

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Nutzung von bovinem Haptoglobin im Rahmen des
Tiergesundheitsmonitorings als Indikator für entzündliche
Erkrankungen bei Milchkühen in der Früh lactation**

Von Sarah Plattner (geb. Unger)

aus Remscheid

München 2024

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld

Korreferent: Prof. Dr. Ivica Medugorac

Tag der Promotion: 06. Juli 2024

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß §6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeiten sind in dieser Dissertationsschrift enthalten:

- Plattner, S., & Mansfeld, R. (2024). Haptoglobin als Indikator für Erkrankungen in der Früh lactation von Milchkühen unter besonderer Berücksichtigung der Eutergesundheit. Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/nutztiere, 52(1), 33-41.
- Plattner, S., Kammer, M., Walleser, E., Plattner, S., Panne, N., Baumgartner, C., Döpfer, D., & Mansfeld, R. (2023). Nutzung der Haptoglobinkonzentration in Milch als Indikator für das Tiergesundheitsmonitoring bei Milchkühen. Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/nutztiere, 51(6), 346-357.

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT – PUBLIKATION I.....	7
III.	MATERIAL UND METHODEN, ERGEBNISSE UND ERGEBNISDISKUSSION – PUBLIKATION II	29
IV.	DISKUSSION.....	53
1.	Zielsetzung und Zusammenfassung der Ergebnisse.....	53
2.	Datenerhebung und Probennahme	53
3.	Haptoglobin in Blut und Milch.....	55
4.	Haptoglobin im Zusammenhang mit Uteruserkrankungen	57
5.	Haptoglobin im Zusammenhang mit Stoffwechselstörungen	58
6.	Haptoglobin im Zusammenhang mit Lahmheit.....	59
7.	Haptoglobin im Zusammenhang mit Mastitis.....	60
V.	SCHLUSSFOLGERUNGEN: MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN FÜR DIE NUTZUNG VON HAPTOGLOBIN ALS INDIKATOR FÜR DAS TIERGESUNDHEITSMONITORING	63
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	65
VII.	SUMMARY	69
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	71
IX.	DANKSAGUNG	83

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APP	Akute-Phase-Protein
AMS	Automatisiertes Melksystem
BHB	β -Hydroxybutyrat
bHP	Haptoglobin im Blut
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
HP	Haptoglobin
IR-Spektren	Infrarot-Spektren
ITB	Integrierte Tierärztliche Bestandsbetreuung
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LCS	Locomotion-Score
LKV	Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung Bayern e.V.
LPS	Lipopolysaccharid
mHP	Haptoglobin in der Milch
MLP	Milchleistungsprüfung
MPR	Milchprüfung Bayern e.V.
NEFA	Nicht veresterte freie Fettsäuren
p.p.	Post partum
SAA	Serum Amyloid A
SARA	Subakute Pansenazidose
SCC	Somatische Zellzahl

Abkürzungsverzeichnis

I. EINLEITUNG

Die Integrierte Tierärztliche Bestandsbetreuung (ITB), auch als „Tierärztliches Controlling“ (MANSFELD et al., 2014) bezeichnet, hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Ziel ist es, durch systematisches Monitoring der Gesundheits- und Leistungsentwicklung einer Herde die bestmögliche Tiergesundheit bei optimaler Leistung gemeinsam mit den landwirtschaftlichen Betrieben zu erreichen (BUNDESVERBAND PRAKTIZIERENDER TIERÄRZTE, 2019). Ein weiteres Ziel der ITB stellt die stetige Optimierung von Haltung und Management im Sinne des Tierwohls dar, das immer mehr im Fokus der tierhaltenden Betriebe, der Verbraucher und vieler Molkereien sowie Interessensverbände steht.

Das systematische Tiergesundheitsmonitoring umfasst Diagnostik, die Etablierung von Impf- und Prophylaxemaßnahmen und die regelmäßige Betriebsanalyse anhand von Kennzahlen, die aussagekräftig für verschiedene Bereiche der Tiergesundheit sind (BUNDESVERBAND PRAKTIZIERENDER TIERÄRZTE, 2019). Regelmäßige Datenerhebung und Dokumentation schaffen die Basis für den Vergleich von Ist- und Soll-Situation, die periodisch mit den Betrieben evaluiert werden sollten.

Eine wichtige Datenquelle für den Bezug von Tiergesundheitskennzahlen stellt die Milchleistungsprüfung (MLP) dar, die 11-mal jährlich auf vielen Betrieben durchgeführt wird. Im Rahmen der MLP werden Milchproben der laktierenden Kühe gezogen und auf Parameter wie Milchinhaltsstoffe, Milchmenge und Zellzahl untersucht. Die Ergebnisse der MLP sichern einerseits die Qualität des Lebensmittels Milch, bieten andererseits aber auch einen Überblick über einige Bereiche der betriebsindividuellen Tiergesundheit. Harnstoff-, Fett- und Eiweißgehalte in der Milch, genau wie die Einstufung des Tieres im in der Auswertung enthaltenen Energiestoffwechsel-Frühwarnsystems, geben unter anderem Auskunft über die Stoffwechsellage und die Energieversorgung der beprobten Tiere (HOEDEMAKER et al., 2014; GLATZ-HOPPE et al., 2020). Die Zellzahl wiederum dient als Indikator für Tiere, die subklinisch oder klinisch an Mastitis erkrankt sind, und erlaubt eine Aussage über die Eutergesundheit auf Bestandsebene (HOEDEMAKER et al., 2014). Die Daten der MLP ermöglichen

eine Einschätzung von Fütterung, Eutergesundheit, Energieversorgung und Stoffwechsel auf Einzeltier- und auf Betriebsebene.

Eine Alternative zur Teilnahme an der MLP bietet die Nutzung automatisierter Melksysteme (AMS) mit Auswertung der Milchhaltsstoffe durch entsprechende Programme der Melktechnikhersteller. Automatisierte Melksysteme in Kombination mit smarter Sensortechnik ergänzen die Parameter der Milchanalyse darüber hinaus um Informationen zu Aktivität, Wiederkaütätigkeit, Melkhäufigkeit oder Milchtemperaturmessung, deren Auswertung das Auffinden tagesaktuell auffälliger Tiere ermöglicht (EDWARDS & TOZER, 2004; KING et al., 2018). Potenziell an Ketose erkrankte Tiere innerhalb der Herde können zum Beispiel durch die Messung eines Aktivitätsrückgangs identifiziert werden (EDWARDS & TOZER, 2004; KING et al., 2018).

Besondere Relevanz hat ein engmaschiges Monitoring bei Tieren in der Frühlaktation, da in diesem kritischen Zeitraum besonders häufig Erkrankungen des Reproduktionstraktes, Euterentzündungen, Klauenerkrankungen und Stoffwechselstörungen aufgrund von negativer Energiebilanz und Immunsuppression nach der Kalbung auftreten. Die frühzeitige Erkennung dieser Erkrankungen ermöglicht eine schnellere Therapie und damit einhergehend eine bessere Tiergesundheit und Produktivität. Bislang zur Verfügung stehende Daten aus MLP, Melk- und Sensortechnik weisen zwar auf potenziell erkrankte Tiere innerhalb einer Herde hin, können aber keine spezifische Früherkennung entzündlicher Veränderungen leisten. Diese Informationslücke könnte durch den Einsatz von bovinem Haptoglobin (HP) im Tiergesundheitsmonitoring geschlossen werden. Vergleichbar mit der Nutzung von C-reaktivem Protein beim Menschen (ABERNETHY & AVERY, 1941; JAIN et al., 2011), wird HP beim Rind bisher als aussagekräftiger labordiagnostischer Indikator für Entzündungszustände beim Einzeltier herangezogen (ECKERSALL & BELL, 2010; CECILIANI et al., 2012).

Bovines Haptoglobin ist als Akute-Phase-Protein Teil einer unspezifischen Immunreaktion. Akute-Phase-Proteine werden in der Humanmedizin schon lange standardmäßig als Indikator für Entzündungsgeschehen genutzt und reagieren auf interne oder externe Stimuli mit einem Konzentrationsanstieg (HORADAGODA et al., 1999; JAIN et al., 2011). Beim Rind gelten Serum Amyloid A und HP als

sogenannte „major acute phase proteins“, deren Konzentrationen in Blut und Milch innerhalb von kurzer Zeit um das 100- bis 1000-fache der physiologischen Ausgangskonzentrationen ansteigen können (ECKERSALL & BELL, 2010; CECILIANI et al., 2012). HP wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, kann aber auch lokal in direkt von Erkrankungen betroffenen Geweben gebildet werden (FRIEDRICHS et al., 1995; YANG et al., 1995; DOBRYSZYCKA, 1997). Es besteht eine Korrelation zwischen HP-Konzentrationen in Blut (bHP) und Milch (mHP) (ECKERSALL et al., 2001; NIELSEN et al., 2004; KOVAC et al., 2007). Im Zusammenhang mit wichtigen Erkrankungen der Frühlaktation kommt es zu signifikanten Erhöhungen der HP-Konzentration (ECKERSALL & BELL, 2010; CECILIANI et al., 2012), was HP zu einem interessanten Parameter für den Gesundheitszustand der frischlaktierenden Kuh macht.

Die Frühlaktation stellt einen besonders kritischen Zeitraum in der Laktationsperiode einer hochleistenden Milchkuh dar. Der Energiebedarf für Erhaltung und zunehmende Milchleistung kann durch die Futteraufnahme nicht gedeckt werden, was in den ersten Laktationswochen fast unvermeidlich zu einem, bei moderater Ausprägung als physiologischen Vorgang angesehenen, Zustand der negativen Energiebilanz führt (BAIRD, 1982; DRACKLEY, 1999). Die negative Energiebilanz induziert die Mobilisierung von Körpermasse (BAIRD, 1982), für deren Ausmaß die Konzentration freier Fettsäuren (nonesterified fatty acids, NEFA) im Blut als aussagekräftiger Parameter gilt (ADEWUYI et al., 2005). Die NEFAs werden im Regelfall durch die Leber zu Acetyl-Coenzym A (für die Gluconeogenese im Citratzyklus) oxidiert, können bei unvollständiger Oxidation aufgrund von limitierter Leberstoffwechselkapazität oder exzessiver NEFA-Freisetzung aber auch in Ketonkörper umgewandelt, und dem Körper als alternative Energiequelle zur Verfügung gestellt werden (BERG et al., 2018). Eine erhöhte Konzentration an Ketonkörpern aufgrund von übermäßiger Produktion belastet den Organismus, reduziert die Futteraufnahme durch Inappetenz, und bedingt das Krankheitsbild der Ketose (STÖBER et al., 2006). Diagnostizierbar ist die subklinische Ketose über die Messung des Ketonkörpers β -Hydroxybutyrat (BHB) im Blut (DUFFIELD, 2000), im Harn oder in der Milch (DUFFIELD & LEBLANC, 2009). Der Übergang zur klinischen Ketose geht mit dem Auftreten klinischer Symptome einher. HP ist positiv mit BHB- und NEFA-Konzentrationen korreliert (EL-DEEB & EL-BAHR, 2017; HAJEK et al., 2020) und demnach bei

Ketose und Fettmobilisierung erhöht. Aber auch zusammenhängend mit dem Fettleber-Syndrom, das durch die intrazelluläre Einlagerung von NEFAs in Lebergewebe entsteht (HOLTENIUS & HOLTENIUS, 1996), wurden bereits erhöhte HP-Konzentrationen nachgewiesen (AMETAJ et al., 2005). Für subklinische Ketose sind in der Literatur Prävalenzen von 8 % bis 47,2 % angegeben (DUFFIELD, 2000; SUTHAR et al., 2013; TATONE et al., 2017). Die Prävalenz für erhöhte postpartale (p.p.) NEFA-Konzentrationen (Laktationstag 1 – 14) liegt mit fast 35 % in einem vergleichbaren Bereich (MCART et al., 2013). Lange wurde davon ausgegangen, dass die erhöhten Konzentrationen an NEFAs und Ketonkörpern im Rahmen von negativer Energiebilanz und Lipolyse eine postpartale Immunsuppression verursachen und aufgrund dessen eine Korrelation zwischen NEFAs und den klassischen Erkrankungen der Frühlaktation, wie zum Beispiel Metritis (OSPINA et al., 2010), besteht. Diese Annahme wurde 2021 von HORST et al. (2021) infrage gestellt, die ihrerseits davon ausgehen, dass bereits vor der Transitphase durch inflammatorische Zustände und Immunaktivierung eine Hypophagie induziert wird, die dann erst sekundär zum Anstieg von NEFAs und Ketonkörpern im Blut führt. Beide Theorien erklären die Zusammenhänge zwischen negativer Energiebilanz mit teils erhöhten NEFA- oder BHB-Konzentrationen und relevanten Produktionserkrankungen der Milchviehhaltung (COLLARD et al., 2000; DUFFIELD et al., 2009; OSPINA et al., 2010; SORDILLO & RAPHAEL, 2013). Die Parameter BHB und NEFA sind außerdem mit HP korreliert (EL-DEEB & EL-BAHR, 2017; HAJEK et al., 2020), für welches wiederum ein enger Bezug zu ebenjenen entzündlichen Erkrankungen bekannt ist (ECKERSALL & BELL, 2010; CECILIANI et al., 2012).

Laut GERNAND et al. (2012) gehören neben den oben beschriebenen Stoffwechselstörungen (Inzidenz pro Laktation 3,5 – 23,1 %) auch die Fruchtbarkeitsstörungen (Inzidenz pro Laktation 51,3 – 58,1 %), Lahmheiten (Inzidenz pro Laktation 18,2 – 31,0 %) und Mastitiden (Inzidenz pro Laktation 31,7 – 47,8 %) zu den bedeutendsten Erkrankungskomplexen in der Milchviehhaltung. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits 2004 auch von WHITAKER et al. (2004) veröffentlicht (durchschnittliche Betriebs-Inzidenzen: Fruchtbarkeitsstörungen 23,5 %, Lahmheiten 21,6 %, Mastitiden 37,9 %), was die andauernde Relevanz dieser Produktionserkrankungen deutlich macht. Vergleichbare Zahlen spiegeln sich in den Tierabgängen von Milchviehbetrieben mit Milchleistungsprüfung aus

dem Jahr 2019 wider, für die Störungen der Fertilität (20,5 %), gefolgt von Eutererkrankungen (12,8 %), Klauenerkrankungen (11,5 %) und Stoffwechselstörungen (3,7 %) als ursächlich erfasst wurden (BUNDESVERBAND RIND UND SCHWEIN, 2020). Alle vier Krankheitsbilder können häufig während der Frühlaktation auftreten (CARVALHO et al., 2019; MACMILLAN et al., 2021) und stehen in Zusammenhang mit erhöhten HP-Konzentrationen in Blut oder Milch. Erhöhtes bHP wurde unter anderem bei Metritis (CHAN et al., 2010; BURFEIND et al., 2014; POHL et al., 2015; BARRAGAN et al., 2018) und Endometritis (BRODZKI et al., 2015a; BRODZKI et al., 2015b) gemessen und ist außerdem zusammenhängend mit Ovarialzysten (BRODZKI et al., 2019) nachweisbar. Ebenso steigt der Parameter aufgrund einer Akute-Phase-Reaktion durch die zugrunde liegenden Klauenerkrankungen mit zunehmendem Lahmheitsgrad an (SMITH et al., 2010; TADICH et al., 2013). Dasselbe gilt für mHP, das bei Mastitiden erhöht ist (CECILIANI et al., 2012), mit zunehmendem Schweregrad ansteigt (WENZ et al., 2010; PYÖRÄLÄ et al., 2011; KALMUS et al., 2013), und darüber hinaus, unter anderem durch die lokale Synthese in neutrophilen Granulozyten (LAI et al., 2009), direkt mit der Zellzahl korreliert ist (NIELSEN et al., 2004; ÅKERSTEDT et al., 2007; KOVAC et al., 2007; LAI et al., 2009).

Aufgrund der hohen Prävalenz von Erkrankungen in der vulnerablen Phase der Frühlaktation und ihrer großen Bedeutung für die betriebliche Tiergesundheit der gesamten Laktationsperiode ist außer einem regelmäßigen Monitoring der Energieversorgung und der Stoffwechselsituation auch ein Monitoring des Entzündungszustandes für die Früherkennung auffälliger Tiere entscheidend. Die Analyse von Milch Inhaltsstoffen aus nicht-invasiv und automatisiert gewonnenen Milchproben stellt seit Jahren eine wichtige Informationsgrundlage für das datenbasierte Tiergesundheitsmonitoring dar. Bislang ist weder auf Einzeltier- noch auf Herdenebene ein Entzündungsparameter in der routinemäßigen Milchanalytik durch MLP oder AMS verfügbar. Daher war das Ziel der vorliegenden Untersuchung, Haptoglobin in Milch als Indikator für entzündliche Erkrankungen bei Milchkühen in der Frühlaktation zu diskutieren und dessen Nutzung im Rahmen des Tiergesundheitsmonitorings zu bewerten. Dazu wurden die Ergebnisse einer umfassenden wissenschaftlichen Literaturrecherche in einem formatierten Übersichtsartikel zusammengestellt (Publikation I). Darüber hinaus wurden die

I. Einleitung

Zusammenhänge zwischen Haptoglobin in Milch einerseits und klinischen sowie labordiagnostischen Parametern andererseits in einer Feldstudie untersucht und ein Grenzwert für die Unterscheidung von gesunden und kranken Tieren ermittelt (Publikation II).

