So wurde in Untersuchungen einer Ziegenherde von CONTRERAS et al. (1997) zwar in den letzten 10 Jahren nur eine Mastitishäufigkeit von 0,5 bis 1 % Tieren der Herde pro Jahr ermittelt, aber ein durchschnittlicher Zellgehalt von 2.200.000/ml in der Tankmilch. Diese Ergebnisse werden von anderen bestätigt. DROKE et al. (1993) ermittelt bei 65,5 % von 71 untersuchten Tankmilchproben aus Ziegenmilchbetrieben in den USA eine durchschnittliche Zellzahl über 1.000.000 Zellen/ml. Es gibt viele Faktoren, wie z.B. das Laktationsstadium oder Infektionen, die den Zellgehalt von Ziegenmilch beeinflussen (DULIN et al., 1983). Vor allem aber unterscheidet sich die Zusammensetzung der somatischen Zellen zwischen Kuh- und Ziegenmilch. Bei Tieren, die frei von Infektionen der Milchdrüse sind, machen neutrophile Zellen 5 bis 20 % der somatischen Zellen in Kuhmilch und 45 bis 87 % der somatischen Zellen in Ziegenmilch aus (DULIN et al., 1983; MILLER et al., 1991, DROKE et al. 1993), wobei eine hohe Zellzahl mit steigender Anzahl an Neutrophilen in Ziegenmilch einhergeht (DROKE et al., 1993). CONTRERAS et al. (1997) schließen aus diesen Zusammenhängen, dass die hohe Anzahl an Neutrophilen in Ziegenmilch einen Schutz gegen klinische Mastitiden bietet. HARMON &

NEWBOULD (1980) haben die neutrophilen Leukozyten in Kuhmilch als eine Quelle für das Lactoferrin ermittelt. Sie haben festgestellt, dass diese während einer Infektion nicht die Hauptquelle für das Lf sind, allerdings könnte schon vor Ausbruch einer Infektion die protektive Wirkung durch das Lactoferrin aus der hohen Anzahl an Neutrophilen in Ziegenmilch ein Grund für die niedrige Infektionsrate in Milchziegenherden sein.

CHEN et al. (2004) sehen die Zellzahl bei Ziegen dennoch trotz der hohen Zahlen als hilfreich bei der Diagnose von Mastitis bei Ziegen. Aber auch sie können keine feste Zellzahl zur Mastitidiagnose nennen auf Grund des schon hohen Zellgehaltes in der Milch gesunder Ziegen. Die Autoren meinen, dass hier neben der Zellzahl noch Parameter wie z. B. Lf zur Verbesserung der Mastitidiagnose genutzt werden sollten.

In Untersuchungen zur Zellzahl und Lactoferrin in mit *Staphylococcus aureus* infizierten Euterhälften (CHEN et al., 2004) zeigt sich innerhalb von 72 h ein signifikanter Anstieg des cLf von 10 µg/ml Milch bis auf 1000 µg/ml, während in der Kontrollhälfte das cLf konstant zwischen 10 und 30 µg/ml bleibt. Die Zellzahlklasse steigt jedoch schon nach 48 h signifikant an und schon nach 24 h ist eine Erhöhung der Werte zu beobachten, beim Lf erst nach 48 h. Der *Staphylococcus aureus* ist dabei für die Ziege eine durchaus repräsentative Keimart. So fanden CONTRERAS et al. (1997) in 97 % von infizierten Hälften bei Ziegen *Staphylococcus spp.*

In den hier durchgeführten Untersuchungen bei der Ziege sind keine Beobachtungen über die Stunden nach der Infektion möglich, weil keine experimentell definierte Inokulation der Milchdrüse stattfand. Von daher kann auch über die beteiligten Erreger keine Aussage gemacht werden. Das Beispieletier aus dieser Studie wies ab der 20. LW Symptome einer klinischen Mastitis auf und wurde daraufhin behandelt. Es zeigte schon zu beginnender Laktation bei den wöchentlichen Untersuchungen der cLf-Konzentration erhöhte Werte wie ebenso über der analytisch bedingten Nachweisgrenze liegende Zellzahlen (> 10.000.000 Zellen/ml), so dass von einer subklinischen Mastitis, möglicherweise schon vor der Lammung, ausgegangen werden kann.

Der starke Anstieg der Lf-Werte weist auf die Manifestierung einer klinischen bzw. subklinischen Mastitis hin. CHEN et al. (2004) fanden auch bei subklinischer Mastitis ebenfalls stark erhöhte Lf-Konzentrationen. Etwas später als die Spitze der Lf-Konzentrationen zeigen sich auch die klinischen Symptome der Mastitis. Während

der akuten Mastitis und deren Behandlung sinken die Zellzahlen in der Milch ab. Das Lf hat schon vorher wieder ein niedrigeres Niveau erreicht. Im Gegensatz zur Zellzahl, die in der restlichen Laktation relativ niedrig bleibt, zeigt das Lf neben dem normalen Anstieg zum Ende der Laktation, wie schon bei der Kuh beobachtet, immer wieder erhöhte Konzentrationen in der Milch. Dies kann in einer schnellen Reaktion auf Störungen begründet sein und zur Bekämpfung von Pathogenen dienen. Da es nicht erneut zu ansteigender Zellzahl oder Symptomen einer Entzündung kommt, scheint die Regulation der Milchdrüse ausreichend zu sein.

Bei beiden untersuchten Tierarten fällt auf, dass der Anstieg des Lactoferringehaltes schon vor dem Auftreten klinischer Symptome zu beobachten ist. Auch zeigen sowohl die Kuh wie auch die Ziege während der restlichen Laktation eine schnelle Reaktion des Lactoferringehaltes in der Milch. Dies ist möglicherweise als Folge der überwundenen Mastitis zu bewerten. Dieses Verhalten ist bei der Zellzahl nicht zu beobachten.

IGFBP-2-Gehalt der Milch von Kuh und Ziege in Zusammenhang mit Entzündungen der Milchdrüse

Auch für das IGFBP-2 ist mit steigender Zellzahl eine ansteigende Konzentration in der Kuhmilch zu beobachten. Vor allem, wenn auf Grund der Zellzahl schon eine Erkrankung der Milchdrüse belegt werden kann, wie hier zwischen einer Zellzahlklasse von 4 und 5 (DVG, 1994), steigt der IGFBP-2-Gehalt in der Milch signifikant an. In einer Übersichtsarbeit bestätigen BURVENICH et al. (1999) ein Ansteigen der IGF-Bindungsproteine in der Milch der infizierten Milchdrüse. Sie gehen jedoch dabei nicht weiter auf einzelne Bindungsproteine ein. SCHUSTER et al. (1995) beobachteten bei einer künstlichen Infektion von Kühen mit *E. Coli*, dass der Gehalt an Bindungsproteinen insulinartiger Wachstumsfaktoren über einen langen Zeitraum nach der Infektion noch ansteigt, was durch eine steigende Synthese und Sekretion der IGFBPs durch die Epithelzellen der Milchdrüse erklärbar sein könnte. Klar können die Autoren dabei die Bindungsproteine 2 und 3 im Western Liganden Blot definieren, weiterhin wird IGFBP-4 vermutet.

Die eigenen Untersuchungen zu IGFBP-2-Konzentrationen während einer akuten Mastitis bestätigen den Anstieg des Bindungsproteins in der Milch. Zwar sinkt der Wert zu Beginn der akuten Entzündung bei den beiden dargestellten Kühen erst ab,

steigt dann jedoch auf Konzentrationen von 40 ng/ml an. Im Anschluss daran ist der Verlauf unruhig. So ist nach einem ersten Abfall des IGFBP-2, der mit den fallenden Zellzahlen einhergeht, ein erneuter Anstieg auf Werte über 40 ng/ml zu beobachten, obwohl die akute Entzündung vorbei ist. Dieses Verhalten ist sowohl bei der Beispielskuh 779 zu beobachten, die später in der Laktation nochmals an Mastitis erkrankt, aber auch bei Kuh 813, welche die restliche Laktation gesund ist.

Bei der Ziege gehen die hohen Zellzahlen schon vor der akuten Mastitis mit sehr hohen Konzentrationen des IGFBP-2 von mehreren hundert ng pro ml einher. Im Gegensatz dazu werden bei den gesunden Ziegen außer zu Beginn und am Ende der Laktation IGFBP-2-Konzentrationen von 15 bis 40 ng/ml in der Milch gemessen. Auch nach der akuten Mastitis und stark abgesunkenen Zellzahlen ist immer noch der hohe Gehalt des BP-2 zu beobachten. Erst am Ende der Laktation sinkt er auf das für dieses Laktationsstadium entsprechenden Niveau ab. Insgesamt verläuft die Konzentration jedoch unruhig. Das IGFBP-2 scheint dabei schneller auf physiologische Störungen zu reagieren als die Zellzahl. Wie bei der Kuh sinkt der Gehalt aber nicht nach der akuten Entzündung ab, sondern bleibt für einige Wochen auf einem hohen Niveau.

Eine massive Störung im physiologischen Gleichgewicht der Milchdrüse muss auf Grund der IGFBP-2-Spitze schon vor der akuten und behandelten Entzündung vorgelegen haben. Die ebenfalls zurückgegangene Milchleistung zu diesem Zeitpunkt bestätigt dies.

Andere Kuh- und Ziegenmilchinhaltsstoffe in Zusammenhang mit Entzündungen der Milchdrüse

Die anderen Milchinhaltsstoffe zeigen bei den dargestellten Beispieltieren das im Folgenden diskutierte Verhalten bei einer natürlich aufgetretenen Mastitis.

Bei beiden Beispielskühen ist während bzw. schon vor einer akuten Mastitis ein Einbruch des Lactosegehaltes in der Milch zu beobachten. Dieses Verhalten wird durch die Störung der Blut-Euter-Schranke in Folge einer Mastitis möglich. Während sie beim gesunden Tier (außer in der Früh-laktation) impermeabel für Lactose ist, wird bei einer Störung Lactose über das Blut und dann über den Harn ausgeschieden (SCHULZ et al. 1998).

Während der akuten Mastitis ist bei den beiden hier untersuchten Kühen ein höherer Fettgehalt als zwischen den Mastitiden zu beobachten. Bei Kuh 779 sinkt er dort teilweise auf ein sehr niedriges Niveau ab (2,5 % bis 4,3 %) ab. WENDT et al. (1994) beschreiben, dass der Milchfettgehalt im Falle eines deutlichen Milchmengenrückganges ansteigt, ansonsten jedoch durch die verminderte Synthese während einer Mastitis absinkt. So lassen sich die Anstiege während der akuten Erkrankung bei beiden dargestellten Tieren erklären. Auch SURIYASATHAPRON et al. (2000) beschreiben die positive Korrelation von Milchfett und Zellzahl.

Die verminderte Milchfett-Synthese bei Kuh 779 nach der akuten Erkrankung weist wie schon das Verhalten des Lactoferrins auf Störungen im physiologischen Gleichgewicht des Euters hin.

Bei der in dieser Untersuchung dargestellten an Mastitis erkrankten Ziege ist kein Einfluss während der Erkrankung auf den Milchfettgehalt zu beobachten. Lediglich am Ende der Laktation sinkt der Wert etwas ab, was jedoch nicht mehr in Zusammenhang mit der entzündeten Milchdrüse gebracht werden kann. ZENG & ESCOBAR (1994) beobachteten in Ziegenmilch jedoch eine negative Korrelation der Zellzahl zum Fettgehalt.

Ebenso korreliert ihrer Ansicht nach die Milchproduktion negativ mit der Zellzahl. Bei der hier dargestellten Ziege ist der Einbruch der Milchleistung vor der akuten Mastitis bei schon sehr hohen Zellzahlen zu beobachten, was diese Vermutung bestätigt.

Nach WENDT et al. (1994) verändert sich der Gesamtproteingehalt in der Kuhmilch bei einer Mastitis nur unbedeutend, da der Anteil des Caseins zwar durch eine verminderte Synthese abnimmt, der Anteil an Molkenproteinen jedoch durch Übertritt aus dem Blut ansteigt. Bei der dargestellten Kuh 779 sinkt der Proteingehalt vor dem ersten dargestellten Mastitisfenster jedoch stark (auf 2,4 %) ab. Danach ist ein stetiger Anstieg bis auf ein Niveau von 4,15 % in der 40. LW zu beobachten. Auch GRABOWSKI (2000) stellt das Protein, abgesehen von der Fütterung, als relativ autonomen Parameter dar, der nicht mit der Zellzahl korreliert. Es ist also davon auszugehen, dass hier eher ein Einfluss durch die Fütterung in Form eines Energieüberschusses vorliegt (KIRCHGESSNER, 1997) als durch die Erkrankung der Milchdrüse.

Der leichte Anstieg des Gesamtproteins bei Kuh 813 während der akuten Mastitis ist möglicherweise auf einen leichten Rückgang der Milchmenge oder einen starken

Anstieg des Molkenproteins zurück zu führen, da sie ansonsten eine sehr konstante Eiweißkonzentration in der Milch aufweist.

Bei der dargestellten Ziege zeigt sich kein Einfluss der Mastitis auf den Milchproteingehalt.

GUTJAHR et al. (1997) führen an, dass bei klinischen Mastitiden der Harnstoffgehalt in der Milch sinkt. Da dieser Parameter eher der Beurteilung der Stoffwechsellage der Kuh dient, könnte dieser Umstand nach ihnen zu Fehleinschätzungen hinsichtlich der Fütterung führen. Zwar sinkt auch bei den beiden hier dargestellten Kühen der Harnstoffgehalt anfangs ab, was sich jedoch in den Grenzen bewegt, die keine Änderung der Fütterung veranlassen würden. Zudem kommt es im Fenster der akuten Erkrankung und unter der Behandlung der Mastitiden schnell wieder zu einem Anstieg des Harnstoffgehaltes in der Milch.

Vergleich der verschiedenen Melkgruppen in Bezug zur Zellzahl

Bei einem Vergleich der Zellzahlen in den verschiedenen Melkgruppen lassen sich Unterschiede nachweisen, denen verschiedene Ursachen zu Grunde liegen können. So besteht die Gruppe III, die im Fischgräten-Melkstand gemolken wurde, aus einer heterogenen Tiergruppe, wobei ein großer Anteil aus älteren Kühen und aus Tieren mit niedrigeren Milchleistungen besteht. Hier waren auf Grund dieser Umstände höhere durchschnittliche Zellzahlen zu erwarten, die sich in der Auswertung bestätigt haben. Allerdings weisen die Kühe der Gruppe II eine annähernd gleiche Altersstruktur mit mehr Kühen in höheren Laktationsnummern auf, haben jedoch durchschnittlich niedrigere Zellzahlen. Hier spielen also anscheinend andere Umstände der Einzeltiere eine Rolle. So besteht die Gruppe II ebenfalls aus einer Gruppe von homogenen Versuchstieren. Dass das Alter bzw. die Laktationsnummer nicht unbedingt ein Grund für erhöhte Zellzahlen ist, zeigt auch der Vergleich der Tiere aus der Gruppe II (mit älteren Tieren) und dem Anteil der Tiere aus der Gruppe I, die wie die Gruppe II im Melkkarussell gemolken wurden. Hier ist kein Unterschied in der Zellzahlklasse zu erkennen.

Interessant ist besonders der Unterschied in der Zellzahl zwischen den Tieren der homogenen Versuchsgruppe I, die im automatischen Melksystem und im Melkkarussell gemolken wurden. Im AMS hatten die Tiere durchschnittlich niedrigere Zellzahlen in der Milch als die des Melkkarussells. Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchungen der Tanksammelmilch von den gleichen Tieren über einen längeren

Zeitraum von 29 Monaten durch WIRTZ (2003) bestätigt. Während im konventionellen Melksystem die Zwischenmelkzeit zwischen 10 und 14 h lag, besuchten die Kühe den Melkautomaten im Schnitt alle 7,8 h. Im Gegensatz dazu beschreiben andere Autoren den gegenteiligen Effekt, d.h. dass die kürzeren Zwischenmelkzeiten im AMS gegenüber dem konventionellen Melksystem mit höheren Zellzahlen einhergehen (HAMANN & GYODI 2000, SCHOLZ et al., 2001; BARTH, 2001).

4 Schlussbetrachtung

Für beide in dieser Arbeit betrachteten Proteine konnten nicht-radioaktive enzym-immunologische Testsysteme entwickelt werden, mit denen die Gehalte in der Milch von Kühen und Ziegen routinemäßig mit hohem Probendurchsatz gemessen werden konnten. Auf diesem Weg waren quantitative Aussagen über das Vorkommen von IGFBP-2 und Lactoferrin in der Milch von Kühen und Ziegen während verschiedener physiologischer Zustände (Gravidität, Laktation) sowie in Abhängigkeit von der Eutergesundheit möglich.

Für den praktischen Einsatz konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

Will man die Lactoferrinkonzentration in der Milch zur Mastitsdiagnose nutzen, muss immer das Laktationsstadium der Tiere berücksichtigt werden, da sich im Verlauf der Laktation die Lf-Konzentrationen in der Milch ändern. Umgekehrt darf mit der Milch euterkranker Kühen ebenfalls keine Aussage zur Lf-Konzentration im Laktationsverlauf gemacht werden, da auch hier ein erheblicher Einfluss auf den Lf-Gehalt der Milch vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein eindeutiger Einfluss der Trächtigkeit auf den Gehalt des IGFBP-2 in Kuh- bzw. Ziegenmilch nachgewiesen werden. Aussagen aus der Literatur, wonach die Konzeptionschancen von Milchkühen anhand der BP-2-Konzentrationen beurteilt werden könnten, sind damit widerlegt. Ein Einsatz von IGFBP-2-Messungen in der Milch zu diesem Zweck kann somit weder bei der Kuh noch bei der Ziege empfohlen werden.

5 Anhang

Chemikalien und Puffer

Reinstwasser

Leitungswasser aufbereitet über zweistufige Umkehrosmose (elect water purifier, USF Deutschland GmbH, Rausbach-Baumbach)

PBS

0,136 M	NaCl	
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	(Sigma)
2,7 mM	KCl	(Sigma)
1,5 mM	KH ₂ PO ₄	(Sigma)
pH 7,4		

Elektrophorese und Western Blot

Trenngel 10-%ig (10 ml)

3,3 ml	Acrylamid (30 %)	(rotiphorese® Gel A, Roth)
1,32 ml	Bisacrylamid (2 %)	(rotiphorese® Gel B, Roth)
2,5 ml	Trenngelpuffer:	
	1,5 M Tris/Cl	(Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Roth, pH 8,8 mit HCl eingestellt)
	0,4 % SDS	(Natriumdodecylsulfat, Sigma)
	1,9 ml H ₂ O	

Trenngel 12-%ig (10 ml)

4,0 ml	Acrylamid (30 %)
1,6 ml	Bisacrylamid (2 %)
2,5 ml	Trenngelpuffer (s.o.)

Das Gemisch wird entgast und jeweils mit

45 µl	10 % Ammoniumpersulfat-Lösung	(Sigma)
5 µl	TEMED	(Roth)

versetzt.

Sammelgel 5,6-%ig (6 ml)

1,25 ml	Sammelgelpuffer:
	0,5 M Tris/Cl pH 6,8
	4 % SDS
0,45 ml	Acrylamid (30 %)
0,3 ml	Bisacrylamid (2 %)
4,0 ml	H ₂ O

Das Gemisch wird entgast und mit

45 µl	10 % Ammoniumpersulfat-Lösung
10 µl	TEMED

versetzt.

SDS-Probenpuffer (2x konzentriert)

3 ml	Bromphenolblau-Lösung:	
20 mg	Bromphenolblau	(Sigma)
	10 ml 0,1 M Tris/Cl pH 7,5	
40 ml	Glycerin	(Merck)
10 ml	20 % SDS-Lösung	
4 ml	1 M Tris/Cl pH 6,8	
mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen		

Probenpuffer (2x konzentriert) mit Mercaptoethanol

s.o. mit Zusatz von

4 ml	2-Mercaptoethanol	(Sigma)
------	-------------------	---------

Laufpuffer

25 mM	Tris	
0,2 M	Glycin	(Roth)
0,1 %	SDS	

Färbelösung für Gele

2,5 g	Coomassiebrilliantblau	(Brillant Blau R 250, Roth)
454 ml	Methanol	(Roth)
92 ml	Eisessig	(Roth)
mit H ₂ O auf 1 l auffüllen		

Entfärbelösung

100 ml	Methanol
150 ml	Eisessig
mit H ₂ O auf 1 l auffüllen	

Transferpuffer

50 mM	Tris/Cl
0,38 M	Glycin
pH 8,3	
200 ml	Methanol
mit H ₂ O auf 1 l auffüllen	

Caseinlösung

0,05 M	NaOH	(Roth)
2,5 %	Casein	(Sigma)
1,5 mM	EDTA	(Dinatriumsalz Dihydrat, Roth)
200 µl/l	Proteaseninhibitor	(Complete™, Boehringer Mannheim)
20 ml/l	ProClin 150®	(1 %, Supelco, Bellefonte, PA, USA)
pH 7,2		

BSA-Lösung

5 %	BSA	(Sigma)
0,1 %	Tween 20	(Roth)
in PBS		

Waschpuffer

10 ml Stammlösung
20 ml/l ProClin 150®
mit H₂O auf 1 l auffüllen

Substratpuffer

0,05 M Citronensäure (Roth)
0,055 M Na₂HPO₄
0,05 % Harnstoffperoxyd (Sigma)
20 ml/l ProClin 150®
pH 4,05

TMB-Stammlösung

12,5 mg TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Roth)
1 ml DMSO Dimethylsulfoxid, Sigma)

Substratlösung

17 ml Substratpuffer
340 µl TMB-Lösung

Stoppreagenz

1M Oxalsäure (Roth)

Tabelle 9: Die gemessenen Parameter ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) und Anzahl der untersuchten Milchproben (n) über die einzelnen Laktationswochen in der Kuhmilch

Laktations- woche		Lf ($\mu\text{g/ml}$)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Lactose (%)	Zellzahl (in 1000)	Harnstoff (ppm)	ffA ($\text{mmol}/100\text{gFett}$)
0	\bar{X}	3894	595						
	SEM	222	69,1						
	n	48	16						
1	\bar{X}	199	43,9	4,97	3,58	4,55	79,32	216	0,53
	SEM	54,8	9,38	0,22	0,08	0,03	8,59	10,9	0,23
	n	19	7	19	19	19	19	19	5
2	\bar{X}	159	26,8	4,42	3,32	4,71	69,58	213	0,49
	SEM	19,9	3,35	0,15	0,05	0,03	7,53	9,66	0,19
	n	29	14	30	30	29	30	30	10
3	\bar{X}	128	25,5	4,17	3,12	4,81	54,23	197	0,37
	SEM	13,7	2,71	0,13	0,04	0,02	5,38	7,66	0,13
	n	39	19	39	39	38	39	39	11
4	\bar{X}	152	25,4	3,91	2,99	4,75	46,60	209	0,42
	SEM	19,1	3,39	0,12	0,05	0,06	5,46	8,85	0,22
	n	37	12	37	37	37	37	37	11
5	\bar{X}	127	20,6	3,88	3,00	4,82	53,86	219	0,32
	SEM	14,4	2,24	0,09	0,04	0,04	5,41	7,78	0,13
	n	45	19	46	46	45	46	46	15
6	\bar{X}	167	18,3	3,69	3,01	4,85	45,46	243	0,44
	SEM	27,68	2,24	0,10	0,05	0,02	5,22	8,48	0,14
	n	40	16	40	40	40	40	40	11
7	\bar{X}	151	18,0	3,75	3,02	4,83	47,81	242	0,58
	SEM	18,4	2,32	0,11	0,05	0,03	4,70	6,88	0,11
	n	45	24	45	45	44	45	45	12
8	\bar{X}	142	18,3	3,66	3,00	4,86	44,20	256	0,56
	SEM	16,2	1,79	0,10	0,03	0,02	4,20	8,37	0,11
	n	47	17	47	47	43	47	47	12
9	\bar{X}	161	17,7	3,73	3,03	4,85	47,13	281	0,45
	SEM	20,1	2,35	0,13	0,04	0,02	5,14	12,54	0,10
	n	41	14	43	43	42	43	43	9
10	\bar{X}	174	16,5	3,55	3,09	4,83	55,94	255	0,46
	SEM	24,9	1,95	0,10	0,04	0,02	5,33	7,46	0,12
	n	45	14	46	46	46	46	46	14
11	\bar{X}	156	15,7	3,76	3,08	4,82	60,82	265	0,63
	SEM	16,4	1,71	0,09	0,03	0,01	5,67	8,10	0,10
	n	47	18	49	49	47	49	49	13
12	\bar{X}	156	16,1	3,60	3,08	4,79	49,78	260	0,66
	SEM	13,8	1,35	0,08	0,04	0,04	4,58	8,75	0,12
	n	50	23	50	50	49	51	50	11
13	\bar{X}	166	18,4	3,70	3,13	4,82	53,54	258	0,70
	SEM	14,5	2,15	0,09	0,03	0,02	4,56	7,56	0,15
	n	49	17	50	50	50	50	50	13
14	\bar{X}	184	14,4	3,84	3,18	4,83	56,24	255	0,78
	SEM	15,2	2,14	0,09	0,04	0,02	4,80	6,88	0,16
	n	50	19	53	53	52	53	53	15