II. LITERATURÜBERSICHT – PUBLIKATION I

Haptoglobin als Indikator für Erkrankungen in der Frühlaktation von Milchkühen unter besonderer Berücksichtigung der Eutergesundheit

Haptoglobin as an indicator for diseases during early lactation of dairy cows, with particular consideration of udder health

Autorinnen/Autoren

Sarah Plattner, Rolf Mansfeld

Institut

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Schlüsselwörter

Akute-Phase-Protein, Akute-Phase-Reaktion, Bestandsbetreuung, Eutergesundheit, somatische Zellzahl, entzündliche Erkrankungen

Key words

Acute phase protein, acute phase reaction, herd health monitoring, udder health, somatic cell count, inflammatory diseases

eingereicht 06.07.2023

akzeptiert 13.11.2023

Bibliografie

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2024; 52: 33 – 41

DOI 10.1055/a-2241-7556

ISSN 1434-1220

© 2024, Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Korrespondenzadresse

Sarah Plattner

Klinik für Wiederkäuer

Sonnenstraße 16

85764 Oberschleißheim

Deutschland

ZUSAMMENFASSUNG

Haptoglobin (HP) ist als Akute-Phase-Protein Teil der unspezifischen Immunantwort und stellt einen aussagekräftigen Indikator für Entzündungszustände beim Rind dar. Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über bisherige Studienergebnisse zu Serum- und Milch-HP in Zusammenhang mit Erkrankungen in der Früh lactation unter besonderer Berücksichtigung der Eutergesundheit geben. Bei entzündlichen Erkrankungen des Reproduktionstraktes, des Stoffwechsels und des Bewegungsapparates steigt HP im Blutserum an und kann als unspezifischer Indikator für Erkrankungen in der Früh lactation dienen.

Für die Differenzierung von gesunden und kranken Tieren stehen Grenzwerte zur Verfügung. Es besteht eine Korrelation zwischen HP in Blut und Milch. Die HP-Konzentration in Milch wird nicht nur von systemischen Erkrankungen beeinflusst, sondern das Euterepithel ist im Fall einer Infektion auch selbst in der Lage, HP zu synthetisieren. Bei Mastitis kann anhand der HP-Konzentration auf die Schwere der Erkrankung rückgeschlossen werden. Außerdem liefert die Höhe des HP-Anstiegs in Milch Hinweise auf das verursachende Pathogen. Für die Differenzierung von gesunden und subklinisch bzw. klinisch erkrankten Tieren stehen Grenzwerte für Milch-HP zur Verfügung.

ABSTRACT

As an acute-phase protein Haptoglobin (HP) is part of the nonspecific immune response and represents a strong indicator for inflammatory conditions in cattle. The purpose of this article is to provide an overview of previous study results on serum and milk HP related to diseases in early lactation with special consideration of udder health. During inflammatory diseases of the reproductive tract, metabolism and musculoskeletal system, HP increases in the serum and may serve as a nonspecific indicator for diseases during early lactation. Threshold values are available for the differentiation of healthy from diseased animals. A correlation exists between HP in blood and milk. The HP concentration in milk is not only influenced by systemic disorders, as the udder epithelium is also independently capable of synthesizing HP in case of an infection. In mastitis, HP concentration may be used to estimate the severity of the disease. In addition, HP may provide certain suspicions regarding the causative pathogen. Threshold values for milk HP are available for the differentiation of healthy individuals from subclinically resp. clinically affected animals.

Einleitung

Akute-Phase-Proteine (APP) dienen in der Humanmedizin schon lange als diagnostische Indikatoren für Entzündungsgeschehen [1]. Bereits 1930 wurde das C-reaktive Protein als erstes bekanntes APP beschrieben und erforscht [2]. Im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion werden APP freigesetzt und erfüllen vielfältige Funktionen, um den Organismus vor Schädigungen durch eindringende Pathogene zu schützen.

Diese erste unspezifische Immunreaktion des Körpers ist Teil des angeborenen Immunsystems und wird bis heute unter dem von Abernethy und Avery [3] geprägten Begriff der „Akuten Phase“ zusammengefasst.

Im Fall einer Gewebeschädigung durch externe oder interne Faktoren [4 – 6] setzen körpereigene Gewebsmakrophagen und Monozyten [5, 7] die Entzündungsmediatoren Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) [4, 7] frei und lösen damit eine Akute-Phase-Reaktion aus. Es kommt zur Synthese von APP in der Leber und in den betroffenen Geweben [4, 7, 8]. Substanzen wie C-reaktives-Protein, Serum-Amyloid-A (SAA) und Haptoglobin erfahren daraufhin einen Konzentrationsanstieg und erfüllen im Verlauf einer komplexen Immunantwort spezifische Aufgaben [9]. Der Nachweis dieser und weiterer Proteine im Blutserum gibt frühzeitig Auskunft über das ablaufende Entzündungsgeschehen und stellt sowohl ein diagnostisches als auch prognostisches Werkzeug dar [10 – 12].

Der diagnostische Wert von APP wurde auch in der Veterinärmedizin untersucht. Konzentrationen und Aussagekraft der einzelnen Proteine unterscheiden sich hinsichtlich Tierart und Art der Erkrankung [10, 11, 13, 14]. Während beim Menschen vor allem das C-reaktive-Protein von großer Bedeutung ist, gilt beim Rind unter anderem das bovine Haptoglobin (HP) als aussagekräftiges APP [9, 15]. Im Rahmen einer Immunreaktion steigt HP im Serum innerhalb von 24–48 Stunden [7, 10, 15] nach der Infektion um das 100 bis 1000-fache an [15], während es unter physiologischen Bedingungen im gesunden Tier kaum nachweisbar ist [13, 14]. Nach Verschwinden des initialen Stimulus sinkt die HP-Konzentration innerhalb von 4 bis 7 Tagen wieder auf ein physiologisches Ausgangsniveau ab [2].

Die Hauptaufgabe von HP besteht in der Bindung von freiem Hämoglobin aus zerstörten Erythrozyten und der daraus resultierenden antioxidativen Wirkung [4, 8 – 10]. Durch die Komplexbildung mit HP ist das freie Eisen nicht mehr für den Stoffwechsel eindringender Pathogene verfügbar [4]. Der Komplex aus HP und dem daran gebundenen Hämoglobin hat eine Halbwertszeit von 20–50 Minuten und wird im Folgenden von Makrophagen aus der Blutbahn entfernt [4]. Nach Jain et al. [2] hat HP einen direkten bakteriostatischen Effekt und wirkt antiinflammatorisch.

Dieser Artikel soll 1. einen Überblick über bisherige Studienergebnisse zu Serum-HP in Zusammenhang mit bedeutsamen Erkrankungen der Frühlaktation geben und 2. die Einsatzmöglichkeiten der Bestimmung von

Milch-HP in Bezug auf Infektionen des Euters mit verschiedenen Pathogenen evaluieren.

Material und Methoden

Für die vorliegende Übersichtsarbeit wurden die Datenbanken Web of Science (1899 bis heute), Pubmed (1996 bis heute), der Online-Katalog (OPAC) der Universitätsbibliothek der LMU München und die Suchmaschine Google Scholar verwendet.

Als Suchbegriffe bei der Literaturrecherche wurden „Bovine haptoglobin“, „acute phase protein cattle“, „Haptoglobin inflammation“, „Inflammatory disease cattle“, „Haptoglobin milk“, „Haptoglobin mastitis“ und „somatic cell count haptoglobin“ verwendet. Insgesamt wurden im Rahmen der Literaturrecherche 223 Artikel gesichtet und gemäß ihrer Relevanz für die zu bearbeitende Thematik gewichtet und sortiert.

Für die Erstellung des vorliegenden Übersichtsartikels wurden 75 Quellen aus nationalen und internationalen wissenschaftlichen Zeitschriften mit Gutachtersystem herangezogen. Originalarbeiten wurden priorisiert berücksichtigt; außerdem wurden ausgewählte systematische Übersichtsartikel verwendet. Inhalte und Methoden der zitierten Artikel wurden nachvollzogen und gemäß der Fragestellung des vorliegenden Übersichtsartikels ausgewertet.

Haptoglobin im Serum

Im Blutserum des Rindes wird HP vorwiegend quantitativ mittels ELISA nachgewiesen [16]. Eckersall und Bell [15] definierten die HP-Konzentration gesunder Tiere als $< 0,02$ mg/ml, während Huzzey et al. [17] einen Schwellenwert von $0,1$ mg/ml nutzten. Hajek et al. [18] konnten gesunde und kranke Tiere anhand eines mittels Clusteranalyse erhobenen Grenzwertes von $0,18$ mg/ml voneinander unterscheiden. Im Rahmen akuter entzündlicher Erkrankungen wie Mastitis, Enteritis, Pneumonie, Endometritis, Peritonitis und Endokarditis kommt es zu signifikanten Erhöhungen der HP-Konzentration [15].

Unabhängig von klinischen Erkrankungen wird HP von einer Reihe weiterer Parameter beeinflusst. Jahreszeit, Stress und der zeitliche Abstand zur Kalbung müssen für die Interpretation gemessener HP-Konzentrationen berücksichtigt werden ( Abb. 1).

In den Sommermonaten wiesen sowohl Hajek et al. [18] (Juli bis September) als auch Alberghina et al. [19] (Juni bis Juli) im Blutserum signifikant höhere HP-Konzentrationen nach als während der restlichen Monate ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$). Konkret maßen Hajek et al. [18] bei in den Sommermonaten beprobten Tieren signifikant häufiger HP-Konzentrationen über $0,35$ mg/ml als bei in den kühleren Monaten (Juni, Oktober, November, Dezember) beprobten Kühen ($p < 0,001$). Chan et al. [20] stellten dagegen während einer einjährigen Beprobung von Färsen keine Beeinflussung der HP-

Konzentration durch warme ($27,3 \pm 1,4$ °C) und kalte ($19,8 \pm 2,2$ °C) Temperaturen fest. Als mögliche Ursache für die voneinander abweichenden Ergebnisse wäre ein größeres Temperaturgefälle in den Studien von Hajek et al. [18] und Alberghina et al. [19] im Vergleich zu der Studie von Chan et al. [20] denkbar.

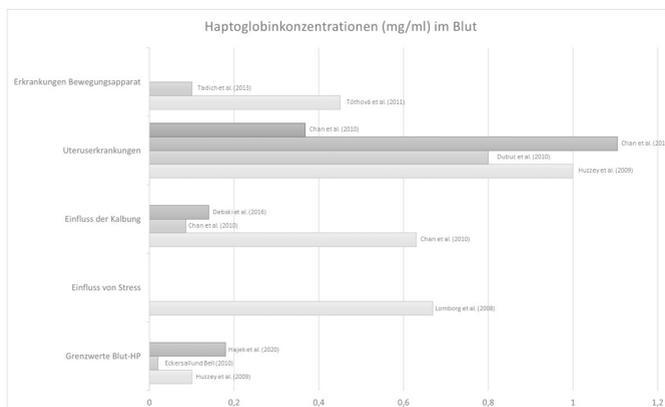
Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen HP und dem Einwirken verschiedener Stressoren belegt. Eine Studie von 2008 zeigte signifikant erhöhtes HP von durchschnittlich 0,669 mg/ml (0,264 bis 2,577 mg/ml) innerhalb von 48 Stunden nach einem sechsstündigen Transport und einer darauffolgenden Aufstallung auf rutschigen Böden in den Seren adulter Tiere ($p < 0,05$) [21].

Außer Jahreszeit und Stress stellt die Kalbung einen wichtigen, die HP-Konzentration beeinflussenden Faktor dar. Uchida et al. [22] wiesen bei 74 % der beprobten Tiere einen Anstieg der HP-Konzentration zum Zeitpunkt der Kalbung nach. Vor der Kalbung konnte HP dagegen nur bei 0–10 % der Tiere detektiert werden [22]. Dies deckt sich mit einer Studie von 2016, in der die geringsten HP-Konzentrationen kurz vor der Kalbung gemessen wurden, während postpartal (p.p.) deutlich erhöhte Konzentrationen (HP 0–1 Monat nach der Kalbung: $0,1398 \pm 0,0098$ mg/ml) nachweisbar waren [23]. In dieser Studie waren die Haptoglobinwerte bei Kühen im ersten Monat p.p. im Vergleich zu den Werten vor dem Kalben im Mittel um 28 % erhöht.

Auch Arfuso et al. [24] maßen die höchsten HP-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Kalbung und das niedrigste HP im präpartalen Zeitraum ($p < 0,001$). Sowohl gesunde als auch erkrankte Tiere weisen laut Humblet et al. [25] in den ersten 7 Tagen p.p. hohe HP-Konzentrationen auf. Von den Autoren wird eine durch die Kalbung ausgelöste physiologische Akute-Phase-Reaktion als Ursache vermutet [25], während Arfuso et al. [24] von einer veränderten Entzündungsanfälligkeit der Kühe aufgrund von Stress durch die Kalbung ausgehen. Die HP-Konzentrationen primiparer und multiparer Tiere unterschieden sich in der Arbeit von Humblet et al. [25] statistisch nicht signifikant voneinander.

Abb. 1: Vergleichende Darstellung von HP-Konzentrationen im Blut (mg/ml) aus verschiedenen Arbeiten: Grenzwerte für Blut-HP, Einfluss von Stress, Einfluss der Kalbung, HP im Zusammenhang mit Uteruserkrankungen, HP im Zusammenhang mit Erkrankungen des Bewegungsapparates. **Quelle** ©: S. Plattner

Fig. 1: Comparative representation of HP concentrations in blood (mg/ml) from several articles: Cut-off values for blood HP, impact of stress, impact of calving, HP related to uterine diseases, HP related to musculoskeletal diseases. **Source** ©: S. Plattner



Haptoglobin im Zusammenhang mit Uteruserkrankungen

In einer Arbeit von 2001 wurde die Haptoglobinkonzentration im Plasma sowohl durch den zeitlichen Abstand zur Kalbung ($p < 0,05$) als auch durch den Grad der bakteriellen Kontamination des Uterus ($p < 0,05$) beeinflusst [26]. Die Plasmakonzentrationen nahmen in der Zeit nach der Abkalbung ab und erreichten ihr Minimum im Durchschnitt am Tag 14 p.p. Die HP-Konzentrationen nahmen darüber hinaus auch mit der fortschreitenden Uterusinvolution ab [26]. Chan et al. [27] stellten ebenfalls bei klinisch gesunden Tieren einen Rückgang der HP-Konzentration innerhalb der ersten 3 Wochen p.p. parallel zur Uterusinvolution fest (Tag 3 p.p.: $0,63 \pm 0,302$ mg/ml; Woche 3 p.p.: $0,086 \pm 0,073$ mg/ml). Bei an Metritis erkrankten Tieren blieben die HP-Werte über 6 Monate nach der Kalbung erhöht (Tag 3 p.p.: $1,105 \pm 0,430$ mg/ml; Woche 3 p.p.: $0,368 \pm 0,255$ mg/ml; Monat 6 p.p.: $0,179 \pm 0,173$ mg/ml), während die Ausgangswerte (definiert als $< 0,1309$ mg/ml) bei der klinisch gesunden Kontrollgruppe bereits in der dritten Woche p.p. wieder erreicht wurden [27].

Kühe mit akuter puerperaler Metritis haben signifikant höhere Serum HP-Konzentrationen [28 – 30]. Gleiches gilt für Kühe mit Endometritis oder Ovarialzysten in der Früh lactation [31 – 33]. Nach Huzzey et al. [17] ist die Wahrscheinlichkeit, eine schwere oder leichte Metritis zu entwickeln, 6,7-mal höher bei Kühen mit einer HP-Konzentration von ≥ 1 mg/ml an Tag 3 p.p. Auch Dubuc et al. [34] assoziierten $HP \geq 0,8$ mg/ml innerhalb der ersten 7 Tagen p.p. mit einer zweifach höheren Wahrscheinlichkeit an Metritis zu erkranken (Sensitivität: 39,1; Spezifität: 79,6; $p < 0,01$). Laut Shin et al. [35] ist eine HP-Konzentration von $> 0,1$ mg/ml in der postpartalen Woche bereits mit einer höheren Inzidenz von peri- und postpartalen Störungen sowie einer geringeren Milchleistung und Reproduktionsfähigkeit verbunden.

Smith et al. [36] untersuchten HP als Indikator für die Erfolgskontrolle im Behandlungsfall und wiesen eine Abnahme der anfangs erhöhten HP-Konzentrationen durch die antibiotische Behandlung von toxischer puerperaler Metritis während eines fünftägigen Behandlungsintervalls nach.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Behandlung von Infektionen des Harntraktes dokumentiert. Erfolgreich behandelte Tiere wiesen geringere HP-Konzentrationen (Median: 2,55 mg/ml) auf als Tiere, deren Zustand sich durch die antibiotische Behandlung nicht besserte (Median: 7,540 mg/ml) [37].

Haptoglobin im Zusammenhang mit Stoffwechselstörungen

Der Nachweis des Ketonkörpers Beta-Hydroxybutyrat (BHB) im Blut und die Bestimmung der Konzentration freier Fettsäuren (NEFA) sind aussagekräftige Parameter für das Vorliegen von Ketose bzw. einer negativen Energiebilanz bei Milchkühen. Beide Parameter weisen eine positive Korrelation mit erhöhtem HP auf [18, 38]. Ursächlich wird angenommen, dass durch die Oxidation der bei Energiemangel freigesetzten Fettsäuren (NEFA) ein inflammatorischer Zustand entsteht [38]. Von anderen Autoren wurde in einer Studie von 2016 vermutet, dass eine erhöhte intestinale Permeabilität (Leaky-gut Syndrom) im Zeitraum der Kalbung und die dadurch bedingte Lipopolysaccharid (LPS)-Infiltration die Entwicklung von Ketose begünstigen [39]. Eine ähnliche Theorie verfolgten Gozho et al. [40], die in ihrer Studie erhöhte HP-Konzentrationen bei der Induktion von subakuter Pansenazidose (SARA) beobachteten. Sie führten den Anstieg der APP HP und SAA unter anderem auf die Bildung von Mikroläsionen im Pansenepithel zurück, die eine Migration von LPS in den systemischen Blutkreislauf ermöglichen. Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen HP und dem Fettleber-Syndrom vermutet [41]. Tiere mit erhöhtem Leberfettgehalt wiesen in einer Studie von Ametaj et al. [41] an Tag 3, Tag 8 und Tag 12 nach der Kalbung höhere HP-Serumkonzentrationen auf als Kühe einer gesunden Kontrollgruppe ($p \leq 0,1$; $p \leq 0,05$; und $p \leq 0,05$). Der Körperfettanteil von Milchkühen scheint dagegen nicht mit erhöhten Serumkonzentrationen von HP zusammenzuhängen [42], obwohl HP als Adipokin eingestuft wird und HP-mRNA-Expression in Fettgeweben nachgewiesen wurde [42, 43]. Unterschiedliche Grade von Adipositas werden demnach nicht als Störfaktoren bei der Verwendung von HP als Entzündungsmarker gesehen [42].

Haptoglobin im Zusammenhang mit Lahmheit

Klauenerkrankungen können eine systemische Akute-Phase-Reaktion bei Milchkühen auslösen und gehen mit einer signifikanten Erhöhung der HP-Konzentration einher [44 – 46]. Tóthová et al. [44] untersuchten den Einfluss von Klauenerkrankungen auf die Konzentration verschiedener APP und wiesen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den HP-Konzentrationen gesunder Tiere ($n = 23$; $0,094 \pm 0,086$ mg/ml) und denen kranker Tiere ($n = 35$; $0,450 \pm 0,601$ mg/ml) nach. In einer Studie von Nazifi et al. [47] wurden 3,3-mal höhere HP-Konzentrationen bei an interdigitaler Dermatitis erkrankten Tieren als bei gesunden Vergleichstieren gemessen. Auch mit einem zunehmenden Locomotion-Score (LS) steigt die HP-Konzentration im Serum [46, 48]. Nach Tadich et al. [48] beträgt die HP-Konzentration bei einem LS > 1 mehr als 0,1 mg/ml.

Haptoglobin in der Milch

HP wird sowohl in der Leber als auch direkt in betroffenen Geweben synthetisiert [8, 49, 50]. Die Expression von HP-mRNA wurde 1995 sowohl in Alveolarepithelzellen von Mäusen und Pavianen [49], als auch in Adipozyten von Mäusen [50] nachgewiesen.

Findet die HP-Synthese bei einer systemischen Entzündungsreaktion des Rindes in der Leber statt, diffundiert HP aus dem Blut in die Milch und steigt dort nachweisbar an [51]. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der HP-Konzentration im Serum und der HP-Konzentration in der Milch (Eckersall et al. [51] $r = 0,51$, $p < 0,001$; Kovac et al. [52] $r = 0,69$, $p = 0,0003$) [51 – 53]. Das Alveolarepithel [54, 55] des Euters ist im Fall einer Mastitis aber auch selbst in der Lage, einige APP zu synthetisieren und so eine schnelle lokale Abwehrreaktion auszulösen [15, 54 – 56]. HP erfährt dann schon kurze Zeit nach der Infektion einen starken Konzentrationsanstieg in der Milch des erkrankten Euterviertels. Hiss et al. [56] stellten bereits 3 Stunden nach einer intramammären Infusion mit Lipopolysaccharid (LPS) 35-mal höhere HP-Konzentrationen als vor der Verabreichung fest ($p < 0,05$). Mittels ELISA ist HP als früher diagnostischer Indikator für Mastitis nachweisbar [2, 15, 56]. Eine weitere Quelle für HP in Milch stellen neutrophile Granulozyten dar, deren Anzahl aufgrund der lokalen Entzündung im Euter ansteigt und die ihrerseits HP synthetisieren [57]. Es besteht eine positive Korrelation zwischen erhöhten Zellzahlen (SCC) und erhöhtem HP in Milch [52, 53, 57, 58] (Kovac et al. [52]: $r = 0,83$; $p < 0,0001$; Lai et al. [57]: $r = 0,742$; $p < 0,01$).

In der Milch gesunder Kühe ist HP niedrig oder nicht nachweisbar [51, 59, 60]. Die Milchkonzentration von HP wird aber, wie auch die Serumkonzentration, von der Kalbung beeinflusst. Thomas et al. [61] wiesen bei Kühen nach der Kalbung moderat erhöhte HP-Konzentrationen in Gesamtgemelksproben nach und beobachteten in den ersten 3–5 Tagen p.p. ein Absinken von HP auf einen Median von 5,2 $\mu\text{g/ml}$ (Tag 5). Die HP-Konzentration von Tag 4 p.p. unterschied sich nicht signifikant von den Werten an Tag 10 p.p. [61]. Vermutet werden kann demnach, dass ab Tag 4 p.p. wieder physiologische HP-Konzentrationen zu erwarten sind.

Haptoglobin als Indikator für subklinische und klinische Mastitis

Während klinische Mastitis durch abnorme Milch und die lokale bzw. systemische Entzündungssymptomatik diagnostiziert wird, stützt sich die Diagnose der subklinischen Mastitis auf den Nachweis einer Zellzahlerhöhung via California Mastitis Test oder durch die Daten der Milchleistungsprüfung. Auch der HP-Wert erlaubt eine Unterscheidung von gesunden Kühen und subklinisch bzw. klinisch an Mastitis erkrankten Tieren [62, 63]. In einer Studie von Pyörälä et al. [64] war die HP-Konzentration bei Fällen von klinischer Mastitis (80,0 $\mu\text{g/ml}$; Interquartilsabstand IQR 10,2 bis 332,0 $\mu\text{g/ml}$) höher als bei Fällen von subklinischer Mastitis (33,8 $\mu\text{g/ml}$; IQR $< 7,8$ bis 135,5 $\mu\text{g/ml}$) ($p = 0,014$).  **Tab. 1** gibt einen Überblick über HP-Grenzwerte aus verschiedenen Studien im Zusammenhang mit klinischen bzw. subklinischen Mastitiden. Thomas et al. [65] und Wollowski

et al. [62] unterschieden anhand der Grenzwerte 3,5 bzw. 3,65 µg/ml zwischen „gesund“ und „subklinisch erkrankt“ (> 100.000 Zellen/ml Milch), während Hiss et al. [66] mit 2,7 µg/ml (subklinische Mastitis > 200.000 Zellen/ml Milch) einen geringgradig niedrigeren Grenzwert definierten (Tab. 1).

Tab. 1: Grenzwerte für die Unterscheidung von eutergesunden, subklinisch, und klinisch an Mastitis erkrankten Kühen anhand der HP-Konzentration in Milch.

Tab. 1: Cut-off values for the differentiation of healthy, subclinical, and clinical with mastitis infected cows based on the concentration of HP in milk.

	Hapto-globin	Sensitivität	Spezifität	Area under the curve (AUC)	p-Wert	Quelle
Grenzwert subklinische Mastitis	3,65 µg/ml	0,92	0,94	0,980	< 0,001	Wollowski et al. (2021) ¹ [62]
	2,7 µg/ml	0,89	0,92	Keine Angabe	Keine Angabe	Hiss et al. (2007) ² [66]
	3,5 µg/ml	0,74	0,69	0,75	Keine Angabe	Thomas et al. (2015) ³ [65]
Grenzwert klinische Mastitis	5,40 µg/ml	0,96	0,99	0,997	< 0,001	Wollowski et al. (2021) ¹ [62]
Grenzwert subklinische zu klinischer Mastitis	12,65 µg/ml	0,74	0,75	0,796	< 0,001	Wollowski et al. (2021) ¹ [62]
	7,9 µg/ml	0,53	0,95	0,78	Keine Angabe	Thomas et al. (2015) ³ [65]

¹ Anzahl Euterviertel (n), Wollowski et al. (2021): 67 gesunde Euterviertel (< 100.000 Zellen / ml Milch), 107 subklinisch erkrankte Euterviertel (> 100.000 Zellen / ml Milch), 115 klinisch erkrankte Euterviertel (Entzündungssymptomatik)

² Anzahl Euterviertel (n), Hiss et al. (2007): 17 gesunde Euterviertel (< 100.000 Zellen / ml Milch), 66 subklinisch erkrankte Euterviertel (> 100.000 Zellen / ml Milch und 2 von 3 positiven bakteriologischen Untersuchungsergebnissen); keine Angabe zu (n) Euterviertel mit > 200.000 Zellen / ml Milch

³ Anzahl Proben Gesamtgemelk (n), Thomas et al. (2015): 29 als „gesund“ klassifizierte Proben (< 100.000 Zellen / ml Milch), 8 als „subklinisch erkrankt“ klassifizierte Proben (100.000 – 200.000 Zellen / ml Milch), 17 als „klinisch erkrankt“ klassifizierte Proben (> 200.000 Zellen / ml Milch)

Haptoglobin als Indikator für verschiedene Mastitis verursachende Pathogene

Über die Anwendung als Indikator für subklinische und klinische Mastitis hinaus, kann mittels HP auch auf den Schweregrad der Erkrankung rückgeschlossen werden. Außerdem liefert die Höhe der HP-Konzentration Hinweise auf die Mastitis-verursachenden Pathogene.

Kalmus et al. [67] wiesen bei schweren Mastitiden mit gestörtem Allgemeinbefinden signifikant höhere HP-Konzentrationen nach als bei milden (abnorme Milch) oder moderaten (lokale Entzündungssymptomatik) Krankheitsverläufen ($p = 0,006$). Eine mit dem Schweregrad der Symptomatik bei klinischer Mastitis zunehmende HP-Konzentration ergab auch eine Studie aus 2011 von Pyörälä et al. [64].

Kalmus et al. [67] maßen außerdem signifikant höhere HP-Konzentrationen bei Infektionen mit *E. coli* oder mit *Sc. dysgalactiae* als bei Infektionen mit anderen Erregern (🔍 **Tab. 2**). Auch Thomas et al. [63] beschrieben signifikante HP-Konzentrationsunterschiede im Zusammenhang mit verschiedenen Mastitis-verursachenden Erregergruppen ($p = 0,000$) (🔍 **Tab. 2**). Die höchsten HP-Konzentrationen wurden in dieser Studie bei Infektionen mit *E. coli* nachgewiesen. Umweltstreptokokken verursachten ebenfalls deutliche Konzentrationserhöhungen, während *S. aureus* und Koagulase negative Staphylokokken (KNS) nur geringgradig erhöhtes HP bedingten (🔍 **Tab. 2**) [63]. Die Arbeit von Pyörälä et al. [64] ergab ähnlich niedrige Konzentrationen bei Infektion mit KNS; die höchsten HP-Werte wurden hier aber außer bei Infektionen mit *E. coli* auch bei Mastitiden durch *T. pyogenes* gemessen (🔍 **Tab. 2**). Obwohl HP in Milch durch eine Infektion mit *Sc. uberis* ebenfalls ansteigt (🔍 **Tab. 2**), kommt es nach Pedersen et al. [68] zu keiner Erhöhung der HP-Konzentration im Blut. Pedersen et al. [68] wiesen maximal zehnfach erhöhte HP-Konzentrationen in der Milch infizierter Euterviertel nach und auch Thomas et al. [63] stellten nur moderate HP-Erhöhungen durch Umweltstreptokokken fest (🔍 **Tab. 2**).

Nach Wenz et al. [69] ist HP bei Infektionen mit gram-negativen Erregern doppelt so hoch wie bei Infektionen mit gram-positiven Erregern ($p = 0,01$). Darüber hinaus wiesen schwer und moderat erkrankte Tiere dieser Studie doppelt so hohe HP-Werte auf wie Tiere mit einer milden Euterentzündung ($p < 0,001$) [69].

In den für die vorliegende Arbeit verwendeten Studien (🔍 **Tab. 2**) wurden die höchsten HP-Konzentrationen bei Infektionen mit *E. coli* gemessen. Als Ursache hierfür kann die starke systemische Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch die im Krankheitsverlauf freigesetzten Endotoxine [64], vermutet werden. HP steigt daraufhin nicht nur in der Milch, sondern auch im Blut stark an [70]. Gleiches könnte für Infektionen mit *T. pyogenes* gelten, im Rahmen derer das Euterepithel stark geschädigt wird. Kalmus et al. [67] vermuteten, dass die Freisetzung von HP vom Grad der Epithelschädigung und dem Ausmaß der Entzündungsreaktion abhängt.

In allen hier berücksichtigten Untersuchungen wurden die niedrigsten HP-Konzentrationen im Zusammenhang mit Mastitiden durch *S. aureus* und KNS beschrieben (▶ **Tab. 2**). Aufgrund dessen schlussfolgerten Simões et al. [71], dass HP bei Infektionen mit diesen Pathogenen nur geringe diagnostische Aussagekraft besitzt. Im Gegensatz dazu stehen Studien von Eckersall et al. [72] und Grönlund et al. [59], die trotz niedriger Konzentrationen (▶ **Tab. 2**) einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen mit *S. aureus* infizierten Eutervierteln und den Eutervierteln der gesunden Kontrollgruppen ($p < 0,005$ bzw. $p = 0,0013$) ergaben. *S. aureus* und KNS lösen demnach eine in der Regel milde Entzündungsreaktion aus, bei der es zu einer geringgradigeren Bildung von Akute-Phase-Proteinen kommt als bei durch andere Pathogene verursachten Mastitiden.

Tab. 2: HP-Konzentrationen in Milch bei Kühen mit Mastitis, verursacht durch verschiedene Pathogene.

Tab. 2: milk HP-concentrations in mastitis cows, caused by different pathogens.

Pathogen	Milchproben (n)	HP-Mittelwert (µg/ml)	Standardabweichung (µg/ml)	HP-Median (µg/ml)	Minimum, Maximum (µg/ml)	Quellen
<i>E. coli</i>	57	-	-	1052	-	Wenz et al. (2010) [69]
	23	-	-	243,5	-	Pyörälä et al. (2011) [64]
	9	267,9	± 86,3	-	-	Rinaldi et al. (2010) [73]
	7	600	± 490	-	-	Suolaja et al. (2008) [70]
	3	-	-	81	59,0 - 184,0	Hiss et al. (2007) [66]
	18	-	-	575,4	59,0 - 1288,1	Kalmus et al. (2013) [67]
	24	-	-	164,1	0,0 - 2009,4	Dalanezi et al. (2020) [74]
<i>T. pyogenes</i>	24	-	-	440,3	-	Pyörälä et al. (2011) [64]
	10	-	-	618,5	5,0 - 1155,8	Kalmus et al. (2013) [67]
<i>Sc.</i>	48	-	-	34,5	-	Pyörälä et al. (2011) [64]

II. Literaturübersicht – Publikation I

<i>dysgalactiae</i>	19	-	-	248,9	74,8 - 1118,2	Kalmus et al. (2013) [67]
<i>Sc. uberis</i>	42	11,1	± 0,4	-	-	Wolowski et al. (2021) [62]
	43	-	-	36,7	-	Pyörälä et al. (2011) [64]
	36	-	-	385,6	59,0 - 970,3	Kalmus et al. (2013) [67]
<i>S. aureus</i>	21	11,86	± 0,3	-	-	Wolowski et al. (2021) [62]
	44	-	-	33,0	-	Pyörälä et al. (2011) [64]
	49	-	-	39,6	0,35 - 304,8	Hiss et al. (2007) [66]
	61	40,3	± 62,1	19,9	< 1,2 - 323	Grönlund et al. (2003) [59]
	18	-	-	201,1	59,0 - 756,2	Kalmus et al. (2013) [67]
	8	22,9	± 10,1	-	-	Eckersall et al. (2006) [72]
	15	-	-	158,7	0,0 - 596,1	Dalanezi et al. (2020) [74]
<i>KNS</i>	16	8,52	± 0,4	-	-	Wolowski et al. (2021) [62]
	19	-	-	403	-	Wenz et al. (2010) [69]
	45	-	-	7,8	-	Pyörälä et al. (2011) [64]
	11	-	-	123	59,0 - 775,5	Kalmus et al. (2013) [67]
	24	-	-	0	0,0 - 319,1	Dalanezi et al. (2020) [74]
	60	-	-	3,1	0,35 - 576,0	Hiss et al. (2007) [66]

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Haptoglobin im Serum

Bovines Haptoglobin ist ein aussagekräftiges APP beim Rind [9, 15]. Es kann schnell und einfach gemessen werden und steigt sowohl im Serum als auch in der Milch im Zusammenhang mit bedeutenden entzündlichen Erkrankungen der Früh lactation an [15].