Laktations- woche		Lf (µg/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Lactose (%)	Zellzahl (in 1000)	Harnstoff (ppm)	ffA (mmol/ 100gF)
15	\bar{X}	163	18,3	3,83	3,19	4,80	53,59	254	0,81
	SEM	17,6	2,67	0,09	0,04	0,02	4,19	9,08	0,12
	n	46	19	46	46	46	46	46	13
16	\bar{X}	149	20,6	3,71	3,15	4,81	52,12	261	0,81
	SEM	13,7	4,30	0,07	0,03	0,01	4,33	7,74	0,13
	n	46	21	48	48	48	48	48	13
17	\bar{X}	210	18,9	3,76	3,23	4,78	50,08	249	0,84
	SEM	17,9	2,77	0,08	0,03	0,02	4,86	9,08	0,08
	n	44	19	44	44	44	44	44	19
18	\bar{X}	206	18,3	3,95	3,21	4,78	53,44	252	0,93
	SEM	23,1	1,61	0,11	0,05	0,02	4,36	8,23	0,15
	n	48	21	48	48	48	48	48	18
19	\bar{X}	178	21,2	4,03	3,25	4,75	58,97	251	0,81
	SEM	16,5	2,40	0,13	0,04	0,03	4,54	8,56	0,10
	n	44	17	46	46	43	46	46	20
20	\bar{X}	219	17,6	3,85	3,25	4,71	61,46	255	0,72
	SEM	18,8	1,79	0,11	0,04	0,03	5,42	8,19	0,12
	n	43	19	45	45	44	45	45	20
21	\bar{X}	200	22,1	3,86	3,32	4,79	61,73	252	0,83
	SEM	19,5	2,29	0,09	0,04	0,02	5,14	7,97	0,10
	n	45	16	45	45	43	45	45	19
22	\bar{X}	228	21,3	3,84	3,29	4,77	57,16	264	0,80
	SEM	34,6	2,22	0,12	0,04	0,02	4,46	8,56	0,12
	n	46	21	48	48	47	48	48	20
23	\bar{X}	203	20,2	3,90	3,27	4,74	64,88	256	1,02
	SEM	17,3	2,38	0,08	0,04	0,04	4,48	8,82	0,14
	n	49	21	49	49	49	49	49	15
24	\bar{X}	232	18,4	3,93	3,26	4,73	67,04	261	0,77
	SEM	24,4	2,31	0,11	0,04	0,03	6,06	9,19	0,11
	n	45	21	45	45	45	45	45	19
25	\bar{X}	228	20,9	3,82	3,30	4,77	64,34	241	0,95
	SEM	18,2	2,42	0,09	0,03	0,03	5,12	10,05	0,13
	n	43	19	43	43	43	44	43	18
26	\bar{X}	201	17,9	3,92	3,26	4,73	59,90	243	0,85
	SEM	20,4	2,45	0,10	0,05	0,05	4,84	9,95	0,12
	n	40	19	40	40	40	40	40	18
27	\bar{X}	297	26,1	4,09	3,36	4,77	58,94	264	0,84
	SEM	42,4	3,32	0,08	0,04	0,02	4,81	10,92	0,10
	n	41	19	42	42	41	42	42	16
28	\bar{X}	248	20,5	4,12	3,35	4,73	68,02	248	0,77
	SEM	27,4	2,96	0,12	0,05	0,03	5,91	11,97	0,11
	n	36	16	37	37	36	37	37	15
29	\bar{X}	215	24,7	4,06	3,40	4,75	62,64	247	0,77
	SEM	19,8	3,28	0,10	0,05	0,04	5,88	12,77	0,14
	n	31	12	31	31	31	31	31	13
30	\bar{X}	239	18,7	4,09	3,40	4,73	77,89	256	0,95
	SEM	35,2	3,18	0,10	0,05	0,03	6,12	10,47	0,10
	n	40	13	40	40	40	40	40	12
31	\bar{X}	276	15,6	4,17	3,41	4,75	67,56	248	0,82
	SEM	33,8	2,65	0,12	0,05	0,02	5,59	10,87	0,08
	n	33	7	33	33	33	33	33	14

Laktations- woche		Lf (µg/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Lactose (%)	Zellzahl (in 1000)	Harnstoff (ppm)	ffA (mmol/ 100gFett)
32	\bar{X}	228	18,7	4,00	3,36	4,72	60,4	258	1,01
	SEM	27,0	3,82	0,11	0,05	0,04	5,99	10,0	0,14
	n	33	7	34	34	34	34	34	12
33	\bar{X}	231	21,9	3,99	3,37	4,78	64,6	253	0,79
	SEM	28,5	4,26	0,13	0,04	0,02	7,36	14,0	0,08
	n	27	7	27	27	27	27	27	13
34	\bar{X}	292	20,5	4,17	3,45	4,72	70,4	242	0,76
	SEM	33,6	3,33	0,09	0,06	0,05	6,74	9,51	0,08
	n	34	8	35	35	34	35	35	13
35	\bar{X}	284	24,5	4,28	3,55	4,75	73,2	234	0,79
	SEM	38,0	3,10	0,10	0,05	0,02	7,04	10,4	0,11
	n	31	9	32	32	31	32	32	17
36	\bar{X}	241	18,3	4,01	3,43	4,73	69,6	233	0,95
	SEM	24,2	2,63	0,10	0,05	0,02	6,21	10,7	0,12
	n	34	8	34	34	34	34	34	15
37	\bar{X}	305	24,9	4,13	3,44	4,74	74,5	252	0,78
	SEM	55,0	2,43	0,14	0,05	0,03	7,09	10,15	0,09
	n	29	4	29	29	28	29	29	11
38	\bar{X}	284	28,5	4,20	3,45	4,70	80,0	245	0,95
	SEM	29,0	2,77	0,11	0,05	0,03	6,65	10,0	0,18
	n	31	3	31	31	31	31	31	14
39	\bar{X}	261	27,0	4,40	3,57	4,78	82,6	237	1,16
	SEM	39,2	4,52	0,12	0,06	0,04	6,77	11,8	0,32
	n	29	3	29	29	29	29	29	14
40	\bar{X}	265	24,3	4,26	3,57	4,72	76,7	244	0,76
	SEM	26,3	4,85	0,11	0,06	0,04	7,47	12,0	0,08
	n	27	3	27	27	25	27	27	12
41	\bar{X}	279	29,3	4,41	3,63	4,75	78,2	237	0,95
	SEM	28,9	4,71	0,10	0,06	0,04	5,87	12,2	0,16
	n	29	5	29	29	29	29	29	13
42	\bar{X}	269	33,3	4,40	3,64	4,69	80,9	230	0,89
	SEM	65,7	3,25	0,14	0,08	0,05	6,75	12,8	0,18
	n	22	2	22	22	22	22	22	6
43	\bar{X}	283	31,7	4,53	3,76	4,74	83,4	235	0,77
	SEM	39,3	5,12	0,17	0,08	0,03	8,44	9,80	0,13
	n	21	4	21	21	20	21	21	9
44	\bar{X}	326	24,3	4,38	3,66	4,71	83,0	242	0,77
	SEM	64,0	5,14	0,14	0,08	0,05	6,69	11,5	0,28
	n	22	5	22	22	22	22	22	6
45	\bar{X}	173	20,4	4,47	3,73	4,77	72,6	246	0,85
	SEM	38,1	1,78	0,13	0,07	0,05	8,20	14,6	0,12
	n	16	4	16	16	16	16	16	3
46	\bar{X}	272	25,7	4,55	3,66	4,78	89,6	254	1,13
	SEM	32,7	2,57	0,19	0,08	0,04	7,18	13,3	0,42
	n	20	5	19	19	18	20	19	3
47	\bar{X}	272	25,1	4,65	3,84	4,84	79,2	254	0,71
	SEM	44,6	1,90	0,18	0,10	0,12	9,82	18,3	
	n	12	2	12	12	12	12	12	1
48	\bar{X}	284	40,8	4,71	3,84	4,72	87,8	249	0,72
	SEM	71,3	4,56	0,21	0,08	0,05	9,23	15,2	0,32
	n	11	2	11	11	11	11	11	2

Laktations- woche		Lf (µg/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Lactose (%)	Zellzahl (in 1000)	Harnstoff (ppm)	ffA (mmol/ 100gFett)
49	\bar{X}	173	26,5	4,31	3,43	4,61	56,5	248	0,69
	SEM	37,9		0,25	0,22	0,21	9,19	17,4	
	n	7	1	7	7	7	7	7	1
50	\bar{X}	206	15,5	3,36	3,57	4,83	67,6	232	1,08
	SEM	45,7		0,46	0,06	0,09	14,94	32,5	
	n	4	1	3	3	3	4	3	1
51	\bar{X}	302	21,6	4,35	3,75	4,86	58,9	234	
	SEM	108	3,31	0,44	0,26	0,09	16,62	34,1	
	n	5	2	5	5	5	5	5	
52	\bar{X}	437	13,8	4,90	3,81	4,73	92,6	232	0,76
	SEM	211		0,41	0,18	0,09	22,05	24,5	
	n	4	1	4	4	4	4	4	1
53	\bar{X}_t	502		4,39	3,73	4,72	87,3	291	
	SEM	106		0,17	0,03	0,18	30,39	31,4	
	n	3		3	3	2	3	3	
54	\bar{X}	360	41,4	4,55	3,75	4,82	78,3	249	
	SEM	237		0,10	0,05	0,15	25,50	34,0	
	n	3	1	3	3	3	3	3	
55	\bar{X}	224	31,7	4,43	3,72	4,84	71,2	270	
	SEM	81,7		0,22	0,10	0,06	15,45	13,4	
	n	5	1	5	5	5	5	5	
56	\bar{X}	120	24,1	4,21	3,75	4,98	86,1	235	
	SEM	29,3		0,14	0,18	0,05	2,60	18,5	
	n	3	1	3	3	3	3	3	
57	\bar{X}	247		4,63	3,81	4,87	69,7	226	
	SEM	94,5		0,21	0,19	0,07	10,68	14,0	
	n	4		4	4	4	4	4	
58	\bar{X}	333		5,18	4,15	4,80	84,7	202	0,38
	SEM	236		0,56	0,24	0,23	21,29	4,32	
	n	2		2	2	2	2	2	1
59	\bar{X}	519	22,8	5,43	4,37	4,99	128	137	
	SEM								
	n	1	1	1	1	1	1	1	
Σ	\bar{X}	308	35,0	3,99	3,29	4,77	62,1	248	0,77
	SEM	15,4	3,96	0,02	0,01	0,00	0,84	1,42	0,02
	n	1821	639	1795	1795	1765	1799	1795	612

Tabelle 10: Jahreszeitlicher Verlauf der gemessenen Parameter ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) und Anzahl der untersuchten Milchproben (n) in der Kuhmilch *

Kalender- woche	Lf ($\mu\text{g/ml}$)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Lactose (%)	Zellzahl (in 1000)	Harnstoff (ppm)	ffa ($\text{mmol}/$ 100gFett)
JANUAR								
3	\bar{X}	184	29,2	4,08	3,42	4,81	69,4	266
	SEM	18,1	2,49	0,07	0,04	0,02	4,53	4,54
	n	61	10	61	61	31	61	61
4	\bar{X}	77,0	26,5	3,76	3,36	4,79	59,9	247
	SEM	5,81	2,69	0,08	0,05	0,02	4,47	4,77
	n	61	9	61	61	61	61	61
5	\bar{X}	67,7	20,3	4,04	3,43	4,79	70,6	256
	SEM	3,89	2,05	0,08	0,04	0,02	4,66	3,72
	n	64	9	64	64	64	64	64
FEBRUAR								
6	\bar{X}	210	26,1	4,18	3,38	4,82	62,5	286
	SEM	14,6	2,42	0,13	0,04	0,02	4,72	5,67
	n	56	12	52	52	52	56	52
7	\bar{X}	138	26,3	3,98	3,35	4,81	65,9	246
	SEM	10,17	3,29	0,08	0,05	0,02	5,24	4,73
	n	55	9	55	55	55	55	55
8	\bar{X}	160	30,4	3,88	3,40	4,82	60,6	247
	SEM	18,9	2,73	0,09	0,04	0,02	5,34	4,11
	n	53	14	58	58	58	58	58
9	\bar{X}	393	25,7	4,03	3,45	4,79	60,7	270
	SEM	59,6	2,61	0,09	0,07	0,03	6,97	6,41
	n	26	6	26	26	26	26	26
MÄRZ								
10	\bar{X}	187	26,3	4,22	3,45	4,84	60,0	259
	SEM	20,6	2,89	0,11	0,06	0,02	4,65	6,32
	n	53	17	53	53	53	53	53
11	\bar{X}	229	28,8	4,17	3,43	4,81	59,7	230
	SEM	23,6	6,21	0,08	0,05	0,02	4,86	4,78
	n	55	14	56	56	56	56	56
12	\bar{X}	276	16,8	4,12	3,47	4,81	59,5	209
	SEM	18,3	3,73	0,10	0,05	0,02	4,98	4,60
	n	59	17	59	59	59	59	59
13	\bar{X}	259	18,6	4,20	3,43	4,80	61,9	206
	SEM	38,7	2,26	0,10	0,04	0,02	4,18	4,41
	n	60	17	61	61	61	61	61
APRIL								
14	Keine Probennahme (MKS-Schutzmaßnahme)							
15	\bar{X}	134	19,9	3,96	3,12	4,50	61,7	216
	SEM	9,96	1,96	0,10	0,08	0,09	4,68	5,56
	n	52	19	52	52	52	52	52
16	Keine Probennahme (MKS-Schutzmaßnahme)							
17	\bar{X}	293	18,4	4,11	3,28	4,77	59,2	204
	SEM	26,4	1,72	0,08	0,04	0,02	4,37	3,55
	n	62	24	64	64	64	64	64