In Hinblick auf Erkrankungen des Reproduktionstraktes, des Stoffwechsels und des Bewegungsapparates stellt HP einen sensitiven, wenn auch

unspezifischen Parameter dar. Aufgrund der im Rahmen der Kalbung ablaufenden Akute-Phase-Reaktion [23, 25] sollte die Interpretation von HP in der ersten Woche p.p. mit Vorsicht erfolgen. Darüber hinaus haben Faktoren wie Hitzestress während der Sommermonate [18, 19] und auch die Einwirkung weiterer Stressoren [21] Einfluss auf die HP-Konzentration. Ein vielversprechender Ansatz könnte die Nutzung von HP als Indikator für den Therapieerfolg sein, die bereits von Smith et al. [36] und El-Deeb et al. [37] beschrieben wurde. Wie in der Studie von Dubuc et al. [34] könnte HP außerdem als Vorhersageparameter für die Erkrankungswahrscheinlichkeit hilfreich sein.

Die Messung von HP kann die klinische Untersuchung erkrankter Organsysteme aufgrund der fehlenden Spezifität nicht ersetzen, sondern nur als genereller Indikator für das Vorliegen eines entzündlichen Zustands dienen. Für die Diagnose von entzündlichen Prozessen in der Praxis steht bereits der Glutardialdehyd-Test zur Verfügung, der allerdings eine gewisse Latenzzeit voraussetzt, bevor eine positive Reaktion eintritt [75] und der im Falle von akuter Entzündung somit falsch negativ ausfallen könnte. HP dagegen erlaubt aufgrund des schnellen Konzentrationsanstiegs eine Aussage über das Vorliegen von akuten Entzündungen, auch wenn die Höhe der HP-Konzentration ebenso abhängig vom Zeitpunkt der Untersuchung des Tieres im Krankheitsverlauf ist. Trotz der möglichen Varianz der Ergebnisse (abhängig vom zeitlichen Abstand zum auslösenden Stimulus) wäre ein für die Nutzung im Stall optimierter Serumhaptoglobin-Test wünschenswert, um die diagnostischen Möglichkeiten bei der Beurteilung von Entzündungszuständen zu erweitern.

Haptoglobin in der Milch

Außer der Messung im Blutserum kann HP auch in der Milch gemessen werden. Es besteht eine Korrelation zwischen Serum- und Milch-HP [51 – 53]. HP in Milch kann aus der Leber stammen und ins Euter diffundieren [51] oder aber lokal im Euterepithel und durch neutrophile Granulozyten gebildet werden [54 – 57]. Die Synthese im Euter dient als schnelle Abwehrreaktion gegen Pathogene, was die Relevanz der Untersuchung von Milch-HP im Zusammenhang mit Mastitis erklärt.

Die HP-Konzentration erlaubt eine Differenzierung zwischen gesunden Tieren und Tieren mit subklinischer Mastitis anhand verschiedener Grenzwerte in der Größenordnung 2,7–3,65 µg/ml (▶ Tab. 1) [62, 65, 66]. Die HP-Konzentration ermöglicht außerdem eine Einschätzung des Schweregrades einer Mastitis. Mit zunehmender Schwere der Symptomatik steigt auch der HP-Wert an [64, 67, 69].

Verschiedene Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Gruppe der beteiligten Mastitiserreger die Höhe der HP-Konzentration beeinflusst [63, 64, 67, 69]. Wenz et al. [69] postulierten, dass gram-negative Erreger höhere Konzentrationen hervorrufen als gram-positive Pathogene [69]. Dass die höchsten HP-Konzentrationen in den für die vorliegende Arbeit verwendeten Studien bei Infektionen mit *E. coli* nachgewiesen wurden (▶ Tab. 2), stützt diese These. Durch die von *E. coli* gebildeten Endotoxine wird eine starke

systemische Entzündungsreaktion ausgelöst, die besonders hohes HP bedingt [64]. Da aber auch im Rahmen von Infektionen mit *T. pyogenes* sehr hohes HP auftrat (Tab. 2), wird darüber hinaus vermutet, dass das Ausmaß der Gewebeschädigung [64, 67] neben der Schwere der Entzündungsreaktion einen großen Einfluss auf die HP-Konzentration hat.

Eine hohe Milch-HP-Konzentration bei Mastitis ist als Indikator für einen schweren Verlauf mit einer starken Entzündungsreaktion zu werten und kann Hinweise auf den die Erkrankung verursachenden Erreger geben. HP könnte demnach als frühzeitig in der Milch nachweisbarer diagnostischer Parameter herangezogen werden. In Hinblick auf Antibiotikaminimierungskonzepte könnten Milch-HP-Konzentrationen zu einer Therapieentscheidung im akuten Mastitisfall beitragen, sofern anhand von Grenzwerten tatsächlich eine Abschätzung verursachender Erregergruppen möglich wäre. Sehr hohes HP wäre in der Praxis demnach ein Indikator für gram-negative Erreger, deren Nachweis eine pauschale antibiotische Therapie infrage stellt. In der Literatur sind aber bislang keine Grenzwerte für die Unterscheidung verschiedener Erregergruppen anhand von HP zu finden und die bereits publizierten HP-Konzentrationen im Falle von Mastitis variieren stark (Tab. 2). Die hohe Variabilität der bisherigen Studienergebnisse bietet momentan keine Grundlage für die Nutzung von Milch-HP als erregerspezifisches Diagnostikum beim Einzeltier. Zudem ist die Unterscheidung von gram-negativen und gram-positiven Mastitisserregern bereits anhand von bakteriologischen Schnelltestsystemen innerhalb weniger Stunden möglich.

Auf Bestandesebene könnte die Integration des Parameters in automatisierte Melksysteme für die Früherkennung von erkrankten Tieren via Milch-HP in einem routinemäßigen Screening hilfreich sein. Von Bedeutung ist dies vor allem in der risikobehafteten Frühlaktation, um eine noch engmaschigere Überwachung der frischmelkenden Tiere sicherzustellen. Eine Nutzung als Indikator für Erkrankungen müsste unter Berücksichtigung der Zellzahl des entsprechenden Tieres erfolgen, da eine beeinträchtigte Eutergesundheit die Höhe der HP-Konzentrationen beeinflusst und nicht zwischen intra- und extramammären Entzündungsprozessen unterschieden werden kann.

FAZIT FÜR DIE PRAXIS

Die Messung von Haptoglobin kann die klinische Untersuchung erkrankter Organsysteme aufgrund der fehlenden Spezifität nicht ersetzen und sollte im Fall von Euterentzündungen immer unter Berücksichtigung von mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen und der klinischen Symptomatik interpretiert werden. Haptoglobin kann als Indikator für Entzündungszustände genutzt werden und erlaubt eine Abschätzung des Schweregrades einer Entzündung. Für den tierärztlichen Einsatz im Stall wäre ein Schnelltest für Serumhaptoglobin wünschenswert.

Milchhaptoglobin könnte für routinemäßige Screenings, zum Beispiel durch automatisierte Melksysteme oder auch im Rahmen der Milchleistungs-

prüfung verwendet werden und eine Früherkennung von akut erkrankten Tieren wie auch eine Beurteilung der Gesundheitssituation auf Bestandsebene ermöglichen.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1 Horadagoda NU, Knox KM, Gibbs HA. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec* 1999; 144: 437-441 DOI: 10.1136/vr.144.16.437.

2 Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci* 2011; 3: 118

3 Abernethy TJ, Avery OT. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood : I. Distribution of the protein in patients sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with c polysaccharide of pneumococcus. *J Exp Med* 1941; 73: 173-182 DOI: 10.1084/jem.73.2.173.

4 Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD. et al. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics* 2012; 75: 4207-4231 DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.004.

5 Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1996; 1317: 84-94

6 Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 1045-1056 DOI: 10.1631/jzus.2005.B1045.

7 Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80

8 Dobryszcka W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 647-654

9 Tóthová C, Nagy O, Seidel H. et al. Acute phase proteins as markers of diseases in farm animals. *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases* 2011; 231-258

10 Tóthová C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet Med (Praha)* 2014; 59: 163-180 DOI: 10.17221/7478-vetmed.

- 11** Eckersall P. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comparative Haematology International* 1995; 5: 93-97
- 12** Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 2004; 168: 28-40
- 13** Eckersall P, Conner J. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun* 1988; 12: 169-178
- 14** Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 2004; 35: 163-187
- 15** Eckersall P, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 2010; 185: 23-27
- 16** Young C, Eckersall P, Saini P. et al. Validation of immunoassays for bovine haptoglobin. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 49: 1-13
- 17** Huzzey J, Duffield T, LeBlanc S. et al. Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J Dairy Sci* 2009; 92: 621-625
- 18** Hajek F, Reus A, Gruber S. et al. Use of serum haptoglobin concentration as an indicator in animal health monitoring of dairy cows. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2020; 48: 228-238
- 19** Alberghina D, Piccione G, Casella S. et al. The effect of the season on some blood metabolites and haptoglobin in dairy cows during postpartum period. *Arch Anim Breed.* 2013; 56: 354-359
- 20** Chan JPW, Chu CC, Fung HP. et al. Serum haptoglobin concentration in cattle. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 43-46
DOI: 10.1292/jvms.66.43.
- 21** Lomborg S, Nielsen L, Heegaard PM. et al. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet Res Commun* 2008; 32: 575-582
- 22** Uchida E, Katoh N, Takahashi K. Appearance of Haptoglobin in Serum From Cows at Parturition. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 893-894
- 23** Debski B, Nowicki T, Zalewski W. et al. Evaluation of acute phase proteins in clinically healthy dairy cows in perinatal period and during lactation. *Pol J Vet Sci* 2016; 19: 519-523 DOI: 10.1515/pjvs-2016-0065.
- 24** Arfuso F, Minuti A, Liotta L. et al. Stress and inflammatory response of cows and their calves during peripartum and early neonatal period. *Theriogenology* 2023; 196: 157-166

- 25** Humblet MF, Guyot H, Boudry B. et al. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. *Vet Clin Pathol* 2006; 35: 188-193
- 26** Sheldon I, Noakes D, Rycroft A. et al. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec* 2001; 148: 172-175
- 27** Chan JPW, Chang CC, Hsu WL. et al. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 72-78
- 28** Barragan A, Piñeiro J, Schuenemann G. et al. Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis. *J Dairy Sci* 2018; 101: 8248-8258
- 29** Burfeind O, Sannmann I, Voigtsberger R. et al. Receiver operating characteristic curve analysis to determine the diagnostic performance of serum haptoglobin concentration for the diagnosis of acute puerperal metritis in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2014; 149: 145-151
DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.07.020.
- 30** Pohl A, Burfeind O, Heuwieser W. The associations between postpartum serum haptoglobin concentration and metabolic status, calving difficulties, retained fetal membranes, and metritis. *J Dairy Sci* 2015; 98: 4544-4551
- 31** Brodzki P, Brodzki A, Krakowski L. et al. Levels of selected cytokines and acute-phase proteins in the serum of dairy cows with cystic ovarian disease and those in follicular and luteal phases of normal ovarian cycle. *Res Vet Sci* 2019; 123: 20-25 DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.12.007.
- 32** Brodzki P, Kostro K, Brodzki A. et al. Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. *Theriogenology* 2015; 84: 11-18
- 33** Brodzki P, Kostro K, Krakowski L. et al. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet Res Commun* 2015; 39: 143-149
- 34** Dubuc J, Duffield T, Leslie K. et al. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J Dairy Sci* 2010; 93: 5764-5771
- 35** Shin D, Jeong J, Choi I. et al. Associations between serum haptoglobin concentration and peri-and postpartum disorders, milk yield, and

reproductive performance in dairy cows. *Livestock Science* 2018; 213: 14-18

36 Smith BI, Donovan GA, Risco CA. et al. Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis. *Vet Rec* 1998; 142: 83-85 DOI: 10.1136/vr.142.4.83.

37 El-Deeb WM, Elmoslemany AM. Acute phase proteins as biomarkers of Urinary Tract Infection in dairy cows: diagnostic and prognostic accuracy. *Jpn J Vet Res* 2016; 64: 57-66

38 El-Deeb WM, El-Bahr SM. Biomarkers of ketosis in dairy cows at postparturient period: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. *Vet Arhiv* 2017; 87: 431-440
DOI: 10.24099/vet.arhiv.160126c.

39 Abuajamieh M, Kvidera SK, Fernandez MVS. Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows. *Res Vet Sci* 2016; 109: 81-85

40 Gozho G, Plaizier J, Krause D. et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J Dairy Sci* 2005; 88: 1399-1403

41 Ametaj BN, Bradford BJ, Bobe G. et al. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Can J Anim Sci* 2005; 85: 165-175 DOI: 10.4141/a04-043.

42 Saremi B, Al-Dawood A, Winand S. et al. Bovine haptoglobin as an adipokine: Serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 146: 201-211

43 Maffei M, Barone I, Scabia G. et al. The multifaceted haptoglobin in the context of adipose tissue and metabolism. *Endocr Rev* 2016; 37: 403-416

44 Tóthová C, Nagy O, Seidel H. et al. The influence of hoof diseases on the concentrations of some acute phase proteins and other variables of the protein profile in heifers. *Acta Vet Brno* 2011; 61: 141-150

45 Bagga A, Randhawa SS, Sharma S. et al. Acute phase response in lame crossbred dairy cattle. *Vet World* 2016; 9: 1204-1208 DOI: 10.14202/vetworld.2016.1204-1208.

46 Smith BI, Kauffold J, Sherman L. Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders. *Vet J* 2010; 186: 162-165
DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.08.012.

- 47** Nazifi S, Esmailnezhad Z, Haghkhah M. et al. Acute phase response in lame cattle with interdigital dermatitis. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; 28: 1791-1796
- 48** Tadich N, Tejada C, Bastias S. et al. Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. *Vet J* 2013; 197: 401-405 DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.01.029.
- 49** Yang F, Friedrichs WE, Navarijo-Ashbaugh AL. et al. Cell type-specific and inflammatory-induced expression of haptoglobin gene in lung. *Lab Invest* 1995; 73: 433-440
- 50** Friedrichs WE, Navarijoashbaugh AL, Bowman BH. et al. Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 250-256
- 51** Eckersall PD, Young FJ, McComb C. et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec* 2001; 148: 35-41 DOI: 10.1136/vr.148.2.35.
- 52** Kovac G, Popelkova M, Tkacikova L. et al. Interrelationship between somatic cell count and acute phase proteins in serum and milk of dairy cows. *Acta Vet Brno* 2007; 76: 51-57
DOI: 10.2754/avb200776010051.
- 53** Nielsen BH, Jacobsen S, Andersen P. et al. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Vet Rec* 2004; 154: 361-365
- 54** Thielen M, Mielenz M, Hiss S. et al. Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2007; 90: 1215-1219
- 55** Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 140: 181-189
- 56** Hiss S, Mielenz M, Bruckmaier RM. et al. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3778-3784 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73516-X.
- 57** Lai I-H, Tsao JH, Lu YP. et al. Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk. *Vet Res* 2009; 40: 1

- 58** Åkerstedt M, Waller KP, Sternesjö Å. Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. *J Dairy Res* 2007; 74: 198-203
- 59** Grönlund U, Hultén C, Eckersall PD. et al. Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Res* 2003; 70: 379
- 60** Åkerstedt M, Forsbäck L, Larsen T. et al. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *J Dairy Res* 2011; 78: 88
- 61** Thomas FC, Waterston M, Hastie P. et al. Early post parturient changes in milk acute phase proteins. *J Dairy Res* 2016; 83: 352-359 DOI: 10.1017/S0022029916000297.
- 62** Wollowski L, Heuwieser W, Kossatz A. et al. The value of the biomarkers cathelicidin, milk amyloid A, and haptoglobin to diagnose and classify clinical and subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 2021; 104: 2106-2122
- 63** Thomas F, Geraghty T, Simões P. et al. A pilot study of acute phase proteins as indicators of bovine mastitis caused by different pathogens. *Res Vet Sci* 2018; 119: 176-181
- 64** Pyörälä S, Hovinen M, Simojoki H. et al. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Vet Rec* 2011; 168: 535-535
- 65** Thomas FC, Waterston M, Hastie P. et al. The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd. *BMC Vet Res* 2015; 11: 1-10
- 66** Hiss S, Mueller U, Neu-Zahren A. et al. Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters. *Vet Med (Praha)* 2007; 52: 245
- 67** Kalmus P, Simojoki H, Pyörälä S. et al. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *J Dairy Sci* 2013; 96: 3662-3670
- 68** Pedersen L, Aalbaek B, Røntved C. et al. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. *J Comp Pathol* 2003; 128: 156-164
- 69** Wenz JR, Fox L, Muller F. et al. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2010; 93: 2458-2470

70 Suojala L, Orro T, Järvinen H. et al. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet Scand* 2008; 50: 1-10

71 Simões P, Campbell M, Viora L. et al. Pilot study into milk haptoglobin as an indicator of udder health in heifers after calving. *Res Vet Sci* 2018; 116: 83-87

72 Eckersall P, Young F, Nolan A. et al. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 2006; 89: 1488-1501

73 Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD. et al. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Funct Integr Genomics* 2010; 10: 21-38
DOI: 10.1007/s10142-009-0133-z.

74 Dalanezi FM, Schmidt E, Joaquim SF. et al. Concentrations of Acute-Phase Proteins in Milk from Cows with Clinical Mastitis Caused by Different Pathogens. *Pathogens* 2020; 9: 706

75 Metzner M, Horber J, Rademacher G. et al. Application of the glutaraldehyde test in cattle. *J Vet Med A* 2007; 54: 449-454

III. MATERIAL UND METHODEN, ERGEBNISSE UND ERGEBNISDISKUSSION – PUBLIKATION II

Nutzung der Haptoglobinkonzentration in Milch als Indikator für das Tiergesundheitsmonitoring bei Milchkühen

Use of milk haptoglobin concentration as an indicator in animal health monitoring of dairy cows

Autorinnen/Autoren

Sarah Plattner¹, Martin Kammer², Emil Walleser³, Stefan Plattner¹, Nicola Panne¹, Christian Baumgartner⁴, Dörte Döpfer³, Rolf Mansfeld¹

Institute

1. Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung,
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München
2. Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung Bayern
e. V., München
3. University of Wisconsin – Madison, School of Veterinary Medicine,
Department of Medical Science, USA
4. ehemals Milchprüfung Bayern e.V., Wolnzach

Schlüsselwörter

Haptoglobin, Zellzahl, Akute-Phase-Protein, Frühlaktation, Herden-
gesundheit

Key words

Haptoglobin, somatic cell count, acute-phase-reaction, early lactation, herd
health

eingereicht 21.02.2023

akzeptiert 10.04.2023

Bibliografie

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2023; 51: 346 – 357

DOI 10.1055/a-2199-1754

ISSN 1434-1220

© 2023, Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14,

70469 Stuttgart, Germany

Korrespondenzadresse

Sarah Plattner

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Sonnenstraße 16, 85764 Oberschleißheim, Deutschland

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand und Ziel: Ziel der vorliegenden Studie war es, die Zusammenhänge zwischen erhöhten Haptoglobin-Konzentrationen in Milch und klinischen sowie labordiagnostischen Parametern bei Kühen in der Frühlaktation zu untersuchen und Grenzwerte für die Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Tieren zu ermitteln.

Material und Methoden: Es wurden 1462 Milchkühe zwischen dem 5. und dem 65. Laktationstag auf 68 bayerischen Betrieben untersucht. Einmal wöchentlich wurden in einem Zeitraum von 7 Wochen je Betrieb Milch- und Blutproben gezogen und neben einer Körperkonditionsbeurteilung auch eine Messung der Rückenfettdicke via Ultraschall und eine vaginale Metrichheck-Untersuchung zur Beurteilung der Uterusgesundheit durchgeführt.

Die Milchproben wurden auf die Parameter MilCHFett, Milcheiweiß, Laktose, Harnstoff, β -Hydroxybutyrat und freie Fettsäuren (indirekte Messung, basierend auf IR-Spektren), Zellzahl und Milch-Haptoglobin untersucht.

Die Blutproben wurden auf die Parameter Kreatinin, Aspartat-Aminotransferase, Gamma-Glutamyl-Transferase, Glutamatdehydrogenase, Gesamtprotein, Albumin, Kreatinkinase, β -Hydroxybutyrat, freie Fettsäuren und Blut-Haptoglobin untersucht.

Für die Bestimmung von Grenzwerten für Haptoglobin wurden Clusteranalysen durchgeführt.

Ergebnisse: Außer Milch-Haptoglobin ($\mu\text{g/ml}$) und Blut-Haptoglobin ($\mu\text{g/ml}$) gingen Zellzahl (Zellen/ml Milch), MilCHFett (%), Milcheiweiß (%), freie Fettsäuren im Blut (mmol/l), Laktationsnummer, Laktationstage, Rasse, Jahreszeit und Tagesmilchmenge (kg) als signifikante Eingangsvariablen ($p < 0,005$) in die Clusteranalysen ein. Unter Verwendung der Algorithmen k-means bzw. k-prototypes ergaben sich 5 (Cluster 1–5 M¹) bzw. 4 verschiedene Cluster (Cluster 0–3 M² und 0–3 B).

Für die Unterscheidung von gesunden und kranken Tieren wurde der Grenzwert 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Haptoglobin in Milch ermittelt.

Schlussfolgerungen und klinische Relevanz: Da Milch ein leicht verfügbares Substrat darstellt, bietet sich die routinemäßige Haptoglobinbestimmung in der Milch als Parameter für das Tiergesundheitsmonitoring an. Mithilfe des ermittelten Grenzwertes können augenscheinlich gesunde Tiere mit subklinisch ablaufenden entzündlichen Prozessen schneller aufgefunden werden.

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to investigate relationships between elevated haptoglobin concentrations in milk and clinical as well as laboratory parameters in early lactating dairy cows. Furthermore, cut-off values should be identified for the differentiation of healthy and affected animals.

Material and methods: 1462 dairy cows between 5.–65. days in milk were examined on 68 Bavarian farms. Milk and blood samples were taken once a week for a 7-week period per farm and body-condition-scoring, backfat

thickness measurement and Metrichcek examination, to evaluate uterine health, were performed. Milk samples were analysed for milk fat, milk protein, lactose, urea, β -hydroxybutyrate and non-esterified fatty acids (indirect measurement, based on IR spectra), cell count, and milk haptoglobin. Blood samples were analysed for creatinine, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, glutamate dehydrogenase, total protein, albumin, creatine kinase, β -hydroxybutyrate, non-esterified fatty acids, and blood haptoglobin.

Cluster analyses were performed to determine cut-off values for haptoglobin.

Results: Besides milk haptoglobin ($\mu\text{g/ml}$) and blood haptoglobin ($\mu\text{g/ml}$), cell count (cells/ml milk), milk fat (%), milk protein (%), non-esterified fatty acids in blood (mmol/l), lactation number, days in milk, breed, season, and milk yield (kg) were included as significant input variables ($p < 0.005$) in the cluster analyses. Cluster analysis, using k-means resp. k-prototypes algorithms, resulted in 5 (clusters 1–5 M¹) resp. 4 different clusters (clusters 0–3 M² and 0–3 B). A cut-off value of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ haptoglobin in milk was determined for the differentiation of healthy and affected animals.

Conclusion and clinical relevance: As milk is an easily available substrate, routine determination of haptoglobin in milk might be a suitable parameter for animal health monitoring. Using the detected cut-off value, apparently healthy animals with subclinical inflammatory diseases can be identified more quickly.

Einführung

Akute-Phase-Proteine dienen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als diagnostische Indikatoren für Entzündungsgeschehen. Beim Rind gilt bovines Haptoglobin (HP) als aussagekräftiges Akute-Phase-Protein [1, 2] und steigt als unspezifischer Biomarker im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen im Blutserum und in der Milch an [2 – 4]. HP bindet freies Hämoglobin aus zerstörten Erythrozyten [2, 4 – 6] und hat laut Jain et al. [7] einen antiinflammatorischen Effekt und bakteriostatische Fähigkeiten.

Der Nachweis von HP erfolgt standardmäßig quantitativ mittels ELISA [8]. Im Blutserum gilt HP laut Hajek et al. [9] ab einem Grenzwert von 0,18 mg/ml als erhöht. Horadagoda et al. [10] definierten HP bei gesunden Tieren als $< 0,35$ mg/ml und stützten ihre Definition auf die HP-Konzentrationen aus Proben augenscheinlich gesunder Tiere verschiedener Rassen und Altersklassen. Erhöhte HP-Konzentrationen im Blutserum wurden im Zusammenhang mit typischen Erkrankungen der Früh-laktation, wie Uteruserkrankungen [11 – 13], Erkrankungen des Bewegungsapparates [14, 15] und Stoffwechselstörungen [16, 17] nachgewiesen. Darüber hinaus ist HP in der postpartalen Phase aufgrund einer, als physiologisch angenommenen, Akute-Phase-Reaktion erhöht [18 – 20] und scheint außerdem zusammenhängend mit Stresssituationen anzusteigen [21]. Während beispielsweise Serum-Amyloid A (SAA) beim Rind zwar ebenfalls ein aussagekräftiges Akute-Phase-Protein ist, steigt SAA aber mehr durch

akute als durch chronische Entzündungszustände an [3]. HP hingegen steigt schnell an und bleibt im Vergleich zu den Konzentrationen anderer APPs über längere Zeit erhöht [22].

Es besteht eine enge Korrelation zwischen HP-Konzentrationen in Blut und Milch [23 – 25]. Außer in der Leber [6] wird HP im Zusammenhang mit Mastitis auch in den Epithelzellen der Milchdrüse und in neutrophilen Granulozyten synthetisiert [26, 27]. Die Konzentrationsunterschiede von HP in Milch bei verschiedenen bakteriell verursachten Euterentzündungen sind Schwerpunkt mehrerer Arbeiten [28 – 31]. Grenzwerte für die Unterscheidung zwischen gesunden und subklinisch bzw. klinisch an Mastitis erkrankten Kühen nach vorliegenden Untersuchungsergebnissen bewegen sich zwischen 2,7 [32] und 12,65 µg/ml [28].

Die Bestimmung von HP in Milch erscheint sinnvoll, da, verglichen mit routinemäßig gewonnenen Milchproben, die Blutprobennahme und die Bestimmung von HP im Serum mit höherem Aufwand und Kosten verbunden sind. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, (1) die Zusammenhänge zwischen erhöhten HP-Konzentrationen in Milch und klinischen sowie labordiagnostischen Parametern bei Kühen in der Früh-laktation zu untersuchen und (2) einen Grenzwert für die Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Tieren zu ermitteln. Der Mehrwert einer routinemäßigen HP-Bestimmung im Rahmen der monatlichen Milchleistungsprüfung oder auch durch automatisierte Melksysteme für das verbesserte Gesundheitsmonitoring bei Milchkühen wird diskutiert.

Material und Methoden

Im Rahmen des Projekts „Untersuchungen zur Nutzung klinischer und labordiagnostischer Parameter für das Energiestoffwechselmonitoring bei Milchkühen“ („MetAlarm“) wurden im Zeitraum von Oktober 2019 bis Februar 2021 die in der vorliegenden Studie verarbeiteten Daten erhoben. „MetAlarm“ ist ein Kooperationsprojekt des Milchprüfings Bayern e.V. (MPR), des Landeskuratoriums der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. (LKV) und der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU). Die Tierversuchsanzeige ROB-55.2-2532.Vet 03-19-12 wurde von der Regierung von Oberbayern, Sachgebiet 55.2, genehmigt.

68 bayerische Betriebe nahmen am Projekt teil und stellten insgesamt 1462 Milchkühe (Fleckvieh, Braunvieh, Holstein Friesian) aus 4 verschiedenen bayerischen Regionen zur Verfügung. Alle teilnehmenden Betriebe hielten ihre Tiere im Laufstall. Es waren sowohl Betriebe mit Automatischem Melksystem (AMS), als auch mit konventionellem Melkstand beteiligt. Nach einem Erstbetriebsbesuch wurden die Tiere in jeweils 6 aufeinander folgenden Wochen einmal wöchentlich (immer am selben Wochentag) untersucht.

Es fanden 9 Durchgänge für die Probennahme und Datenerfassung mit jeweils 6–9 teilnehmenden Betrieben pro Durchgang statt.

Erhobene Daten

Aus der Datenbank des LKV Bayern e.V. wurden jeweils vor dem Betriebsbesuch Ohrmarkennummer, Laktationstag und Laktationsnummer der zu untersuchenden Tiere automatisiert bereitgestellt.

Laktierende Tiere vom 5. bis zum 65. Tag post partum wurden einer Milchprobenentnahme, einer Blutprobenentnahme an der V. coccygea mediana und einer vaginalen Metrichk (Simcro TM Datamars, Hamilton, NZL) Untersuchung (Befundschlüssel: 0 = klarer Schleim, 1 = einzelne Eiterflocken, 2 = Eiterflocken < 50 %, 3 = Eiterflocken > 50 %, 4 = Blut) für die Beurteilung der Uterusgesundheit unterzogen. Außerdem wurde bei jeder Kuh der Body-Condition-Score erhoben und die Rückenfettdicke mittels Ultraschalls gemessen.

Die Milchprobennahme wurde bei den zu untersuchenden Tieren in einem alternierenden Rhythmus (abwechselnd am Vorabend und am Morgen des Betriebsbesuchs) vom Betriebsleiter durchgeführt, um eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse durch Stress oder Einflüsse der Tageszeit zu vermeiden. In Betrieben mit Melkstand wurde dafür der LactoCorder (WMB AG, Balgach, CH) verwendet, während AMS-Betriebe ein für die Studie bereitgestelltes Probenahme-Shuttle (Typ Ori Collector Version Light SD, Sans Systeme Doseur, Alcalá de Henales, ESP) nutzten.

Milchprobenuntersuchung

Die Milchprobengewinnung erfolgte nach demselben Schema wie die reguläre Probenahme im Rahmen der Milchleistungsprüfung.

Aus dem Gesamtgemelk jeder Kuh wurde eine Milchprobe in ein Milchprobengefäß (Typ 6845-xx, 50 ml, Bartec Benke GmbH, Reinbek/Hamburg, DE) überführt, in dem 0,1 ml Konservierungsmittel enthalten waren.

Die Milchprobenuntersuchung fand im Labor des Milchprüfung Bayern e.V. in Wolnzach nach einem gekühlten Transport bei 2–8 °C statt. Mittels Infrarot-Spektroskopie am IR-Spektrometer MilkoScan 7 RM (FOSS GmbH, Hamburg, DE) wurde eine Untersuchung der Milchprobe auf die Parameter Milchfett, Milcheiweiß, Laktose und Harnstoff durchgeführt. Basierend auf den IR-Spektren erfolgte außerdem eine indirekte Bestimmung von BHB und NEFA-Konzentrationen. Die somatische Zellzahl (SCC) wurde mittels Fossomatic™ FC (FOSS GmbH, Hamburg, DE) bestimmt. Außerdem wurde die Tagesmilchmenge im Rahmen des Probemelkens erhoben.

Für den quantitativen Nachweis von Haptoglobin in Milch (mHP) wurde ein Sandwich-ELISA (ePro Test, Firma FrimTec GmbH, Oberostendorf, DE) eingesetzt. Der für die Bestimmung von HP in Milch genutzte ELISA hat einen Messbereich von 0–300 ng/ml. Die Mikrotiterplatten sind mit polyklonalen Antikörpern beschichtet, die bovines Hp binden. Die Proben wurden auf die Testplatte übertragen und mittels Probenverdünnungspuffer vorverdünnt, um eine Messung im linearen Bereich zu ermöglichen. Nach einer 30-minütigen Inkubation erfolgten 3 Waschungen mit vorverdünnter Waschlösung. Nach Zugabe des Enzymkonjugats wurde die Platte für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach 3 weiteren Waschungen wurde das

Chromogen hinzugefügt. Nach dem Stopp der Farbreaktion mittels Stopplösung wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen.

Blutprobenuntersuchung

Je Kuh wurden 8,5 ml Blut in einen Probenbehälter (BD-Serum-Gel Vacutainer, SST 2 Advanced von Becton, Dickinson and Company, Plymouth, UK) überführt und ca. 30 Minuten nach der Entnahme auf dem jeweiligen Versuchsbetrieb bei 2300 G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Transport in das Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU erfolgte gekühlt bei 2–8 °C.