Kalender- woche	Lf (µg/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Lactose (%)	Zellzahl (in 1000)	Harnstoff (ppm)	ffa (mmol/ 100gFett)	
MAI									
18	Keine Probennahme (MKS-Schutzmaßnahme)								
	\bar{X}	241	16,0	4,18	3,30	4,76	63,0	304	
19	SEM	22,5	1,09	0,08	0,04	0,02	4,79	6,13	
	<i>n</i>	62	24	62	62	62	62	62	
20	Keine Probennahme (MKS-Schutzmaßnahme)								
	\bar{X}	244	15,5	3,93	3,23	4,76	65,1	339	
21	SEM	24,5	1,58	0,09	0,04	0,02	4,86	6,44	
	<i>n</i>	62	22	62	62	62	62	62	
	\bar{X}	159	21,7	4,10	3,20	4,77	65,7	350	
22	SEM	10,0	5,93	0,11	0,04	0,03	4,81	6,13	
	<i>n</i>	62	9	63	63	63	63	63	
JUNI									
	\bar{X}	326	18,5	4,06	3,24	4,72	67,0	313	
23	SEM	30,3	1,99	0,08	0,05	0,02	4,40	5,87	
	<i>n</i>	59	23	66	66	66	66	66	
24	Keine Probennahme								
	\bar{X}	98,8	14,5	3,74	3,18	4,78	59,4	314	
25	SEM	8,19	1,24	0,07	0,04	0,02	4,37	4,93	
	<i>n</i>	63	27	63	63	63	63	63	
	\bar{X}	250	18,3	4,14	3,18	4,78	63,9	292	
26	SEM	14,5	1,95	0,11	0,04	0,02	4,36	6,50	
	<i>n</i>	57	26	57	57	57	57	57	
JULI									
	\bar{X}	248	30,0	3,86	3,10	4,76	71,6	291	0,56
27	SEM	36,0	1,65	0,07	0,04	0,02	4,87	4,86	0,05
	<i>n</i>	60	27	62	62	62	62	62	32
28	Keine Probennahme								
	\bar{X}	197	26,5	3,94	3,16	4,74	60,4	197	0,81
29	SEM	11,4	2,85	0,06	0,03	0,02	4,16	4,05	0,05
	<i>n</i>	50	22	50	50	50	50	50	50
	\bar{X}	245	27,4	4,30	3,29	4,76	61,2	236	0,69
30	SEM	20,1	2,58	0,13	0,04	0,02	4,70	4,42	0,04
	<i>n</i>	55	26	55	55	55	55	55	55
	\bar{X}	171	23,5	3,80	3,21	4,75	60,5	229	0,85
31	SEM	9,84	1,79	0,07	0,04	0,02	4,55	3,98	0,04
	<i>n</i>	66	31	66	66	66	66	66	66
AUGUST									
	\bar{X}	151	22,5	3,43	3,22	4,76	58,9	234	0,71
32	SEM	13,6	2,87	0,08	0,04	0,02	5,18	4,23	0,06
	<i>n</i>	57	27	58	58	58	58	58	58
	\bar{X}	218	18,8	3,86	3,20	4,79	59,8	228	0,78
33	SEM	20,0	2,33	0,08	0,04	0,02	4,64	3,36	0,05
	<i>n</i>	59	27	59	59	59	59	59	59
	\bar{X}	209	15,8	3,97	3,26	4,79	57,6	250	0,80
34	SEM	16,8	1,72	0,10	0,04	0,02	4,00	4,49	0,04
	<i>n</i>	56	24	56	56	56	56	56	56
	\bar{X}	154	15,0	3,91	3,20	4,78	59,7	225	1,28
35	SEM	10,6	1,53	0,08	0,04	0,02	4,26	5,00	0,07
	<i>n</i>	62	31	62	62	62	62	62	62

Kalender- woche		Lf ($\mu\text{g/ml}$)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Lactose (%)	Zellzahl (in 1000)	Harnstoff (ppm)	ffa ($\text{mmol}/$ 100gFett)
SEPTEMBER									
36	\bar{X}	251	12,0	3,83	3,25	4,74	56,5	184	0,74
	SEM	12,8	1,19	0,10	0,04	0,02	4,30	4,09	0,06
	<i>n</i>	59	25	62	62	62	62	62	62
37	\bar{X}	366	19,7	3,82	3,28	4,78	59,9	180	
	SEM	25,5	1,15	0,07	0,03	0,02	4,93	4,34	
	<i>n</i>	58	25	58	58	58	58	58	
38	\bar{X}	245	20,2	4,28	3,31	4,77	62,3	171	0,55
	SEM	17,4	1,63	0,12	0,04	0,02	4,75	4,79	0,12
	<i>n</i>	51	24	54	54	54	54	54	54
39	\bar{X}	260	16,8	3,96	3,41	4,79	59,9	173	0,53
	SEM	18,7	1,23	0,10	0,05	0,03	4,38	3,93	0,08
	<i>n</i>	58	26	58	58	58	58	58	58
VERSUCHSENDE									
	\bar{X}	210	20,6	3,99	3,29	4,77	62,1	248	0,77
Σ	SEM	4,00	0,45	0,02	0,01	0,00	0,84	1,42	0,02
	<i>n</i>	1773	623	1795	1795	1765	1799	1795	612

* ab Laktationswoche 1, d, h, ohne Kolostralmilchproben

Tabelle 11: Die gemessenen Parameter ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) und Anzahl der untersuchten Milchproben (n) über die einzelnen Laktationswochen in der Ziegenmilch der Laktation 2001

Laktations- woche		Lf ($\mu\text{g/ml}$)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Zellzahl (in 1000)	Milch (kg/Tag)
0	\bar{X}	387	936				
	SEM	68,8	203				
	n	20	20				
1	\bar{X}	61,6	65,2	3,86	4,67	1109	3,40
	SEM	24,9	8,77	0,13	0,31	643	0,40
	n	20	20	2	2	15	2
2	\bar{X}	15,4	38,8	3,54	4,80	257	2,70
	SEM	5,88	4,71	0,10	0,66	70,5	0,35
	n	20	20	3	3	3	3
3	\bar{X}	12,3	22,0	3,40	2,84	200	4,90
	SEM	4,03	2,57				
	n	20	20	1	1	1	1
4	\bar{X}	11,5	18,8				
	SEM	2,35	2,10				
	n	19	19				
5	\bar{X}	11,6	19,6	3,29	3,96	487	4,29
	SEM	3,06	2,38	0,05	0,09	111	0,30
	n	19	19	15	15	15	15
6	\bar{X}	10,1	20,5	3,12	3,75	273	2,77
	SEM	2,39	2,87	0,09	0,48	59,0	0,18
	n	19	19	3	3	3	3
7	\bar{X}	13,4	17,0	3,30	3,35	352	4,20
	SEM	2,95	2,18				
	n	19	19	1	1	1	1
8	\bar{X}	15,6	19,0				
	SEM	5,06	2,39				
	n	19	19				
9	\bar{X}	12,8	17,8	3,15	3,80	529	4,38
	SEM	2,61	2,08	0,05	0,08	108	0,40
	n	19	19	13	13	13	13
10	\bar{X}	14,8	16,0				
	SEM	3,45	1,88				
	n	19	19				
11	\bar{X}	19,3	17,7				
	SEM	3,92	2,21				
	n	19	19				
12	\bar{X}	19,8	17,8				
	SEM	7,01	2,02				
	n	18	18				
13	\bar{X}	24,7	22,2	3,20	3,98	143	3,20
	SEM	8,54	3,45	.			
	n	19	19	1	1	1	1
14	\bar{X}	24,4	18,2	3,05	3,39	322	3,98
	SEM	9,41	3,03	0,08	0,17	78,5	0,46
	n	19	19	4	4	4	4
15	\bar{X}	13,9	21,8	3,06	2,86	321	4,50
	SEM	5,07	3,90				
	n	19	19	1	1	1	1

Laktations- woche		Lf (µg/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Zellzahl (in 1000)	Milch (kg/Tag)
16	\bar{X}	15,8	16,2				
	SEM	3,31	2,22				
	n	19	19				
17	\bar{X}	15,1	16,4	3,10	3,67	591	5,16
	SEM	3,26	2,54	0,06	0,10	172	0,52
	n	19	19	14	14	14	14
18	\bar{X}	14,8	12,3	2,92	3,34	408	4,28
	SEM	3,63	2,06	0,09	0,20	96,0	0,38
	n	19	19	4	4	4	4
19	\bar{X}	13,4	15,5	2,97	2,83	610	3,70
	SEM	2,48	1,90				
	n	18	18	1	1	1	1
20	\bar{X}	15,8	14,5				
	SEM	3,48	2,01				
	n	19	19				
21	\bar{X}	19,4	17,2	2,98	3,56	648	5,20
	SEM	5,21	1,90	0,04	0,16	179	0,49
	n	19	19	14	14	14	14
22	\bar{X}	20,2	19,0	3,13	3,40	509	4,00
	SEM	6,37	2,51	0,11	0,15	292	0,66
	n	19	19	3	3	3	3
23	\bar{X}	19,5	19,2	3,20	3,55	577	3,35
	SEM	3,85	2,06	0,01	0,19	46,5	0,05
	n	19	19	2	2	2	2
24	\bar{X}	19,5	22,0				
	SEM	3,76	2,72				
	n	19	19				
25	\bar{X}	17,0	20,4	3,13	3,67	927	4,93
	SEM	2,85	2,65	0,04	0,22	222	0,34
	n	19	19	13	13	13	13
26	\bar{X}	25,9	25,4				
	SEM	4,72	3,46				
	n	19	19				
27	\bar{X}	33,5	109	3,40	3,85	552	2,90
	SEM	7,99	67,8				
	n	18	18	1	1	1	1
28	\bar{X}	23,0	35,1	3,37	3,10	681	3,03
	SEM	3,33	3,94	0,12	0,19	239	0,59
	n	18	18	3	3	3	3
29	\bar{X}	25,6	20,5	3,28	3,48	776	3,20
	SEM	4,92	2,96	0,02	0,20	69,0	0,20
	n	18	18	2	2	2	2
30	\bar{X}	28,0	33,7				
	SEM	4,41	3,93				
	n	18	18				
31	\bar{X}	28,2	19,7	3,32	3,70	1030	4,37
	SEM	4,06	3,07	0,07	0,16	187	0,34
	n	18	18	12	12	12	12

Laktations- woche		Lf (µg/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Zellzahl (in 1000)	Milch (kg/Tag)
32	\bar{X}	27,9	30,1				
	SEM	5,12	5,72				
	n	18	18				
33	\bar{X}	39,8	19,6	3,46	4,53	604	1,90
	SEM	7,79	2,99				
	n	17	17	1	1	1	1
34	\bar{X}	45,3	32,4	3,37	3,24	683	2,77
	SEM	7,55	5,60	0,15	0,37	150	0,58
	n	17	17	3	3	3	3
35	\bar{X}	49,0	29,7	3,49	4,53	1723	2,20
	SEM	10,6	4,15	0,02	0,06	174	0,20
	n	17	17	2	2	2	2
36	\bar{X}	51,4	17,8				
	SEM	9,67	2,21				
	n	17	17				
37	\bar{X}	57,8	22,4	3,36	3,86	1181	3,92
	SEM	9,76	3,85	0,06	0,16	277	0,26
	n	17	17	11	11	11	11
38	\bar{X}	59,3	20,4				
	SEM	11,1	3,48				
	n	17	17				
39	\bar{X}	58,1	21,0	3,89	5,21	1636	1,10
	SEM	13,3	4,50	.	.		
	n	17	17	1	1	1	1
40	\bar{X}	72,4	33,4	3,91	4,51	1577	1,87
	SEM	11,6	7,52	0,08	0,27	316	0,15
	n	16	16	3	3	3	3
41	\bar{X}	83,7	63,0	4,43	5,05	4500	0,90
	SEM	18,0	20,3				
	n	16	16	1	1	1	1
42	\bar{X}	91,5	99,8				
	SEM	22,2	41,8				
	n	15	15				
43	\bar{X}	96,0	52,4	4,13	4,57	4295	1,93
	SEM	18,6	15,7	0,23	0,23	954	0,28
	n	12	12	10	10	10	10
44	\bar{X}	107	366				
	SEM	19,4	246				
	n	11	11				
45	\bar{X}	148	228				
	SEM	35,7	77,0				
	n	10	10				
46	\bar{X}	138	80,5	3,97	4,06	1522	1,40
	SEM	65,1	43,9				
	n	6	6	1	1	1	1
47	\bar{X}	77,3	52,4				
	SEM	25,7	11,6				
	n	5	5				

Laktations- woche		Lf (µg/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	Fett (%)	Eiweiß (%)	Zellzahl (in 1000)	Milch (kg/Tag)
48	\bar{X}	152	96,3				
	SEM	68,6	44,3				
	n	4	4				
49	\bar{X}	136	125	3,96	4,60	4672	2,05
	SEM	101	93,1	0,36	0,24	366	0,25
	n	3	3	2	2	2	2
50	\bar{X}	45,3	38,9				
	SEM	23,7	9,36				
	n	2	2				
Insgesamt	\bar{X}	42,8	57,1	3,31	3,82	1052	3,96
	SEM	2,98	7,79	0,03	0,05	121	0,13
	n	842	842	148	148	161	148

Tabelle 12: Lactoferrinkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) in der Ziegenmilch der einzelnen Tiere über die Laktation 2001 mit zugeordneter Laktationsnummer

Ziege Nr.	808	859	911	914	917	921	922	931	963	
Laktations-Nr.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
LW	0	255,38	239,33	95,55	471,68	297,44	124,80	420,96	239,60	39,46
	1	26,03	13,14	3,94	5,58	9,37	32,54	24,07	8,70	35,74
	2	3,96	8,55	3,13	4,16	2,48	8,17	5,19	3,48	6,82
	3	3,09	0,93	3,55	3,08	2,52	3,95	13,97	3,92	4,22
	4	7,00	†	4,75	5,05	3,33	14,11	10,98	2,69	5,30
	5	1,78		1,83	4,06	4,22	7,68	9,86	3,65	6,38
	6	2,06		1,29	4,95	3,64	1,84	9,71	3,98	7,40
	7	0,63		0,46	4,90	6,20	8,02	13,72	6,89	8,72
	8	1,43		0,97	3,92	8,68	8,20	17,31	5,56	10,86
	9	1,80		0,66	3,64	7,57	9,35	16,07	6,37	13,55
	10	1,99		0,90	6,27	7,27	9,82	10,19	5,24	8,89
	11	2,40		1,89	6,83	38,20	12,92	14,06	6,87	14,74
	12	4,01		1,03	12,03	4,28	12,73	35,35	27,41	13,76
	13	2,44		0,72	7,85	17,34	9,09	42,58	10,49	10,30
	14	1,48		8,28	22,72	10,36	8,49	13,90	7,30	14,44
	15	1,73		0,39	3,38	7,74	5,61	11,50	9,51	10,01
	16	5,38		3,92	6,61	7,05	45,78	15,06	7,34	10,28
	17	2,79		1,91	8,27	9,17	14,73	13,22	9,16	11,91
	18	2,18		2,42	8,21	6,39	9,90	19,51	11,74	9,94
	19	2,44		1,83	8,21	10,34	11,56	21,86	13,00	13,47
	20	1,91		1,55	14,60	7,33	13,54	17,81	11,36	9,00
	21	1,20		1,09	8,20	11,05	19,42	24,71	17,66	14,09
	22	2,28		1,73	9,94	9,19	22,28	23,96	13,11	15,71
	23	3,35		1,96	12,40	15,48	16,48	64,61	14,10	15,72
	24	2,49		1,68	14,15	12,37	18,63	30,61	8,08	14,04
	25	2,44		1,72	13,14	12,71	12,08	26,55	12,44	18,91
	26	2,44		1,35	22,43	6,09	40,18	23,60	22,29	12,62
	27	2,60		2,01	29,60	29,56	19,95	54,80	29,23	13,45
	28	2,80		1,40	24,00	24,70	19,35	26,57	25,37	12,50
	29	1,55		1,29	22,20	10,38	18,50	34,21	33,38	11,83
	30	7,36		5,16	29,07	7,18	35,96	39,48	22,72	19,37
	31	7,58		10,67	20,25	29,64	20,75	44,18	13,97	20,04
	32	3,90		1,69	7,81	16,94	22,60	52,61	44,27	17,38
	33	1,41		2,31	16,97	33,41	49,25	98,23	61,83	13,64
	34	2,48		2,03	20,51	35,61	39,68	108,31	71,26	25,54
	35	1,93		3,15	41,09	30,69	46,04	102,90	54,78	15,78
	36	2,58		3,65	36,02	32,03	73,42	78,97	73,25	27,03
	37	2,97		4,43	135,08	30,91	61,57	116,20	75,15	14,83
	38	4,84		4,59	40,34	71,21	51,55	83,91	70,88	9,11
	39	3,80		3,26	29,02	39,59	33,21	109,82	93,76	27,77
	40	7,04		59,40	94,01	58,83	47,44	149,12	124,05	29,95
	41	12,34		7,31	41,46	59,86	49,62	125,85	237,55	60,61
	42	13,24		6,67	75,23	60,88	67,42	120,73	321,66	53,05
	43	27,64		4,10	113,06	73,98	90,13	179,08		230,08
	44	229,34		7,68	86,48	62,54	103,57	138,93		
	45	318,17		6,21		58,45	82,91	141,65		
	46			5,88			61,13	139,81		
	47			6,31			82,67	100,01		
	48			5,06			228,82			
	49			13,80			336,63			
	50			21,59						

Ziege Nr.	967	969	803	807	809*	811	853	854	856
Laktations-Nr.	2	2	3	3	3	3	3	3	3
LW 0	656,29	325,49	883,49	1224,38	421,34	363,30	828,03	234,91	316,69
1	16,38	12,44	500,45	12,68	119,81	77,71	39,77	14,45	105,52
2	6,30	6,57	120,64	4,13	172,01	33,37	14,81	7,71	28,13
3	4,03	7,40	80,31	7,32	76,60	37,28	12,32	5,17	20,43
4	18,10	1,73	36,63	6,82	78,59	38,03	11,24	8,71	15,27
5	1,64	9,90	57,96	7,08	65,05	31,42	8,72	8,01	21,89
6	1,64	9,01	41,65	3,23	69,69	26,32	12,61	9,08	22,46
7	2,20	7,18	48,61	10,13	63,14	38,34	9,09	10,26	19,88
8	1,15	14,17	35,02	5,35	80,33	33,95	7,41	13,11	15,86
9	2,94	12,33	48,42	3,69	43,31	23,44	7,93	16,38	17,44
10	2,78	11,58	46,81	5,29	77,93	36,62	9,15	14,86	15,55
11	4,97	23,38	41,22	14,50	92,90	27,27	9,46	12,99	17,59
12	3,94	9,10	26,98	6,06	23,37	6,70	7,03	31,68	17,66
13	1,32	7,26	143,25	2,70	57,72	47,54	5,55	7,13	16,14
14	1,96	8,88	32,49	9,96	10,51	9,47	20,58	13,50	42,29
15	2,10	6,04	46,21	1,71	9,72	16,87	5,10	9,56	10,72
16	6,48	13,92	47,62	1,89	40,34	18,89	5,89	15,38	10,31
17	2,30	8,50	42,61	3,98	117,84	41,31	7,88	13,64	10,45
18	2,15	6,88	40,25	3,07	90,78	22,94	8,04	17,31	12,68
19	2,37	13,31	41,30	5,11	336,31	25,66	6,96	23,64	12,32
20	2,16	13,96	42,34	3,46	102,91	32,21	7,20	13,58	10,90
21	3,13	12,65	48,29	1,68	108,14	31,65	6,18	22,01	6,99
22	4,34	6,85	30,55	2,71	14,71	28,64	8,19	21,11	16,52
23	4,10	11,96	34,93	13,67	36,93	36,24	11,66	0,83	14,77
24	3,27	19,81	41,78	5,43	16,94	43,51	9,51	25,48	16,33
25	4,28	15,67	46,83	2,42	32,83	37,63	3,40	31,23	20,22
26	3,20	18,65	39,60	20,22	75,09	43,16	23,53	36,83	27,91
27	3,42	131,23	45,20	8,21	16,58	67,52	†	35,87	21,55
28	3,52	29,23	47,58	6,16	35,60	38,32		36,34	25,66
29	4,83	77,40	60,13	10,16	12,99	44,92		24,22	23,52
30	8,04	36,96	73,82	18,33	41,53	61,83		23,71	25,19
31	17,95	38,20	40,93	17,69	26,54	82,84		35,17	26,39
32	6,35	75,74	60,96	9,09	40,96	42,67		51,14	22,20
33	4,56	103,27	68,28	8,28	63,01	62,17		52,90	24,44
34	20,06	57,18	90,64	11,56	63,10	69,24		64,72	32,95
35	6,69	19,58	108,27	14,11	54,68	95,70		62,35	41,20
36	12,66	33,36	85,16	22,09	126,70	169,17		54,82	51,76
37	12,54	27,87	103,48	33,83	46,10	82,32		66,85	49,16
38	26,89	38,57	169,95	64,82	45,34	143,25		72,13	44,10
39	20,48	39,43	232,74	40,84	130,84	30,00		84,29	39,48
40	23,32	36,39		82,71	45,99	144,21		53,91	51,24
41	26,73	60,95		91,60	48,40	258,02		67,77	58,85
42	28,54			83,70	36,91	248,97		116,60	38,26
43	35,09			133,53	77,63				107,48
44	141,72			189,13	115,86				39,74
45	328,18			252,08	137,91				63,36
46					143,36				102,46
47									156,80
48									301,77
49									
50									

* Ziege mit Mastitis, dargestellt als Einzeltier in Kapitel 3.2.2.4

Ziege Nr.		860	324	309
Laktations-Nr.		3	4	5
LW	0	109,58	548,74	74,34
	1	57,68	54,59	181,32
	2	26,10	6,79	8,02
	3	12,41	8,56	12,50
	4	4,98	8,46	16,31
	5	11,20	9,01	14,11
	6	4,56	7,75	18,29
	7	11,67	16,77	31,01
	8	97,48	2,23	15,09
	9	8,76	28,66	14,80
	10	15,46	55,10	18,23
	11	19,19	73,52	26,01
	12	26,73	132,94	12,63
	13	14,03	100,70	23,19
	14	39,04	187,03	11,44
	15	15,48	95,25	4,93
	16	12,80	45,34	19,37
	17	16,33	51,45	17,84
	18	15,60	68,39	13,33
	19	9,90	45,15	14,83
	20	21,21	62,28	14,13
	21	19,86	99,58	18,80
	22	26,08	127,26	12,83
	23	19,33	51,10	28,20
	24	20,47	66,38	16,54
	25	22,56	16,23	22,62
	26	34,94	91,85	21,20
	27	4,56	87,01	17,15
	28	21,44	48,36	20,39
	29	20,45	48,36	13,03
	30	20,99	46,77	22,67
	31	18,53	27,47	36,24
	32	12,81	28,34	25,30
	33	23,99	52,12	
	34	41,53	75,99	
	35	32,91	156,16	
	36	54,62	62,85	
	37	72,80	92,19	
	38	20,55	91,56	
	39	80,13	80,68	
	40	48,45	147,62	
	41	62,74	119,72	
	42	55,95	82,29	
	43	58,12	99,60	
	44	85,79	94,15	
	45	98,94	130,00	
	46	66,13	450,06	
	47	40,67		
	48	71,35		
	49	57,80		
	50	69,02		

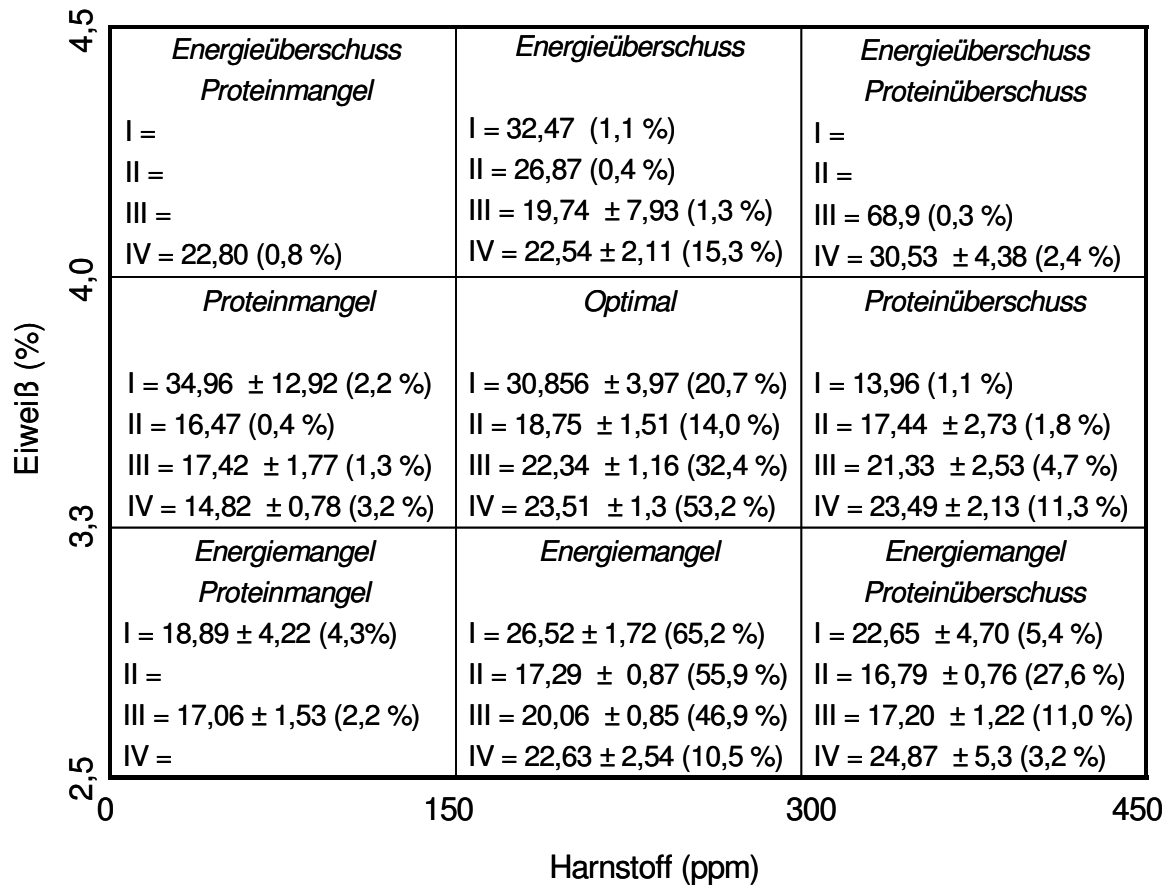


Abbildung 42: IGFBP-2-Konzentrationen ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) in den verschiedenen Laktationsstadien und ihre Zuordnung in die 9-Felder-Tafel (LKV Rheinland 2001). Die Häufigkeit, mit der sich die Kühe in dem Laktationsstadium in dem jeweiligen Feld befinden, ist zusätzlich prozentual angegeben

6 Literaturverzeichnis

ADR (1994):

Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter. Richtlinien für das Verfahren der Durchführung der Milchleistungsprüfung.