Dort wurden die Parameter Creatinin, Aspartat-Aminotransferase (AST), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Gesamtprotein, Albumin, Creatinkinase (CK), BHB und NEFA mittels Cobas C311 Analyser for clinical chemistry ® (Hersteller: Roche Diagnostics, CH) untersucht.

Für den quantitativen Nachweis von HP in Blut (bHP) wurde ein Sandwich-ELISA (Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, BEL) eingesetzt. Bis zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden die Proben bei –20 °C gelagert. Der für die Bestimmung von HP in Blut genutzte ELISA hat einen Messbereich von 5,6–360 ng/ml. Die Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen Antikörpern beschichtet, die bovines Hp binden. Die Proben wurden auf die Testplatte übertragen und mittels Probenverdünnungspuffer vorverdünnt, um eine Messung im linearen Bereich zu ermöglichen. Nach einer 1-stündigen Inkubation und einer anschließenden Waschung mit vorverdünnter Waschlösung, erfolgte eine weitere 1-stündige Inkubation mit dem Konjugat. Nach einer erneuten Waschung wurde das Chromogen Tetramethylbenzidine hinzugefügt. Nach dem Stopp der Farbreaktion mittels Stopplösung wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen.

Datensatz

Der Gesamtdatensatz umfasste 6554 Blutproben von trockenstehenden und laktierenden Kühen. Wenn mehrere Milchproben passend zu einer Blutprobe vorhanden waren, wurde die Milchprobe anhand des Datums der Blutproben ausgewählt. Mit erster Priorität wurden dabei die Milchproben mit Datierung vom Vortag der Blutprobennahme berücksichtigt. Zweite Priorität hatten Milchproben mit Datierung vom Tag der Blutprobennahme. Waren mehrere Milchproben am selben Tag vorhanden, wurden die Analyseergebnisse aus der Milchleistungsprüfung, gewichtet nach den Milchmengen der Einzelproben, gemittelt.

Im Datensatz waren Proben von laktierenden Kühen der Rassen Fleckvieh, Braunvieh und Holstein vom 5. bis zum 65. Tag in Milch enthalten. Voraussetzung für die Aufnahme in den Datensatz war das Vorhandensein eines Messergebnisses für Haptoglobin in Milch (mHP) und der weiteren Analyse-Variablen. Es verblieben 3950 Proben, von denen für 3937 Proben ein Untersuchungsergebnis für Haptoglobin in Blut (bHP) vorlag.

Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme R v3.6.3 [33] und Python v3.8.5 [34] verwendet.

Beschreibende Modelle

Für die Auswertung des Datensatzes wurde ein lineares Modell mit einem linearen gemischten Modell mit Kuh als zufälligem Effekt verglichen. Da einige Variablen nicht normalverteilt waren, wurden für die Modelle die Zellzahl pro ml Milch (Zellzahl) und die Haptoglobin-Konzentrationen in Milch (mHp) logarithmiert. Die Laktationszahl wurde in 2 Klassen (Erst- und Höherlaktierende) ausgewertet.

Die in den Modellen berücksichtigten Variablen waren die logarithmierte Zellzahl in Milch (logSCC), der prozentuale MilCHFettgehalt, der prozentuale Milcheiweißgehalt, der Laktosegehalt, die Tagesmilchmenge, die Laktationsnummer (1. Laktation und höher), der Laktationstag, die Jahreszeit der Probennahme (Winter: Dezember–Februar, Frühling: März Mai, Sommer: Juni–August, Herbst: September–November), der Metricheck-Befund (0–4), die Konzentration an freien Fettsäuren (NEFA) im Blut, β -Hydroxybutyrat (BHBA) im Blut und Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Blut.

Die Berücksichtigung der Kuh als zufälligem Effekt verbesserte das Modell deutlich, daher wurde die lineare gemischte Regression mit zufälligem Effekt für die Auswertung gewählt. Die p-Werte wurden über eine Typ III ANOVA mit dem Wald-Test ermittelt.

Clusteranalysen

Die Clusteranalyse ist ein statistisches Gruppenbildungsverfahren, das ähnliche Objekte innerhalb eines Datensatzes zu Gruppen zusammenfasst. Aus einer heterogenen Gesamtheit sollen möglichst homogene Teilmengen identifiziert werden. Die dabei entstandenen Gruppen werden als „Cluster“ bezeichnet. Als Cluster-Algorithmen wurden k-means [35] und k-prototypes [36] eingesetzt. K-means ist ein gängiges Clustering-Verfahren für die Verarbeitung von numerischen Variablen (z. B. gemessene HP-Konzentrationen). Die Methode ist aber weniger geeignet für Daten, die neben numerischen auch kategoriale Variablen (z. B. Rasse, Jahreszeit) enthalten. Daher erfolgte ein zweiter Ansatz mit k-prototypes, einem Algorithmus, der sowohl numerische als auch kategoriale Variablen verarbeitet und sich somit besser für gemischte Datentypen, wie die in der vorliegenden Studie erhobenen Parameter, eignet.

Es wurden nur die signifikanten Variablen ($\geq 95\%$) aus dem gemischten Modell mit Kuh als zufälligem Effekt für die Clusteranalyse verwendet. Vor der Durchführung der Clusteranalyse mit k-means wurden kategoriale Variablen in numerische Variablen umgewandelt und standardisiert. Anschließend wurden die Variablen mit einer Primärkomponentenanalyse (PCA) transformiert. Die ersten 3 Hauptkomponenten gingen in die Clusteranalyse ein.

Um die Anzahl Cluster, die die Daten am besten beschreibt, zu bestimmen, wurde die Clusteranalyse mit 2 bis 10 Clustern durchgeführt und die Anzahl Cluster mit dem höchsten Wert des Simple Structure Index (SSI) gewählt. Nach dem SSI ergaben sich bei einer Clusteranalyse mit 3 Hauptkomponenten als Eingangsvariablen 5 Cluster (k-means) bzw. 4 Cluster (k-prototypes). Auch einige nichtsignifikante Variablen aus dem gemischten Modell mit Kuheffekt wurden in der Clusteransicht dargestellt (Blut-BHB, Laktosegehalt, Metrichheck-Befund).

Für den Vergleich der Cluster, die unter Verwendung von k-prototypes entstanden, erfolgte die Berechnung linearer Kontraste.

Ergebnisse

Tab. 1: Übersichtstabelle deskriptive Statistik

Tab. 1: Summary table descriptive statistics

Parameter	Anzahl Proben	Mittelwert	Standardabweichung	Median	25 % Perzentil	75 % Perzentil	Minimum	Maximum
Haptoglobin Blut µg/ml	3937	64,3	± 609,7	0,2	0,14	1,2	0,1	19439,8
Zellzahl 1000/ml Milch	3950	197,4	± 618,5	41	19,4	117	10	9999
Metrichheck Score 0-4	3950	0,7	± 1,2	0	0	1	0	4
Milchfett %	3950	4,3	± 0,9	4,1	3,7	4,7	0,5	13,1
Milchweiß %	3950	3,3	± 0,3	3,2	3,1	3,5	2,2	4,9
Milchlaktose %	3950	4,9	± 0,2	4,8	4,7	5	3,9	5,4
Blut NEFA ¹ mmol/l	3950	0,3	± 0,2	0,2	0,1	0,3	0,02	1,9
Blut BHBA ² mmol/l	3950	0,8	± 0,4	0,7	0,5	0,9	0,01	7,4
Blut GLDH ³ U/l	3950	17,1	± 25,2	11,5	8,3	17,5	1,2	810,1
Laktationstag	3950	36,2	± 17,0	37	22	51	5	65
Milchmenge Kg	3950	33,0	± 8,3	33,1	27,5	38,4	3,8	75,9
Haptoglobin Milch µg/ml	3950	0,3	± 0,4	0,094	0,094	0,4	0,01	2
Laktationszahl	3950	3,1	± 2,0	3	1	4	1	12

¹Freie Fettsäuren / Nonesterified fatty acids

²Beta-Hydroxybutyrat / Beta-Hydroxybutyrate

³Glutamatdehydrogenase / glutamatdehydrogenase

Der finale Datensatz umfasste 3950 Proben laktierender Kühe. Die Tiere befanden sich durchschnittlich an Tag 36,2 in der Laktation und gaben 33 l Milch ($\pm 8,3$ l) pro Tag. Der Mittelwert für bHp lag bei 64,3 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 609,7$ $\mu\text{g/ml}$), während der Mittelwert für mHp 0,3 $\mu\text{g/ml}$ ($\pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$) betrug. Pro ml Milch waren 197.000 Zellen das Mittel (± 618.500 Zellen/ml Milch). Eine Übersicht der Daten ist in  Tab. 1 dargestellt.

Verglichen mit einem linearen Modell (R^2 : 0,54, Root Mean Square Error (RMSE) 0,33), waren einige der Variablen (Metricheck-Befund, Laktosegehalt, Blut-BHB) im linearen gemischten Modell ( Tab. 2) nicht mehr signifikant. Der Einfluss der Kuh als zufälligem Effekt verbesserte das Modell deutlich (R^2 : 0,71, RMSE 0,25) und ermöglichte außerdem die Berücksichtigung Kuh-individueller Unterschiede.

Tab. 2: Lineares gemischtes Modell mit Kuh als zufälligem Effekt (R^2 : 0,71, RMSE 0,25), Y = logarithmiertes Haptoglobin Milch

Tab. 2: linear mixed model with cow as random intercept (R^2 : 0,71, RMSE 0,25), Y = logarithmic milk haptoglobin

Parameter	p-Werte
(Intercept)	<0.00001
Zellzahl (log)	<0.00001
Metricheck Befund	0,1194
Milchfett	<0.00001
Milcheiweiß	<0.00001
Laktose	0,1242
NEFA ¹ (Blut)	0,0006
BHBA ² (Blut)	0,2893
GLDH ³ (Blut)	0,9276
Laktationszahl	<0.00001
Rasse	0,0006
Tage in Milch	<0.00001
Milchmenge	0,0037
Jahreszeit	0,0290

¹Freie Fettsäuren / Nonesterified fatty acids

²Beta-Hydroxybutyrat / Beta-Hydroxybutyrate

³Glutamatdehydrogenase / glutamatdehydrogenase

Clusteranalyse mit k-means

Die signifikanten Variablen (≥ 95 %) aus dem gemischten Modell mit Kuh als zufälligem Effekt wurden als Eingangsdaten für die Clusteranalyse verwendet. Die Ergebnisse wurden zur Bestimmung von Grenzwerten für die Klassifizierung von erhöhtem mHp verwendet.

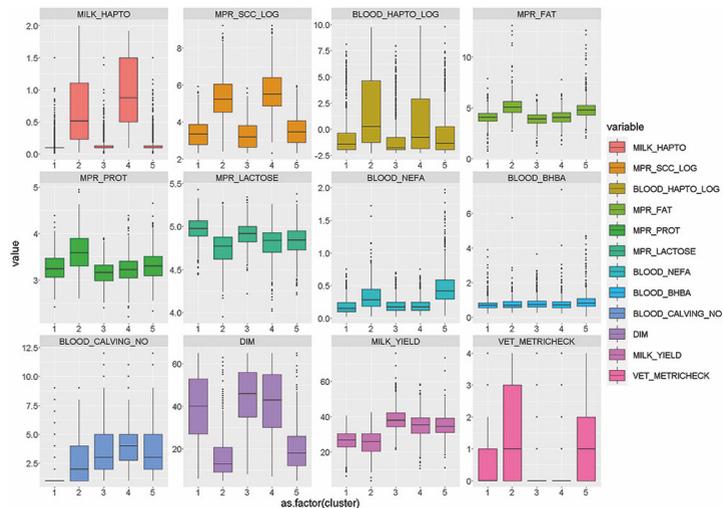
Die deskriptive Beschreibung der Ergebnisse aus den mHp-Clustern ist in  Tab. 3 zu finden. Cluster aus dem K-means-Ansatz wurden mit #M¹ für Milchhaptoglobin-Clustering gekennzeichnet ( Abb. 1).

Abb. 1: Ergebnisse der Clusteranalysen M¹ (logarithmiertes Milch Haptoglobin und signifikante Variablen aus dem gemischten linearen Modell):

x-Achse: Cluster 1-5; y-Achse: Milch-Haptoglobin (µg/ml), Zellzahl logarithmiert (x 1000 Zellen/ml Milch), Blut-Haptoglobin logarithmiert (µg/ml), Milchfett (%), Milcheiweiß (%), Laktose (%), NEFA-Konzentration im Blut (mmol/l), BHB-Konzentration im Blut (mmol/l), Laktationsnummer, Laktationstage, Milchmenge (kg), Metrichcek-Befund (1-4)

Fig. 1: Clustering results M¹ (logarithmic milk haptoglobin and significant variables from the linear mixed model):

x-axis: Cluster 1-5; y-axis: milk-Haptoglobin (µg/ml), somatic cell count logarithmic (x 1000 cells/ml milk), Blood-Haptoglobin logarithmic (µg/ml), milkfat (%), milk protein (%), lactose (%), NEFA-concentration blood (mmol/l), BHB-concentration blood (mmol/l), calving number, days in milk, milk yield (kg), Metrichcek-Score (1-4)



Quelle / source: © M. Kammer, S. Plattner

Cluster 2M¹ und 4M¹ wiesen höhere mHp-Werte (Median: 0,51 bzw. 0,87 µg/ml) als die anderen 3 Cluster auf. Cluster 2M¹ wurde darüber hinaus durch hohe bHp-Werte, geringgradig erhöhte NEFA-Werte im Blut (Median: 0,28 mmol/l), einen erhöhten Fettgehalt der Milch (Median: 5,05 %) und einen geringeren Abstand zur Kalbung (Median: 13 Laktationstage) charakterisiert. Der Metrichcek-Befund in Cluster 2M¹ war im Vergleich zu den anderen Clustern erhöht.

In Cluster 4M¹ gingen die erhöhten mHp-Werte mit höheren Zellzahlen (Median: 248.500 Zellen/ml Milch) und ebenfalls mit erhöhtem bHp einher. Tiere aus Cluster 4M¹ waren darüber hinaus mit 4 Laktationen im Median

die ältesten Kühe und waren im Laktationsverlauf schon weiter fortgeschritten (Median: 43 Laktationstage) als die Tiere aus Cluster 2M¹. In Cluster 1M¹ waren primär junge Tiere in der ersten Laktation zu finden, die keine sonstigen Auffälligkeiten hinsichtlich der untersuchten Parameter aufwiesen.

Gleiches galt für die Kühe aus Cluster 3M¹, die den größten zeitlichen Abstand zur Abkalbung (Median: 46 Laktationstage) hatten und die höchste Leistung erbrachten (Median: Tagesmilchmenge 35,2 kg).

Tiere aus Cluster 5M¹ standen am Anfang der Laktationsperiode (Median: 18 Laktationstage) und hatten neben einem positiven Metrichheck-Befund (Median: Metrichheck-Befund 1) auch die höchsten NEFA-Werte im Blut (Median: 0,42 µg/ml).

Die auf mHp basierende Clusteranalyse mit k-means ermöglichte die Bildung fünf verschiedener Kuhgruppen anhand von Tiermerkmalen und Untersuchungsergebnissen von Blut und Milch.

Auf Grundlage der Clustering-Ergebnisse wurden Grenzwerte für die Klassifizierung von erhöhtem mHp bei 0,23 (unteres Quartil Box-Plot Cluster 2M¹) und 0,50 µg/ml (unteres Quartil Box-Plot Cluster 4 M¹) festgelegt.

Tab. 3: Deskriptive Statistik der Clusteranalyse mit k-means für Milhhaptoglobin: Clustering von Milchproben (n = 3937) mit Kuhinformationen und Milhhaptoglobinwerten.

Tab. 3: Descriptive statistics of milk haptoglobin k-means clustering: Clustering of milk samples (n = 3937) with cow information and milk haptoglobin levels.