ADR-Handbuch, Empfehlungen und Richtlinien.

AGUILA, A. & J.H. BROCK (2001):

Lactoferrin: antimicrobial and diagnostic properties.

Biotechnologia Aplicada 18, 76-83

AIGNER, A. & S. NEUMANN (1997):

Immunchemie: Grundlagen-Anwendungen-Perspektiven.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

ALLAR, M.A. & T.L. WOOD (2004):

Expression of the insulin-like growth factor binding proteins during postnatal development of the murine mammary gland.

Endocrinology 145 (5), 2467-2477

ANDERSON, B.F., BAKER, H.M., NORRIS, G.E., RICE, D.W. & E.N. BAKER (1989):

Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution.

Journal of Molecular Biology 209, 711-734.

ARNOLD, R.R., COLE, M.F. & J.R. MCGHEE (1997):

A bactericidal effect for human lactoferrin.

Science 197 (4300), 263-265

BAER, A., OROZ, M. & B. BLANC (1979):

Isolation and partial characterization of ovine lactoferrin.

Experientia 35, 1554-1555

BAGGIOLINI, M., DE DUVE, C., MASSON, P.L. & J.F. HEREMANS (1970):

Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leucocytes.

The Journal of Experimental Medicine 131, 559-570

BARTH, K. (2001):

Evaluation of somatic cell count under automatic milking conditions.

In: Physiological and technical aspects of machine milking, International Conference, Hrsg.: Rosati, A., Mihina, S. & C. Mosconi

Nitra, 26.-27.06.2001, Proc. 165-169.

ICA R Technical Series No 7, Rom, 92-95014-03-0.

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

Insulin like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk.

Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 5 (1), 55-64

BAUMRUCKER C.R. (2000):

Mammary mechanisms for lactoferrin: interactions with IGFBP-3.
Biotechnology, Agronomy Society and Environment 4(1), 5-12

BAUMRUCKER C.R., CAMPANA, W.M., GIBSON, C.A. & D.E. KERR (1993):
Insulin like growth-factors (IGFs) and IGF binding proteins in milk: Sources and functions.

Endocrine Regulation 27, 157-172.

BAUMRUCKER, C.R., GIBSON, C.A. & F.L. SCHANBACHER (2003):

Bovine lactoferrin binds to insulin-like growth factor binding protein-3.
Domestic Animal Endocrinology 24, 287-303

BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT (2005):

Dodenhoff, J., Institut für Tierzucht
Zuchtwertschätzung für Zellzahl und Melkbarkeit.
[http:// www.lfl.bayern/itz/rind/](http://www.lfl.bayern/itz/rind/)

BEZAULT, J., BHIMANI, R., WIPROVNICK, J. & P. FURMANSKI (1994):

Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice.

Cancer Research 54 (9), 2310-2312

BEZWODA, W.R. & N. MANNSOOR (1986):

Isolation and characterization of lactoferrin separated from human whey by adsorption chromatography using Cibacron Blue F3G-A linked affinity adsorbent.
Clinica Chimica Acta 157, 9-94

BLÄCKBERG, L. & O. HERNELL (1980):

Isolation of Lactoferrin from human whey by a single chromatographic step.

FEBS Letters 109, 108-183

BLAST 2 SEQUENZ

Results Version BLAST 2.2.6 (04-09-2003)

[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)

BLUM, J.W. & C.R. BAUMRUCKER (2002):

Colostrum and milk insulin-like growth factors and related substances: Mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets.

Domestic Animal Endocrinology 23, 101-110

BOURNER M.J., BUSBY jr., W.H., SIEGEL, N.R., KRIVI, G.G., McCUSKER, R.H. & D.R. CLEMMONS (1992):

Cloning and sequence determination of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): comparison of its structural and functional properties with IGFBP-1.

Journal of Cellular Biochemistry 48 (2), 215-226

BREIER, B.H., MILSOM, S.R., BLUM, W.F., SCHWANDER, J., GALLAHER, B.W. & P.D. GLUCKMANN (1993):

Insulin-like growth factors and their binding proteins in plasma and milk after growth hormone-stimulated galactopoiesis in normally lactating women.

Acta Endocrinologica 129 (5), 427-435

BROCK, J.H. (1995):

Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein?

Immunology Today 16, 417-419

BROCK, J.H. (2002):

The physiology of lactoferrin.

Journal of Biochemistry and Cell Biology 80, 1-6

BUCHTA, R. (1991):

Ovine lactoferrin: isolation from colostrum and characterization.

Journal of Dairy Research. 58, 211-218

BÜHL A. & ZÖFEL P (2000):

SPSSVersion 10; Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows.

Addison Wesley Verlag, München/Deutschland

BURVENICH,C., PAAPE, M.J., HOEBEN, D. DOSOGNE, H., MASSART-LEEN, A.M. & J. BLUM (1999):

Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone.

Domestic Animal Endocrinology 17, 149-159

CAMPBELL, P.G. & C.R. BAUMRUCKER (1986):

Changes in (¹²⁵I) insulin binding to bovine mammary gland microsomes during pregnancy and lactation.

Journal of Dairy Science 69 (1), 167 (Abstract)

CAMPBELL, P.G., SKAAR, T.C., VEGA, J.R. & C.R. BAUMRUCKER (1991):

Secretion of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins from bovine mammary tissue in vitro.

Journal of Endocrinology 128, 219-228

CAMPBELL, T., SKILTON, R.A., COOMBES, R.C., SHOUSHA, S., GRAHAM, M.D. & Y.A. LUQMANI (1992) :

Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer.

The British Journal of Cancer 65; 19-26

CAPUCO, A.V. & R.M. AKERS (1999):

Mammary involution in dairy animals.

Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 4,137-144

CARLSSON, A., BJÖRCK, L. & K. PERRSON (1989):

Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P.

Journal of Dairy Science 72, 3166-3175

- CHEN, P.W., CHEN, W.C. & F.C. MAO (2004):
Increase of lactoferrin concentration in mastitic goat milk.
Journal of Veterinary Medical Science 66 (4), 345-350
- COHICK, W.S. & J.D. TURNER(1998):
Regulation of IGF binding protein synthesis by a bovine mammary epithelial cell line.
Journal of Endocrinology 157, 327-336
- CONTRERAS, A., PAAPE, M.J., CARLO, A.L., MILLER, R.H. & P. REINARD (1997)
Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats.
Journal of Dairy Science 80, 1113-1118
- DAVID J.W., STEWART, K.N. & P.M. SEARS (1994):
Effects of stage of lactation, production, parity and season on somatic cell counts in
infected and uninfected dairy goats.
Small Ruminant Research 16 (2), 165-169
- DELHANTY, P.J. & V.K. HAN (1992):
The characterization and expression of ovine insulin-like growth factor-binding
protein-2.
Journal of Molecular Endocrinology 9 (1), 31-38
- DIAMANDI, A., MISTRY, J., KRISHNA, R.G. & J. KHOSRAVI (2000):
Immunoassay of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3): New means
to quantifying IGFBP-3 proteolysis.
Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 85 (6), 2327-2333
- DLG (1986):
Grundfutteraufnahme and Grundfutterverdrängung bei Milchkühen.
DLG-Information 2/1986, DLG-Verlag, Frankfurt (Main)
- DLG (1997):
DLG-Futterwerttabellen Wiederkäuer.
7. erweiterte und überarbeitete Auflage. DLG-Verlag, Frankfurt (Main)
- DLG (1998):
Die bedarfsgerechte Proteinversorgung der Milchkuh – Nutzbares Rohprotein (nXP)
und ruminale Stickstoffbilanz (RNB) in der praktischen Fütterung.
DLG-Information 1/1998, DLG-Verlag, Frankfurt (Main)
- DONOVAN, S.M., HINTZ, R.L. & R.G. ROSENFELD (1991a):
Insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human milk: effect of
heat treatment on IGF and IGF binding protein stability.
Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 13, 242-253
- DONOVAN, S.M., HINTZ, R.L., WILSON, D.M. & R.G. ROSENFELD (1991b):
Insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in rat milk.
Pediatric Research 29, 50-55

- DONOVAN, S.M., HINTZ, R.L. & R.G. ROSENFELD (1995) :
Investigation into the potential physiological sources of rat milk IGF-I and IGF-binding proteins.
Journal of Endocrinology 145, 569-578
- DONOVAN, S.M., McNEAL, L.K., JIMÉNEZ-FLORES, R. & J. ODLE (1994):
Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in porcine serum and milk throughout lactation.
Pediatric Research 36 (2), 159-168
- DROKE, E.A., PAAPE, M.J. & A.L. DI CARLO (1993):
Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk.
Journal of Dairy Science 76 (4), 1035-1039
- DULIN, A.M., PAAPE, M.J. SCHULTZE, W.D. & B.T. WEINLAND (1983):
Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk.
Journal of Dairy Science 66, 2426
- DVG (1994):
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Sachverständigenausschuss
Subklinische Mastitis, Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem, 3. Auflage, Gießen
- ELLISON, R. T., GIEHL, T. J. & F. M. LAFORCE (1988)
Damage of the outer membrane of enteric gram – negative bacteria by lactoferrin and transferrin.
Infection and Immunity 56, 2774 – 2781
- ELMLINGER, M.W., GRUND, R., BUCK, M., WOLLMANN, H.A., FEIST, N., WEBER, M.M., SPEER, C.P. & M.B. RANKE (1999):
Limited proteolysis of the IGF binding protein-2 (IGFBP-2) by a specific serine protease activity in early breast milk.
Pediatric Research 46 (1), 76-81
- ERIKSSON, U., DUC, G., FROESCH, E.R. & J. ZAPF (1993):
Insulin-like growth factors (IGF) I and II and IGF binding proteins (IGFBPs) in human colostrum/transitory milk during the first week postpartum: comparison with neonatal and maternal serum.
Biochemical and Biophysical Research Communications 169 (1), 267-273
- FANG, W., ALMEIDA, R.A. & S.P. OLIVER (2000):
Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells.
American Journal of Veterinary Research 61, 275-279.
- GASPARDY, A.; SCHWARTZ, Z.; ZOLDAG, L.; VERESEGYHAZY, T. & S. FEKETE (2004):
Changes in daily energy amounts of main milk components (lactose, protein, fat) during the lactation of high-yielding dairy cows.
Acta Veterinaria Hungarica 52 (4); 457-467

GfE (Ausschuß für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere) (1991):

Leitlinien für die Bestimmung der Verdaulichkeit von Roh Nährstoffen an Wiederkäuern.

Journal Animal Physiology and Animal Nutrition 65, 229-234

GfE (Ausschuß für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere) (1995):

Zur Energiebewertung beim Wiederkäuer. Berichte der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie.

Band 4, DLG-Verlag, Frankfurt (Main)

GfE (Ausschuß für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere) (1996):

Formeln zur Schätzung des Gehaltes an Umsetzbarer Energie und Nettoenergie-Laktation in Mischfuttern. Berichte der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie.

Band 5, DLG-Verlag, Frankfurt (Main)

GIBSON C.A., STALEY M.D. & C.R. BAUMRUCKER (1999):

Identification of IGF binding proteins in bovine milk and the demonstration of IGFBP-3 synthesis and release by bovine mammary epithelial cells.

Journal of Animal Science 77, 1547-1557

GRABOWSKI N.T. (2000):

Körpergewichtsentwicklung, Milchhaltsstoffe und Milchmengenleistung als Kriterien zur laktationsbegleitenden Beurteilung des Gesundheitszustandes hochleistender DSB-Kühe in Laufstallhaltung.

Tierärztlichen Hochschule Hannover, Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch, Dissertation

GUTJAHR, S., J. SCHULZ und K. BECK (1997):

Zur Beeinflussung des Harnstoffgehaltes in Rindermilchproben durch den Gesundheitszustand des Euters.

Praktischer Tierarzt 78, 573 – 580

HADSELL, D.L., CAMPBELL P.G. & C.R. BAUMRUCKER (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

HAGIWARA, S.I., KAWAI, K., ANRI, A. & H. NAGAHATA (2003):

Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows.

Journal of Veterinary Medical Science 65 (3), 319-323

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

Somatic cells and electrical conductivity in relation to milking frequency.

Milchwissenschaft 55 (6), 303-307

HARMON R.J. & F.H.S. NEWBOULD (1980):

Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk.