Milch Haptoglobin Cluster					
	1M ¹	2M ¹	3M ¹	4M ¹	5M ¹
Klinisches Attribut	Jung- kühe	Neg. Energiebilanz	Hoch- leistend	Euter- krank	Frisch- laktierend
Anzahl Proben N	982	382	1180	740	666
Laktationsnummer	1	2	3	4	3
(Median)					
IQR	0	3	3	2,5	3
DIM¹	40	13	46	43	18
(Median)					
IQR²	26	12	21	25	14
Milchmenge kg	26,9	25,9	38	35,3	34,6
(Median)					
IQR	7,7	9,9	7,9	8,85	8,21
Milchfett %	4,08	5,05	3,88	4,02	4,76
(Median)					
IQR	0,79	1,11	0,86	0,895	0,94

Milcheiweiß %	3,24	3,59	3,16	3,22	3,3
(Median)					
IQR	0,415	0,6	0,34	0,37	0,42
Milch Laktose %	4,98	4,77	4,92	4,84	4,84
(Median)					
IQR	0,18	0,26	0,18	0,23	0,22
Somatische Zellzahl	28	187	24	248,5	32
(Median)					
IQR	32	338	31	474,5	40
Milch Haptoglobin	0,094	0,513	0,094	0,878	0,094
µg/ml (Median)					
IQR	0	0,879	0,035	0,997	0,034
Blut Haptoglobin	0,23	1,27	0,17	0,46	0,25
µg/ml (Median)					
IQR	0,560	100,63	0,314	18,088	1,158
Blut NEFA³ mmol/l	0,15	0,28	0,17	0,17	0,42
(Median)					
IQR	0,14	0,27	0,13	0,13	0,3
Blut BHBA⁴ mmol/l	0,68	0,69	0,73	0,7	0,815
(Median)					
IQR	0,23	0,36	0,34	0,345	0,45
Metricheck-Befund	0	1	0	0	1
1-4 (Median)					
IQR	1	3	0	0	2

¹Laktationstage / Days in milk

²Interquartilsabstand / Interquartile range

³Freie Fettsäuren / Nonesterified fatty acids

⁴Beta-Hydroxybutyrat / Beta-Hydroxybutyrate

Clusteranalyse mit k-prototypes

Nach der Ergebnisauswertung des ersten Clusterings unter Verwendung von k-means wurde ein weiterer Clustering-Ansatz mit k-prototypes durchgeführt, für den nur Eingabedaten auf Grundlage von einem Messergebnis pro Kuh verarbeitet wurden.

Die deskriptive Beschreibung der Ergebnisse des bHp- und mHp- Clusterings ist in  **Tab. 4** zu finden. Lineare Kontraste sind in  **Tab. 5** aufgeführt. Cluster aus dem k-prototypes-Ansatz wurden mit #B für das Bluthaptoglobin und #M² für das Milchlaptoglobin-Clustering gekennzeichnet.

Bei Anwendung des k-prototypes-Clustering-Algorithmus und der „elbow method“ auf die Eingabedaten (Laktationstag, Milchleistung, Milchfett, Milchprotein, Laktationsnummer, Rasse, Jahreszeit) mit logarithmiertem mHp wurden 4 Cluster identifiziert.

Cluster 3M² hatte die höchsten Mittelwerte für mHp-, bHp und Zellzahlen. Darüber hinaus wurde in Cluster 3M² durch lineare Kontraste signifikant

höheres logarithmiertes mHp als in allen anderen Clustern ermittelt. Tiere aus Cluster 2M² hatten im Vergleich zu den anderen Clustern signifikant höhere NEFA-Konzentrationen im Blut und einen höheren Milchfettgehalt. Niedrige Zellzahlen (Mittelwert: 70,37, SD: 257,26), mehr Laktationstage (Median: 47, IQR: 20), eine hohe Milchleistung (Mittelwert: 36,04, SD: 7,93) und niedrigere Hp-Werte in Blut und Milch charakterisierten Cluster 1M². Cluster 2M² wies höhere mHp-Konzentrationen als Cluster 1M² auf, während sich logarithmiertes bHp nicht signifikant unterschied.

Die Clusteranalyse mit k-prototypes ermöglichte die Bildung 4 verschiedener Kuhgruppen anhand von Tiermerkmalen und Untersuchungsergebnissen von Blut und Milch. Auf Grundlage der Clustering-Ergebnisse wurden Grenzwerte für die Klassifizierung von erhöhtem mHp bei 0,23 und 0,50 µg/ml festgelegt. Dieselben Grenzwerte wurden im Clustering-Ansatz mit k-means identifiziert.

Die Eingangsdaten für das bHp-Clustering waren Laktationstage, Milchleistung, Milchfett, Milchprotein, Laktationsnummer, Rasse, Jahreszeit und die logarithmierte Zellzahl. Vier Cluster wurden als optimale Anzahl ausgewählt. bHp unterschied sich signifikant zwischen allen Clustern außer zwischen 0B und 1B. Cluster 2B hatte signifikant höhere Werte für bHp, mHp und SCC als alle anderen Cluster. Darüber hinaus war die Milchleistung von Tieren aus Cluster 2B niedriger als bei allen anderen Clustern mit Ausnahme von Cluster 1B. Kühe aus Cluster 3B hatten die wenigsten Laktationstage mit einem Median von 15 Tagen und signifikant erhöhte Milchfett- sowie NEFA-Werte.

Cluster	Blut Haptoglobin Cluster				Milch Haptoglobin Cluster			
	0B	1B	2B	3B	0M ²	1M ²	2M ²	3M ²
Klinisches Attribut	Un-auffällig	Un-auffällig	Euter-krank	Neg. Energie-bilanz	Un-auffällig	Hoch-leistend	Neg. Energie-bilanz	Euter-krank
N	525	443	167	231	473	477	201	215
DIM¹ (median) (IQR)²	47 20	16 9	23 24	15 8	16 11	47 20	15 9	25 28
Laktationszahl (median) (IQR)	3 3	2 3	3 4	3 3	2 3	3 2	3 3	4 3
Milchmenge (kg) SD³	35.07 7.78	28.59 6.75	29.48 8.77	36.12 8.11	28.72 6.79	36.04 7.93	33.89 8.3	31.44 8.58
Milchweiß (%) SD	3.16 0.25	3.5 0.27	3.27 0.31	3.25 0.29	3.47 0.28	3.15 0.24	3.23 0.3	3.31 0.32
Milchfett (%) SD	4.02 0.67	4.32 0.74	4.77 1.11	4.99 1.36	4.36 0.72	4.01 0.66	5.32 1.48	4.33 0.88
Somatische Zellzahl (x1000) SD	97.59 192.88	144.48 379.59	806.64 1343.4	92.2 197.5	82.36 260.84	70.37 257.26	116.64 279.66	815.27 1156.33
Blut Haptoglobin (µg/ml) SD	2.65 20.15	1.67 6.83	325.68 412.11	3.91 17.39	23.45 180.62	13.73 70.21	67.59 227.44	121.85 252.72
Milch Haptoglobin (µg/ml) SD	0.29 0.38	0.29 0.41	0.85 0.54	0.26 0.37	0.15 0.13	0.18 0.18	0.29 0.36	1.25 0.29
Blut NEFA⁴ (mmol/l) SD	0.19 0.1	0.22 0.11	0.31 0.21	0.58 0.27	0.23 0.11	0.2 0.11	0.63 0.28	0.24 0.14

Tab. 4: Deskriptive Statistik der Clusteranalyse mit k-prototypes für Milch- und Bluthaptoglobin: Clustering von Milchproben (n = 1366) mit Kuhinformationen und Blut- oder Milchhaptoglobinwerten.

Tab. 4: Descriptive statistics of milk and blood haptoglobin k-prototypes clustering: Clustering of milk samples (n = 1366) with cow information and blood or milk haptoglobin levels.

¹Laktationstage / Days in milk

²Interquartilsabstand / Interquartile range

³Standardabweichung / Standard deviation

⁴Freie Fettsäuren / Nonesterified fatty acids

Blut Haptoglobin Kontraste							
Variable	Kontraste	0 – 1	0 – 2	0 – 3	1 – 2	1 – 3	2 – 3
Laktationstag	estimate	26	18.19	27.28	-7.81	1.28	9.09
	p-Wert	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	0.51021	<0.00001
Milchmenge (kg)	estimate	5.88	5.23	-0.62	-0.65	-6.5	-5.86
	p-Wert	<0.00001	<0.00001	0.6643	0.73385	<0.00001	<0.00001
Milchfett (%)	estimate	-0.27	-0.7	-0.92	-0.42	-0.65	-0.22
	p-Wert	0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	0.06491
Milcheiweiß (%)	estimate	-0.32	-0.11	-0.08	0.22	0.24	0.03
	p-Wert	<0.00001	0.00003	0.00047	<0.00001	<0.00001	0.76386
Log Zellzahl (x1000)	estimate	-0.2	-1.59	-0.06	-1.39	0.14	1.53
	p-Wert	0.07221	<0.00001	0.93992	<0.00001	0.5202	<0.00001
Log Milch Haptoglobin (µg/ml)	estimate	0	-0.34	0.02	-0.35	0.01	0.36
	p-Wert	0.99093	<0.00001	0.7718	<0.00001	0.89798	<0.00001
Log Blut Haptoglobin (µg/ml)	estimate	0	-4.64	-0.18	-4.64	-0.18	4.46
	p-Wert	1	<0.00001	0.02674	<0.00001	0.03398	<0.00001
NEFA ¹ (µg/ml)	estimate	-0.04	-0.12	-0.38	-0.08	-0.34	-0.26
	p-Wert	0.00229	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001

Milch Haptoglobin Kontraste							
Variable	Kontraste	0 – 1	0 – 2	0 – 3	1 – 2	1 – 3	2 – 3
Laktationstag	estimate	-25.28	1.13	-10.77	26.41	14.51	-11.9
	p-Wert	<0.00001	0.69361	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001
Milchmenge (kg)	estimate	-6.64	-4.55	-2.56	2.09	4.08	1.99
	p-Wert	<0.00001	<0.00001	0.00005	0.00219	<0.00001	0.02069
Milchfett (%)	estimate	0.31	-0.94	0	-1.25	-0.31	0.95
	p-Wert	<0.00001	<0.00001	0.99998	<0.00001	0.00009	<0.00001
Milcheiweiß (%)	estimate	0.31	0.23	0.15	-0.08	-0.16	-0.08
	p-Wert	<0.00001	<0.00001	<0.00001	0.00159	<0.00001	0.00617
Log Zellzahl (x1000)	estimate	0.08	-0.3	-2.23	-0.37	-2.31	-1.94
	p-Wert	0.69705	0.00592	<0.00001	0.00022	<0.00001	<0.00001
Log Milch Haptoglobin (µg/ml)	estimate	-0.03	-0.09	-0.67	-0.07	-0.64	-0.57
	p-Wert	0.03522	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001
Log Blut Haptoglobin (µg/ml)	estimate	0.04	-0.6	-1.54	-0.64	-1.57	-0.93
	p-Wert	0.98312	0.00007	<0.00001	0.00002	<0.00001	<0.00001
NEFA (µg/ml)	estimate	0.04	-0.38	0	-0.42	-0.04	0.38
	p-Wert	0.00004	<0.00001	0.99854	<0.00001	0.00343	<0.00001

Tab. 5: Lineare Kontraste für Milch- und Bluthaptoglobin: Clustering von Milchproben (n = 1366) mit Kuhinformationen und Haptoglobinwerten in Blut oder in Milch. Clusterkontraste wurden unter Verwendung des

Clusters als erklärender Variable und dem Betrieb als zufälligem Effekt berechnet.

Tab. 5: Milk and blood haptoglobin linear contrasts: Clustering of milk samples from German dairy cows ($n = 1366$) with cow information and blood or milk haptoglobin levels. Cluster contrasts were computed using cluster as the explanatory variable and using a random intercept for farm ID.

¹Freie Fettsäuren - Nonesterified fatty acids

Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, klinische und labordiagnostische Parameter zu identifizieren, die mit erhöhtem Haptoglobin in Blut und Milch bei Kühen in der Früh-laktation in Zusammenhang stehen. Darüber hinaus sollte ein Grenzwert für Haptoglobin in Milch zur Unterscheidung von gesunden und kranken Tieren ermittelt werden. Für die Bearbeitung der Fragestellungen wurden Clusteranalysen durchgeführt, die eine Gruppierung von Kühen mit bestimmten Merkmalen ermöglichten. Bei einem Vergleich der Cluster wurden auffällige Gruppen anhand erhöhter Hp-Konzentrationen identifiziert. Anhand der Kombination von Hp mit anderen Parametern konnte auf den Gesundheitszustand der Tiere in den jeweiligen Clustern rückgeschlossen werden.

Die Dimensionen von bHp fallen im Vergleich zu anderen Studien niedrig aus. Der Median des gesamten Datensatzes beträgt $0,2 \mu\text{g/ml}$ bHp, während der Mittelwert des Datensatzes bei $64,3 \mu\text{g/ml}$ ($\pm 609,7 \mu\text{g/ml}$) bHp liegt. Die große Standardabweichung kann mit dem schnellen Anstieg von Hp um das 100- bis 1000-fache der Ausgangskonzentration im Rahmen von Entzündungsreaktionen [3] erklärt werden. Huzzey et al. [13] definierten die Hp-Konzentration im Serum gesunder Tiere als $< 100 \mu\text{g/ml}$, während Chan et al. [11] bei klinisch gesunden Kühen in Woche 3 nach der Kalbung Werte von $86 \pm 73 \mu\text{g/ml}$ nachwiesen. Eine mögliche Ursache für die niedrigen Messwerte könnte der geringe Anteil kranker Tiere in der Studienpopulation sein.

Die Cluster 2B, $2M^1$, $2M^2$, $4M^1$ und $3M^2$ wiesen neben erhöhtem bHp auch erhöhtes mHp auf. Dieser Zusammenhang steht im Einklang mit den Arbeiten anderer Autoren, in denen Korrelationen zwischen Haptoglobin in Milch und Blut nachgewiesen wurden [23 – 25].

Kühe aus Cluster $2M^1$ und $2M^2$ hatten, neben erhöhten mHp und bHp-Werten, den geringsten Abstand zur Kalbung mit nur wenigen Laktationstagen. Auch Tiere aus Cluster 3B befanden sich am Anfang der Laktation, wiesen bei erhöhtem bHp aber nur niedrige mHp-Konzentrationen auf. In allen 3 frischlaktierenden Gruppen waren der Fettgehalt in der Milch und die NEFA-Konzentrationen im Serum erhöht, was auf vermehrte Fettmobilisierung nach der Kalbung und eine damit verbundene negative Energiebilanz schließen lässt. Die Anzahl der Laktationstage, der Milchfettgehalt und die NEFA-Konzentration im Blut gingen bereits als

signifikante Variablen ($p < 0,005$) aus dem gemischten linearen Modell mit Kuheffekt für Hp in Milch hervor. Eine positive Korrelation zwischen der NEFA-Konzentration im Blut und bHp wurde auch von Hajek et al. [9] und El-Deeb et al. [16] nachgewiesen. Die gemeinsame Gruppierung von frischlaktierenden Tieren mit negativer Energiebilanz und gleichzeitig erhöhten Hp-Konzentrationen in der vorliegenden Untersuchung deutet darauf hin, dass die zunehmende Lipidmobilisation und die Fettsäureoxidation in der Zeit nach der Kalbung Entzündungszustände fördern, wie auch bereits von anderen Autoren geschlussfolgert wurde [9, 16].

Des Weiteren geht aber auch die Kalbung an sich mit erhöhten Hp-Konzentrationen einher [18 – 20, 37]. Humblet et al. [20] beschrieben signifikante Spitzenwerte für Hp im Serum ($p < 0,0001$) sowohl bei Kühen mit diagnostiziertem Entzündungsgeschehen als auch bei gesunden Kühen innerhalb der ersten Woche nach der Kalbung. Auch mHp im Gesamtgemelk sinkt laut Thomas et al. [37] erst innerhalb von 3–5 Tagen post partum wieder ab. Um einer starken Beeinflussung der Hp-Konzentrationen durch die Kalbung vorzubeugen, wurden die Tiere in der vorliegenden Studie erst ab dem 5. Laktationstag untersucht und beprobt. Ein Einfluss der im Rahmen der Kalbung ablaufenden physiologischen Akute-Phase-Reaktion auf die Hp-Konzentrationen der frischlaktierenden Tiere aus den Clustern 3B, 2M¹ und 2M² kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Hp mit der fortschreitenden Uterusinvolution [12] sowie Metritis [11, 13] zusammenhängt. Um den Einfluss von Uteruserkrankungen auf die Hp-Konzentrationen zu berücksichtigen, wurde bei der Studienpopulation eine vaginale Untersuchung mittels Metricheck durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schmitt et al. [38] stellte sich der Metricheck-Befund als nicht signifikante Variable heraus. Begründet werden können die voneinander abweichenden Ergebnisse damit, dass als klinisch krank erkannte oder behandelte Kühe vom Probemelken auf den Betrieben ausgeschlossen wurden und somit keine Aufnahme in den Datensatz fanden. Die frischlaktierenden Kühe aus Cluster 2M¹ hatten dennoch im Median einen Metricheck-Befund von 1, was einzelnen Eiterflocken im Uterussekret entspricht und zumindest als Hinweis auf eine geringgradige Beeinträchtigung der Uterusgesundheit interpretiert werden kann.

Als Ursachen für die erhöhten Hp-Konzentrationen der frischlaktierenden Kühe aus Cluster 3B, 2M¹ und 2M² können der geringe zeitliche Abstand zur Kalbung sowie die vermehrte Stoffwechselbelastung aufgrund von negativer Energiebilanz vermutet werden.