American Journal of Veterinary Research 41 (10), 1603-1606

- HARMON, R. J., SCHANBACHER, F. L., FERGUSON, L. C. & K. L. SMITH (1975):
Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis.
American Journal of Veterinary Research 36 (7), 1001–1007
- HENNIES, M. & H. SAUERWEIN (2003):
Purification of bovine IGFBP-3 and the development of an enzyme immunoassay for the protein.
Journal of Immunological Methods 28, 9-15
- HUTH, F.W. (1995):
Die Laktation des Rindes: Analyse, Einfluß, Korrektur.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart/D
- IYER, S. & B. LÖNNERDAL (1993):
Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism.
European Journal of clinical Nutrition 47, 232-241
- JANNIE, C.S., SWARTS, P.J., BAKER, E.N. & H.M. BAKER (2000):
Spectroscopic studies on metal complexes of *Aspergillus awamori*-derived recombinant human lactoferrin.
Inorganica Chimica Acta 298, 187-194
- JONES, J.I. & D.R. CLEMMONS (1995):
Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions.
Endocrine Reviews 16 (1), 3-34
- JUAREZ, M. & M. RAMOS (1986):
Physico-chemical characterization of goat milk as distinct from those of cow's milk.
International Dairy Federation/Bulletin 202, 54
- KAWAI, K., HAGIWARA, S., ANRI, A. & H. NAGAHATA (1999):
Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis.
Veterinary Research Communications 23, 391-398
- KAWAKAMI, H., SHINMOTO, H., DOSAKO, S.I. & Y. SOGO (1987):
One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies.
Journal of Dairy Science. 70, 752-759
- KIJLSTRA, A., KUIZENGA, A. VAN DER VELDE, M. & N.J. HAERINGEN (1989):
Gel electrophoresis of human tears reveals various forms of tear lactoferrin.
Current Eye Research 8, 581-588
- KIRCHGESSNER, M. (1997):
Tierernährung, Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis.
DLG Verlag Frankfurt
- KLEMP, M.B., BREIER, B.H., MIN, S.H., MacKENZIE, D.D.S., McCUTCHEON, S.N. & P.D. GLUCKMANN (1993):
IGFBP-2 expression in liver and mammary tissue in lactating and pregnant ewes.
Acta Endocrinologica 129, 453-457

KÖHLER, S.D. (2002):

Nutzung von Prozessparametern automatischer Melksysteme für die Verwendung von Eutererkrankungen unter Verwendung der Fuzzy Logic.
Berlin, Humboldt-Universität, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Dissertation

KUTILA T. (2004):

Role of lactoferrin in treatment of bovine mastitis.
University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Dissertation

LAEMMLI, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 682-685

LE PROVOST, F., NOCART, M., GUERIN, G. & P. MARTIN (1994):

Characterization of the goat lactoferrin cDNA: assignment of the relevant locus to bovine U12 synteny group.
Biochemical and Biophysical Research Communications 203 (2), 1324-1332

LEVAY, P.F. & M. VILJOEN (1995):

Lactoferrin: a general review.
Haematologica 80, 252-267

LINZELL J.L. & M. PEAKER (1974):

Changes in colostrum composition and permeability of the mammary gland epithelium at about the time of parturition in the goat.
Journal of Physiology 243, 129-151.

LKV RHEINLAND (2001)

Milchleistungsprüfung, Harnstoffbericht; LZ Haus Riswick, Kleve; 15.01.2001

LÖNNERDAL, B. & S. IYER (1995):

Lactoferrin: molecular structure and biological function.
Annual Review of Nutrition. 15, 93-110.

LOTTHAMMER, K.H. & G. WITTKOWSKI (1994):

Fruchtbarkeit und Gesundheit der Rinder.
Ulmer-Verlag, Stuttgart

MANTEL, C., MIYAZAWA, K. & H.E. BROXMEYER (1994):

Physical characteristics and polymerization during iron saturation of lactoferrin, a myelopoietic regulatory molecule with suppressor activity.

In: Lactoferrin: Structure and Function.

Hrsg.: T.W. Hutchens et al., Plenum Press, New York, 121-132

MASSON, P. L., HEREMANS, J. F. & C. DIVE (1966):

An iron – binding protein common to many external secretions.
Clinica Chimica Acta 14, 735 – 739

MASSON, P.L. & J.F. HEREMANS (1971):

Lactoferrin in milk from different species.

Comperative Biochemistry and Physiology B Vol. 39B, 119-129

- McGUIRE, M.A., BAUMANN, D.E., DWYER, D.A. & W.S. COHICK (1995):
Nutritional modulation of the somatotropin/insulin-like growth factor system: response to feed deprivation in lactating cows.
Journal of Nutrition 125 (3), 493-502
- MEAD, P.E. & J.W. TWEEDIE (1990):
cDNA and protein sequence of bovine Lactoferrin.
Nucleic Acids Research 18 (23), 7167
- MEISEL, H. (1990):
Enzyme-immunoassay (ELISA) using IgY antibodies against lactoferrin.
Milchwissenschaft 45 (8), 510 – 512
- METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., MAZURIER, J., SCHOENTGEN, F.,
LEGRAND, D., SPIK, G., MONTREUIL, J. & P. JOLLES (1984):
Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins.
European Journal of Biochemistry 145 (3), 659-676
- MEYER, F. & SENFT, B. (1979)
Untersuchungen über Konzentrationsveränderungen der Molkenproteine Lactoferrin, Blut-Serum-Albumin und Lysozym im Verlauf des Milchentzuges.
Milchwissenschaft 34 (2), 74 – 77
- MILCHWIRTSCHAFTLICHER KONTROLL- UND UNTERSUCHUNGSVERBAND
UELZEN e. V. (2001):
Infrarotspektroskopische Analyse von freien Fettsäuren in der Milch.
Jörg Buermeyer
[http:// www.mku-uelzen.de/](http://www.mku-uelzen.de/)
- MILLER, R.H., PAAPE, M.J. & L.A. FULTON (1991):
Variation in milk somatic cell counts of heifers at first calving.
Journal of Dairy Science 76, 2812
- MOLENAAR A.J., KUYS, Y.M., DAVIS; S.R., WILKINS, R.J., MEAD, P.E. & J.W.
TWEEDIE (1996):
Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland.
Journal of Dairy Science 79, 1198-1208
- MOORE, S.A., ANDERSON, B.F., GROOM, C.R., HARIDAS, M. & E.N. BAKER
(1997):
Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution.
Journal of Molecular Biology 274, 222-236.
- NAM, M.S., SHIMAZAKI, K., KUMURA, H.; LEE, K.K. & D.Y. YU (1999):
Characterization of korean native goat lactoferrin.
Comparative Biochemistry and Physiology B 123, 201-208

- NUIJENS, J.H., VAN BERKEL, P.H.C. & F. SCHANBACHER (1996):
Structure and biological actions of lactoferrin.
Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 1, 285-295
- OH, Y., NAGALLA, S.R., YAMANAKA, Y., KIM, H.S., WILSON, E. & R.G. ROSENFELD (1996):
Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II.
Journal of Biological Chemistry 271 (48), 30322-30325
- ONSOUKA, C.E.; BRUCKMAIER, R.M. & J.W. BLUM (2003):
Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk.
Journal of Dairy Science 86, 2005-2011
- PLATH-GABLER, A., GABLER, C., SINOWATZ, F., BERISHA, B. & D. SCHAMS (2001):
The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland.
Journal of Endocrinology 168, 39-48
- POSSER, C.G. & J. SCHWANDER (1996):
Influence of insulin-like factor binding protein-2 on plasma clearance and transfer of insulin-like growth factor -I and -II from plasma into mammary-derived lymph and milk of goats.
Journal of Endocrinology 150, 121-127
- PUENTE, R.; GARCIA-PARDO, L.A.; RUEDA, R. GIL, A. & P. HUESO (1994):
Changes in ganglioside and sialic acid contents of goat milk during lactation.
Journal of Dairy Science 77; 39-44
- PUVOGEL, G., BAUMRUCKER, C.R., SAUERWEIN, H., RÜHL, R., ONTSOUKA, E., HAMMON, H.M. & J.W. BLUM (2005):
Effects of an enhanced vitamin A intake during the dry period on retinoids, lactoferrin, IGF system, mammary gland epithelial cell apoptosis, and subsequent lactation in dairy cows.
Journal of Dairy Science 88, 1785-1800
- QUERINJEAN, P., MASSON, P.L. & J.F. HEREMANS (1971):
Molecular weight, single chain structure and amino acid composition of human lactoferrin.
European Journal of Clinical Nutrition 20. 420-425:
- RAINARD, P. (1986):
Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria.
Veterinary Microbiology. 11, 387-392.
- RAJARAM, S., BAYLINK, D.J. & S. MOHAN (1997):
Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions.
Endocrine Reviews 18 (6), 801-831

- REJMAN, J. J., HURLEY, W. L. & J. M. BAHR (1989):
Enzyme-linked immunosorbent assays of bovine lactoferrin and a 39-kilodalton protein found in mammary secretions during involution.
Journal of Dairy Science 72, 555 – 560
- ROSENFELD, R.G., PHAM, H., OH, Y. & I. OCRANT (1989):
Characterization of insulin-like growth factor binding proteins in cultured rat pituitary cells.
Endocrinology 124, 2867-2874
- SANCHEZ, L., ARANDA, P., PEREZ, D. & M. CALVO (1988):
Concentration of lactoferrin and transferring throughout lactation in cow's colostrum and milk.
Biological Chemistry Hoppe-Seyler 369, 1005 – 1008
- SCHANBACHER, F.L., GOODMAN, R.E. & R.S. TALHOUK (1993):
Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins.
Journal of Dairy Science 76, 3812-3831
- SCHMITZ, S. PFAFFL, M.W., MILLER, M, BUCHBERGER, J., MEYER, T., SAUERWEIN, H. & R.M. BRUCKMAIER (2004a):
mRNA expression of immune factors and milk proteins in mammary tissue and milk cells and their concentration in milk during subclinical mastitis.
Milchwissenschaft 59 (7/8), 351-355
- SCHMITZ, S. PFAFFL, M.W., MEYER, H.H. & R.M. BRUCKMAIER (2004b):
Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis.
Domestic Animal Endocrinology 26 (2), 111-126
- SCHOLZ, A., NEUHAUS, U., NÜSKE, S., KRAGENINGS, G. & M. FÖRSTER (2001):
Milchqualität bei Kühen der Rassen Deutsche Holsteins und Deutsches Fleckvieh im Vergleich von konventioneller und Roboter-Melktechnik.
Züchtungskunde 73, 23-32.
- SCHULZ, J., HANISCH, T., DUMKE, S., SPRINGER S. & K. BECK (1998):
Abfall der Laktosekonzentration in der Kuhmilch als Ausdruck erhöhter Permeabilität der Schranken zwischen Hohlraumssystem des Euters und Blut.
Praktischer Tierarzt 79, 657 – 665
- SCHUSTER D.E., KEHRLI, M.E, JR. & C.R. BAUMRUCKER (1995):
Relationship of inflammatory cytokines, growth hormone, and insulin-like growth factor-1 to reduced performance during infectious disease.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 210, 140-149.
- SEJRSEN, K., PEDERSEN, L.O., VESTERGAARD, M. & S. PURUP (2001):
Biological activity of bovine milk. Contribution of IGF-I and IGF binding proteins.
Livestock Production Science 70, 79-85

SENF B. & F. KLOBASA (1973):

Untersuchungen über die Konzentration an Lactoferrin in Kolostralmilch und reifer Milch von Kühen.

Milchwissenschaft 28 (12), 750-752

SHARMA, B.K.; VANDEHAAR, M.J. & N.K. AMES (1994):

Expression of insulin-like growth factor-1 in cows at different stages of lactation and in late lactation cows treated with somatotropin.

Journal of Dairy Science 77, 2232-2241

SHIMAZAKI, K.I., KAWANO, N. & Y.C. YOO (1991):

Comparison of bovine, sheep and goat milk lactoferrins in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity.

Comparative Biochemistry and Physiology 98B (2/3), 417-422

SKAAR T.C., VEGA, J.R., PYKE, S.N. & C.R. BAUMRUCKER (1991):

Changes in insulin-like growth factors-binding proteins in bovine mammary secretions associated with pregnancy and parturition.

Journal of Endocrinology 131, 127-133

SOERENSEN, M. & S.P.L. SOERENSEN (1939):

The protein in whey.

Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg 23, 55-99

SORRENTINO, S., D'ALESSANDRO, A.M., MARAS, B., DI CICCIO, L., D'ANDREA, G., DE PRISCO, R., BOSSA, F., LIBONATI, M. & A. ORATORE (1999):

Purification of a 76-kDa iron-binding protein from human seminal plasma by affinity chromatography specific for ribonuclease: structural and functional identity with milk lactoferrin.

Biochimica et Biophysica Acta. 1430 (1), 103-110

SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., VAN HALBEEK, H. & J.F. Vliegenthart (1982):

Primary structure of the glycans from human lactotransferrin.

European Journal of Biochemistry. 121, 413-419

STAATLICHES UNTERSUCHUNGSAMT HESSEN (2002):

Wolter W.; Kloppert, B.; Casteana, H.C. & M. Zschöck

Die Mastitis des Rindes

[http:// bibd.uni-giessen.de/gdoc/2002/uni/p020001o.htm](http://bibd.uni-giessen.de/gdoc/2002/uni/p020001o.htm)

SURIYASATHAPRON W., SCHUKKEN, Y.H., NIELEN, M. & A. BRAND (2000):

Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in dairy herd.

Journal of Dairy Science 83, 1248-1255

VEGA, J.R.; GIBSON, C.A.; SKAAR, T.C.; HADSELL, D.L. & C.R. BAUMRUCKER (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.

Journal of Animal Science 69, 2538-2547

- VICINI, J.L. BUONOMO, F.C., VEENHUIZEN, J.J., MILLER, M.A., CLEMMONS, D.R. & R.J. COLLIER (1991):
Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows.
Journal of Nutrition 121 (10), 1656-1664
- VORLAND L.H. (1999):
Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein.
APMIS 107 (11), 971-981
- VORLAND, L.H., ULVATNE, H., ANDERSEN, J., HAUKLAND, H., REKDAL, O., SVENDSEN, J.S. & T.J. GUTTEBERG (1998):
Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin.
Scandinavian Journal of Infectious Diseases 30 (5), 513-517
- WANG, H. & W.L.HURLEY (1998):
Identification of lactoferrin Complexes in bovine mammary secretions during mammary gland involution.
Journal of Dairy Science 81, 1896-1903
- WARD, P.P., MENDOZA-MENESES, M., MULAC-JERICEVIC, B., CUNNINGHAM, G.A., SAUCEDO-CARDENAS, O., TENG, C.T. & O.M. CONNEELY (1999):
Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryonic development.
Endocrinology 140 (4), 1852-1860
- WEBER, M.S., PURUP, S. VESTERGAARD, M., AKERS, R.M. & K. SEJRSEN (2000):
Regulation of local synthesis of insulin-like-growth factor-1 and binding proteins in mammary tissue.
Journal of Dairy Science 83 (1), 30-37
- WEIHUAN, F. & S.P. OLIVER (1999):
Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*.
FEMS Microbiology Letters 176, 91-96
- WEINZIMMER, S.A., GIBSON, T.B., COLLETT-SOLBERG, P.F., KHARE, A., LIU, B. & P. COHEN (2001):
Transferrin is an insulin-like growth factor binding protein-3 binding protein.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86 (4), 1806-1813
- WENDT, K., BOSTEDT, H., MIELKE, H. & H. W. FUCHS (1994):
Euter- und Gesäugekrankheiten
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

WILSON, E.M, OH, Y. & R.G. ROSENFELD (1997):
Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: identification of 31kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 82 (4), 1301-1303.

WILSON, E.M., OH, Y. & V. HAWA (1999):
Cloning and characterization of the IGFBP-4P1 interacting protein.
Endocrine Soc. 81st Meeting, Abstract

WIRTZ, N. (2003):
Vergleich zwischen automatischem und konventionellem Melken im Hinblick auf Milchleistung und Futteraufwand.
Institut für Tierzuchtwissenschaft, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn,
Dissertation

YE, X. & S. YOSHIDA (1995)
Lactoperoxidase and lactoferrin: changes in post partum milk during bovine lactational disorders.
Milchwissenschaft 50 (2), 67 – 71

YOO, Y.C., WATANABE, S., WATANABE, R., HATA, K., SHIMAZAKI, K. & I. AZUMA (1998):
Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice.
In: Advances in Lactoferrin Research, Hrsg.: Spik et al.
Plenum Press New York, 285-291

ZENG S.S.& E.N. ESCOBAR (1994):
Effect of parity and milk production on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk.
Small Ruminant Research 17 (3), 269-274

ZÖFEL, P. (2001):
Statistik verstehen. Ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung.
Addison –Wesley Verlag

7 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Prozentuale Wiederfindung von zugefügtem Lactoferrin in Proben bekannten Lactoferringehaltes
- Tabelle 2:** Prozentuale Wiederfindung von zugefügtem rIGFBP-2 in Proben bekannten IGFBP-2-Gehaltes
- Tabelle 3:** Ergebnisse des Testes auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov aller untersuchten Ziegenmilchproben der Laktation 2001 und unterteilt nach den vier Laktationsstadien, sowie Anzahl der untersuchten Ziegenmilchproben
- Tabelle 4:** Ergebnisse des Testes auf Normalverteilung der einzelnen Trächtigkeitsgruppen nach Kolmogorov-Smirnov und Anzahl der untersuchten Ziegenmilchproben (n)
- Tabelle 5:** Milchinhaltstoffe und Anzahl der untersuchten Milchproben (n) in den vier verschiedenen Laktationsstadien der Kuh
- Tabelle 6:** Lactoferrinkonzentrationen und Anzahl der untersuchten Milchproben in den vier Laktationsstadien der Kuh
- Tabelle 7:** IGFBP-2-Konzentrationen und Anzahl der untersuchten Milchproben in den vier Laktationsstadien der Kuh
- Tabelle 8:** Milchinhaltstoffe und Milchleistung in den vier Laktationsstadien der Ziege
- Tabelle 9:** Die gemessenen Parameter und Anzahl der untersuchten Milchproben über die einzelnen Laktationswochen in der Kuhmilch
- Tabelle 10:** Jahreszeitlicher Verlauf der gemessenen Parameter und Anzahl der untersuchten Milchproben in der Kuhmilch
- Tabelle 11:** Die gemessenen Parameter und Anzahl der untersuchten Milchproben über die einzelnen Laktationswochen in der Ziegenmilch
- Tabelle 12:** Lactoferrinkonzentrationen in der Ziegenmilch der einzelnen Tiere über die Laktation mit zugeordneter Laktationsnummer

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Das System der insulinartigen Wachstumsfaktoren (IGF-System) und das Vorkommen der einzelnen Komponenten in der bovinen Milchdrüse
- Abbildung 2:** Konzentrationen von IGFBP-2 und -3 in Milch von Kühen in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstatus. Kühe, die erfolgreich besamt wurden
- Abbildung 3:** Vermutete Funktionen des Lactoferrins
- Abbildung 4:** Elutionsprofil des Kationenaustausches zur Reinigung von caprinem Lactoferrin aus Ziegenkolostrum
- Abbildung 5:** Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie zur Aufreinigung der vereinigten lactoferrinhaltigen Fraktionen aus dem Kationenaustausch
- Abbildung 6:** Ausgewählte Fraktionen der Reinigung caprinen Lactoferrins aus Kolostrum im SDS-PAGE mit Coomassiebrilliantblau-Färbung
- Abbildung 7:** Lactoferrin, gereinigt aus Ziegen- und Schafkolostrum bzw. gekauftes Rinder-Lactoferrin (Sigma) im SDS-PAGE mit Coomassiebrilliantblau-Färbung.
- Abbildung 8:** Schema des Testprinzipes zur Bestimmung des Antikörpertiters
- Abbildung 9:** Titerentwicklung im Serum der mit caprinem (A) bzw. bovinem Lactoferrin (B) immunisierten Kaninchen, sowie die Extinktion eines nicht-immunisierten Kaninchens (Δ) als Kontrolle.
- Abbildung 10:** Anordnung des Transfer-Sandwichs beim Wet-Blot-Verfahren des Western-Blots
- Abbildung 11:** Western Blot mit den aus Kaninchen gewonnenen spezifischen Antiseren gegen A: caprines Lactoferrin (Kaninchen 46); B: bovines Lactoferrin (Kaninchen 38).
- Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Struktur des Lactoferrins
- Abbildung 13:** Testprinzip des kompetitiven ELISAs zur Lactoferrinbestimmung
- Abbildung 14:** Standardkurve des bovines Lactoferrins (A) und Verdünnungsreihen aus Rindermilch (B) zur Darstellung der Parallelität
- Abbildung 15:** Standardkurve des caprinen Lactoferrins (A) und Verdünnungsreihen aus Ziegenmilch (B) zur Darstellung der Parallelität
- Abbildung 16:** Lactoferrinbestimmung in 34 Rinder-Vollmilch- und entfetteten Rindermilchproben

- Abbildung 17:** Titerentwicklung im Serum des mit rbIGFBP-2 immunisierten Kaninchens
- Abbildung 18:** Western Blot zur Detektion der IGFBP-2-Banden in Ziegenserum, und -milch sowie in Rinderserum.
- Abbildung 19:** Standardkurve aus rekombinanten bovinen IGFBP-2 (A) und Verdünnungsreihen aus Rindermilch (B) und Ziegenmilch (C) zur Darstellung der Parallelität
- Abbildung 20:** IGFBP-2-Bestimmung in 27 Rinder-Vollmilch- und entfetteten Rindermilch-Proben
- Abbildung 21:** Milchprobenentnahme der einzelnen Gruppen
- Abbildung 22:** Anordnung der 9-Felder-Tafel zur Einstufung des Ernährungsstatus von Milchkühen in Anlehnung an den LKV Rheinland
- Abbildung 23:** Verlauf der Lactoferrinkonzentration in Kuhmilch über eine Laktation.
- Abbildung 24:** Lactoferrinkonzentrationen vor und nach erfolgreicher Besamung.
- Abbildung 25:** Entwicklung der Lactoferrinkonzentration in Bezug zur Zellzahl, dargestellt über die Zellzahlklassen 1 bis 9.
- Abbildung 26:** Verlauf der IGFBP-2-Konzentration in Kuhmilch über eine Laktation.
- Abbildung 27:** Darstellung der IGFBP-2-Gehalte in der Milch von Kühen in den einzelnen Laktationsstadien, eingeteilt in verschiedene Fütterungssituationen nach der 9-Felder-Tafel.
- Abbildung 28:** IGFBP-2-Konzentrationen vor und nach erfolgreicher Besamung.
- Abbildung 29:** Entwicklung der IGFBP-2-Konzentration in Bezug zur Zellzahl, dargestellt über die Zellzahlklassen 1 bis 9.
- Abbildung 30:** Verhalten von Zellzahl, Lactoferrin und IGFBP-2 im Verlauf einer Mastitis, dargestellt an Hand von zwei Kühen:
- Abbildung 31:** Verhalten von Lactose, Fett und Protein im Verlauf einer Mastitis, dargestellt an Hand von zwei Kühen:
- Abbildung 32:** Verhalten von Harnstoff im Verlauf einer Mastitis, dargestellt an Hand von zwei Kühen:
- Abbildung 33:** Zellzahlklassen in den verschiedenen Melk- bzw. Versuchsgruppe über den Versuchszeitraum (Januar bis September 2001).
- Abbildung 34:** Verlauf von Protein, Fett und Zellzahl in Ziegenmilch sowie der täglichen Milchleistung in der Laktation 2001, dargestellt mit den Gleichungen der entsprechenden Regressionskurven
- Abbildung 35:** Verlauf der Lactoferrinkonzentration in Ziegenmilch während der Laktation. Daten aus der Erhebung zur Laktation 2001.

- Abbildung 36:** Lactoferrinkonzentrationen in Ziegenmilch in den Wochen vor (-10 bis -1) und nach (0 bis 10) der Konzeption bzw. bei nicht tragend gewordenen Tieren den entsprechenden Laktationsfenstern wie normal tragende Tiere (17. - 27. LW und 28. - 37. LW).
- Abbildung 37:** Darstellung des Lactoferrin-Gehaltes in der Milch von Ziegen in den Laktationswochen 16 bis 39 der drei verschiedenen Trächtigkeitsgruppen: normal tragend (27. - 32. LW) gewordene Tiere, spät in der Laktation (> 35. LW) tragend gewordene und nicht tragend gewordene Tiere.
- Abbildung 38:** Verlauf der IGFBP-2-Konzentration in Ziegenmilch während der Laktation. Daten aus der Erhebung zur Laktation 2001.
- Abbildung 39:** IGFBP-2-Konzentrationen in Ziegenmilch in den Wochen vor (-10 bis -1) und nach (0 bis 10) der Konzeption bzw. bei nicht tragend gewordenen Tieren den entsprechenden Laktationsfenstern wie normal tragende Tiere (17. - 27. LW und 28. - 37. LW).
- Abbildung 40:** Darstellung des IGFBP-2-Gehaltes in der Milch von Ziegen in den Laktationswochen 16 bis 39 der drei verschiedenen Trächtigkeitsgruppen: normal tragend (27. - 32. LW) gewordene Tiere, spät in der Laktation (> 35. LW) tragend gewordene und nicht tragend gewordene Tiere.
- Abbildung 41:** Verhalten von Lactoferrin-, IGFBP-2-, Protein- und Fett-Gehalt der Milch sowie der täglichen Milchleistung bei einer an Mastitis erkrankten Ziege, dargestellt über eine Laktation.
- Abbildung 42:** IGFBP-2-Konzentrationen in den verschiedenen Laktationsstadien und ihre Zuordnung in die 9-Felder-Tafel.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein ganz herzlich für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Tierwissenschaften, Abteilung Physiologie, und Hygiene danken. Ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion und dass mir von ihr entgegengebrachte Vertrauen haben mir immer wieder Anregung und Mut gegeben.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Schellander für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Mark Hennies sei für die fachliche und praktische Unterstützung bei der labortechnischen Arbeit gedankt.

Dem gesamten Laborteam des Institutes möchte ich noch mal ganz herzlich für die praktische Unterstützung danken. Besonders sei den damaligen Auszubildenden Margarete, Miriam, Oli und Steffi gedankt, die unermüdlich Proben gemessen haben und Frau Karin Strack, die immer geholfen hat, wo Not am Mann war.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch dem Team des Versuchsgutes Haus Riswick. Die Zusammenarbeit war immer sehr konstruktiv und persönlich.

Gleiches gilt für den LKV Rheinland, der mir bei der Organisation der Kuhmilchproben eine unbezahlbare Hilfe war.

Ebenso möchte ich der Abteilung für Haustiergenetik für die Bereitstellung der Daten und die Möglichkeit, mich in ihren Versuch einzuklinken, danken. Hier besonders Norbert Wirtz für seine Unterstützung ein herzliches „Danke schön“.

Der H. Wilhelm Schaumann-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Meinen ehemaligen Mitdotorandinnen Steffi, Ute, Claudia, Simone und Michelle danke ich für die schöne Doktorandenzeit. Das häufige Lachen und die vielen Diskussionen „unter dem Dach“ haben diese Zeit zu etwas besonderem gemacht!

Ganz besonders möchte ich aber meiner Familie danken, die mich vor allem bei der Fertigstellung der Dissertation immer wieder ermutigt hat und mir die zeitlichen Freiräume geschaffen hat, ohne die ein Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.