Kühe aus den Clustern 2B, 4M¹ und 3M² wiesen die höchsten mHp-Werte und die höchsten Zellzahlen aller Cluster auf. Die Zellzahl ging als eine der signifikanten Eingangsvariablen ($p < 0,005$) in die Clusteranalysen ein. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, in denen signifikante Zusammenhänge zwischen der Zellzahl und erhöhtem Haptoglobin in Milch nachgewiesen wurden [23, 25, 27, 32, 39].

Der Mittelwert für mHp aus Cluster 3M² von 1,25 µg/ml (Standardabweichung 0,29) hat eine ähnliche Größenordnung wie die mHp-Konzentrationen aus einer Studie von 2007 [39]. Akerstedt et al. [39] untersuchten ebenfalls das Gesamtgemelk von Tieren ohne klinische Entzündungsanzeichen auf erhöhte Hp-Konzentrationen. Bei einer Hp-Konzentration von 1,5 µg/ml in Milch (Median) wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen mHp und der Zellzahl ($p < 0,0001$) nachgewiesen [39]. Im Kontrast dazu stehen die Untersuchungen von Kovac et al. [25], die zwar ebenfalls eine Korrelation von mHp und der Zellzahl ergaben ($r = 0,83$, $p < 0,0001$), aber eine höhere mHp-Konzentration von 73,76 µg/ml (Median) im Gesamtgemelk klinisch gesunder Kühe nachwies. Dieser mHp-Wert wurde in einer Gruppe von Kühen mit > 400.000 Zellen pro ml Milch ermittelt, während bei der Vergleichsgruppe von Kühen mit Zellzahlen < 100.000 Zellen/ml kein mHp nachgewiesen werden konnte [25]. Da die Nachweisgrenze des verwendeten Hp-ELISA bei 0,3 µg/ml lag, wäre es möglich, dass geringgradig erhöhte Hp-Konzentrationen nicht detektiert wurden und die Dimensionen für mHp daher höher ausfielen als in der vorliegenden Studie und der Veröffentlichung von Akerstedt et al. [39].

Die Kombination der Parameter erhöhte Zellzahl und erhöhtes mHp macht die Gruppierung von Tieren in Cluster 2B, 4M¹ und 3M² auf Basis der ablaufenden entzündlichen Prozesse des Euters wahrscheinlich. Das im Vergleich zu bHp stärker erhöhte mHp in Cluster 4M¹ und 3M² ist durch die lokal ablaufende HP-Synthese in Euterepithelzellen [26] und in neutrophilen Granulozyten [27] zu erklären.

Da lokale Entzündungen der Milchdrüse und damit verbundene erhöhte Zellzahlen einen entscheidenden Einfluss auf die Konzentrationen von mHp und bHp haben und keine umfassende klinische Untersuchung der Tiere durchgeführt wurde, kann für die Cluster 2B, 4M¹ und 3M² keine Aussage über das Vorliegen von extramammären Entzündungsprozessen getroffen werden.

Da mHp in Cluster 2M¹ und 2M² möglicherweise von der erst kurz zurück liegenden Kalbung und der damit einhergehenden Stoffwechselbelastung beeinflusst wird, muss der daraus ermittelte Grenzwert von 0,23 µg/ml mit Vorsicht interpretiert werden. In Cluster 4M¹ und 3M² dagegen ist erhöhtes mHp wahrscheinlich nicht mehr auf eine physiologische Akute-Phase-Reaktion zurückzuführen, sondern steigt im Rahmen eines Entzündungsgeschehens an. Für die Unterscheidung von gesunden und erkrankten Tieren sollte daher der Grenzwert 0,50 µg/ml Hp in Milch gewählt werden.

Grenzwerte für mHp wurden bisher vor allem im Zusammenhang mit Mastitis erhoben. Hiss et al. [32] unterschieden gesunde und subklinisch infizierte Euterviertel (> 200.000 Zellen/ml Milch) anhand eines mHp-Grenzwertes von 2,7 µg/ml mit einer Sensitivität von 0,89 und einer Spezifität von 0,92. Thomas et al. [40] erreichten eine Sensitivität von 0,74 und eine Spezifität von 0,69 (AUC = 0,75) bei der Unterscheidung von gesunden und subklinisch infizierten Tieren (> 100.000 Zellen/ml Milch)

anhand des Grenzwertes von 3,5 µg/ml in Gesamtmelkproben. Der vergleichsweise niedrige Grenzwert aus der hier vorliegenden Studie kann auf die geringe Anzahl erkrankter Tiere mit hohen Hp-Werten zurückgeführt werden.

Vor dem Hintergrund der Studienlage kann vermutet werden, dass der ermittelte Grenzwert als sehr sensitiver Indikator zu interpretieren ist und bereits frühzeitig auf Entzündungszustände hinweist. Die Evaluation des Grenzwertes im praktischen Einsatz sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Vergleich der Clustering Methoden

Obwohl sich die Anzahl der Cluster zwischen den beiden verschiedenen Ansätzen unter Verwendung von k-prototypes und von k-means unterschied, führten beide Clustering-Ansätze zu den gleichen Ergebnissen. Die wahre Anzahl von Clustern für die Beschreibung der Daten ist im Allgemeinen unbekannt und es werden einige Unterschiede zwischen Methoden und Clustering-Algorithmen erwartet. Sowohl die Grenzwerte von mHp als auch die Eigenschaften der gruppierten Cluster waren bei Anwendung beider Methoden gleich. Die Einbeziehung mehrerer Messwerte pro Kuh hatte keinen Einfluss auf die Clustering-Ergebnisse. Die Verwendung von 2 verschiedenen Cluster-Ansätzen und der Vergleich beider Ergebnisse erhöht die Zuverlässigkeit der übereinstimmenden mHp-Grenzwerte und Tiergruppierungen.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Haptoglobin in Blut und Milch ist ein Indikator für die Früherkennung von Entzündungszuständen bei Rindern. Die in der vorliegenden Studie gemessenen mHp- und bHp-Konzentrationen ermöglichten eine Gruppierung in Cluster, deren unterschiedliche Merkmale im Einklang mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen stehen.

Ein Grenzwert von 0,5 µg/ml für Haptoglobin in Milch wurde ermittelt, um zwischen gesunden und kranken Tieren zu unterscheiden. Cluster 2B, 4M¹ und 3M² beinhalten Tiere mit hohen Milhhaptoglobin-Werten, hohen Bluthaptoglobin-Werten und erhöhten Zellzahlen in der Milch, bei denen auf eine Entzündungsreaktion rückgeschlossen werden konnte. Aufgrund der Korrelation zwischen bHp und mHp, ebenso wie der lokalen Synthese von mHp im Euterepithel und in neutrophilen Granulozyten, kann mHp > 0,5 µg/ml nur als unspezifischer Indikator für Entzündung dienen.

Bei einer Erhöhung der Zellzahl ist ein Anstieg von Haptoglobin in Milch aufgrund von Mastitis wahrscheinlich, obwohl eine parallele ablaufende systemische Entzündungsreaktion mit initial erhöhtem bHp nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Aussage über das erkrankte Organsystem zu treffen oder aufgrund der Höhe der mHp-Werte auf den Schweregrad der Entzündung rückzuschließen, war in der vorliegenden Studie daher nicht möglich.

FAZIT FÜR DIE PRAXIS

Da Milch ein leicht verfügbares Substrat darstellt, das 11-mal jährlich im Rahmen der Milchleistungsprüfung untersucht wird, bietet sich Milhhaptoglobin als Indikator für das Tiergesundheitsmonitoring an. Bei Überschreitung des Grenzwertes von 0,5 µg/ml Haptoglobin in Milch sollte das betreffende Tier klinisch untersucht werden, um der Ursache für die Erhöhung nachzugehen und gegebenenfalls erforderliche Maßnahmen zu ergreifen. Für die standardisierte Nutzung von Milhhaptoglobinkonzentrationen in der Milchleistungsprüfung oder durch automatisierte Melksysteme wäre ein Ampelsystem zur Frühwarnung denkbar, welches auf der Kombination von Milhhaptoglobin mit weiteren Parametern wie Zellzahl, Milchfett, Laktationstage usw. beruht. Augenscheinlich unauffällige Tiere mit subklinisch ablaufenden Entzündungsreaktionen könnten schneller aufgefunden und der/dem behandelnden Tierärztin/Tierarzt vorgestellt werden. Gehäuftes Auftreten von Grenzwertüberschreitungen könnte Rückschlüsse für das Tiergesundheitsmonitoring auf Bestandesebene zulassen.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Danksagung

Wir bedanken uns herzlich bei den Partnern im Projekt MetAlarm; dem Milchprüfring Bayern e.V., dem LKV Bayern e.V., milch.bayern e.V., den Bayerischen Milchförderungsfonds, der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU und der University of Wisconsin-Madison. Ein großes Dankeschön gilt außerdem den Landwirtinnen und Landwirten, die mit ihren Betrieben am Projekt teilgenommen haben und auf deren tatkräftige Unterstützung wir über anderthalb Jahre jederzeit zählen konnten.

Literatur

1 Eckersall P, Conner J. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun* 1988; 12: 169-178

2 Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD. et al. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics* 2012; 75: 4207-4231 DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.004.

3 Eckersall P, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 2010; 185: 23-27

- 4** Tothova C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet Med (Praha)* 2014; 59: 163-180 DOI: 10.17221/7478-vetmed.
- 5** Tóthová C, Nagy O, Seidel H. et al. Acute phase proteins as markers of diseases in farm animals. *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary. Diseases* 2011; 231-258
- 6** Dobryszczyka W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 647-654
- 7** Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci* 2011; 3: 118
- 8** Young C, Eckersall P, Saini P. et al. Validation of immunoassays for bovine haptoglobin. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 49: 1-13
- 9** Hajek F, Reus A, Gruber S. et al. Use of serum haptoglobin concentration as an indicator in animal health monitoring of dairy cows. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2020; 48: 228-238
- 10** Horadagoda NU, Knox KM, Gibbs HA. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec* 1999; 144: 437-441 DOI: 10.1136/vr.144.16.437.
- 11** Chan JPW, Chang CC, Hsu WL. et al. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 72-78
- 12** Sheldon I, Noakes D, Rycroft A. et al. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec* 2001; 148: 172-175
- 13** Huzzey J, Duffield T, LeBlanc S. et al. Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J Dairy Sci* 2009; 92: 621-625
- 14** Tadich N, Tejada C, Bastias S. et al. Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. *Vet J* 2013; 197: 401-405 DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.01.029.
- 15** Tóthová C, Nagy O, Seidel H. et al. The influence of hoof diseases on the concentrations of some acute phase proteins and other variables of the protein profile in heifers. *Acta Vet Brno* 2011; 61: 141-150
- 16** El-Deeb WM, El-Bahr SM. Biomarkers of ketosis in dairy cows at postparturient period: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. *Vet Arh* 2017; 87: 431-440 DOI: 10.24099/vet.arhiv.160126c.

17 Abuajamieh M, Kvidera SK, Fernandez MVS. Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows. Elsevier Ltd; 2016

18 Debski B, Nowicki T, Zalewski W. et al. Evaluation of acute phase proteins in clinically healthy dairy cows in perinatal period and during lactation. *Pol J Vet Sci* 2016; 19: 519-523 DOI: 10.1515/pjvs-2016-0065.

19 Uchida E, Katoh N, Takahashi K. Appearance of Haptoglobin in Serum From Cows at Parturition. *J. Vet. Med. Sci* 1993; 55: 893-894

20 Humblet MF, Guyot H, Boudry B. et al. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. *Vet Clin Pathol* 2006; 35: 188-193

21 Lomborg S, Nielsen L, Heegaard PM. et al. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet Res Commun* 2008; 32: 575-582

22 Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448-454

23 Nielsen BH, Jacobsen S, Andersen P. et al. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Vet Rec* 2004; 154: 361-365

24 Eckersall PD, Young FJ, McComb C. et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec* 2001; 148: 35-41
DOI: 10.1136/vr.148.2.35.

25 Kovac G, Popelkova M, Tkacikova L. et al. Interrelationship between somatic cell count and acute phase proteins in serum and milk of dairy cows. *Acta Vet Brno* 2007; 76: 51-57 DOI: 10.2754/avb200776010051.

26 Hiss S, Mielenz M, Bruckmaier RM. et al. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3778-3784
DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73516-X.

27 Lai I-H, Tsao JH, Lu YP. et al. Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk. *Vet Res* 2009; 40: 1

- 28** Wollowski L, Heuwieser W, Kossatz A. et al. The value of the biomarkers cathelicidin, milk amyloid A, and haptoglobin to diagnose and classify clinical and subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 2021; 104: 2106-2122
- 29** Wenz JR, Fox L, Muller F. et al. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2010; 93: 2458-2470
- 30** Kalmus P, Simojoki H, Pyörälä S. et al. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *J Dairy Sci* 2013; 96: 3662-3670
- 31** Pyörälä S, Hovinen M, Simojoki H. et al. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Vet Rec* 2011; 168: 535-535
- 32** Hiss S, Mueller U, Neu-Zahren A. et al. Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters. *Vet Med (Praha)* 2007; 52: 245
- 33** Team RC. R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [http://www R-project org/](http://www.R-project.org/) 2013
- 34** Van Rossum G, Drake F. Python 3 reference manual createspace. Scotts Valley, CA. 2009
- 35** Huang Z. Extensions to the k-means algorithm for clustering large data sets with categorical values. *Data Min Knowl Discov* 1998; 2: 283-304
- 36** Huang Z. Clustering large data sets with mixed numeric and categorical values. In, *Proceedings of the 1st pacific-asia conference on knowledge discovery and data mining,(PAKDD): Citeseer* 1997; 21-34
- 37** Thomas FC, Waterston M, Hastie P. et al. Early post parturient changes in milk acute phase proteins. *J Dairy Res* 2016; 83: 352-359
DOI: 10.1017/S0022029916000297
- 38** Schmitt R, Pieper L, Gonzalez-Grajales LA. et al. Evaluation of different acute-phase proteins for herd health diagnostics in early postpartum Holstein Friesian dairy cows. *J Dairy Res* 2021; 1-5
- 39** Åkerstedt M, Waller KP, Sternesjö Å. Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. *J Dairy Res* 2007; 74: 198-203

40 Thomas FC, Waterston M, Hastie P. et al. The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd. *BMC Vet Res* 2015; 11: 1-10

IV. DISKUSSION

1. Zielsetzung und Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Haptoglobin als Indikator für Entzündungszustände bei Kühen in der Früh lactation zu untersuchen und die Aussagekraft und Nutzbarkeit des Parameters für das systematische Tiergesundheitsmonitoring zu bewerten. Aus der Auswertung des Datensatzes mittels Clusteranalyse ergaben sich unter Anwendung der Algorithmen k-means und k-prototypes 5 bzw. 4 Cluster, die anhand der Höhe der HP-Konzentrationen in Blut (0B-3B) und Milch (1M¹-5M¹ und 0M²-3M²) voneinander unterschieden, und durch klinische sowie labordiagnostische Parameter charakterisiert werden konnten. Die Cluster 4M¹, 3M² und 2B beinhalten Tiere mit erhöhtem mHP, erhöhten Zellzahlen und erhöhtem bHP, denen das klinische Attribut „euterkrank“ zugeordnet wurde. Die Cluster 2M¹, 2M² und 3B beinhalten Tiere mit wenigen Laktationstagen, erhöhten NEFA-Werten im Blut, einem erhöhten Milchfettgehalt und einer Tendenz zu entzündlichen Veränderungen des Reproduktionstraktes. Aus klinischer Sicht wurden in diesen Clustern Tiere mit „negativer Energiebilanz“ zusammengefasst. Es wurde ein Grenzwert von 0,5 µg/ml mHP ermittelt, der eine Unterscheidung von gesunden und kranken Tieren anhand von Haptoglobin in Milch möglich macht.

Die Diskussion der Clusteranalysen und deren Ergebnisse ist in der Veröffentlichung „Nutzung der Haptoglobinkonzentration in Milch als Indikator für das Tiergesundheitsmonitoring bei Milchkühen“ in Kapitel III zu finden. Der Fokus der folgenden Abschnitte soll die erweiterte Methodendiskussion und die Diskussion einzelner Untersuchungsergebnisse unter Berücksichtigung der Literatur aus der systematischen Übersichtsarbeit „Haptoglobin als Indikator für Erkrankungen in der Früh lactation von Milchkühen unter besonderer Berücksichtigung der Eutergesundheit“ (Kapitel II) sein.

2. Datenerhebung und Probennahme

Die praktische Phase der Datenerhebung fand von Oktober 2019 bis Ende Februar 2021 auf 68 Betrieben in vier bayerischen Regionen statt. Die freiwillige Teilnahme

am Projekt und eine Vorselektion auf Betriebe mit Laufstall hatte zu Folge, dass größtenteils moderne und gut organisierte Betriebe ausgewählt wurden. Die Betriebe wurden durch zwei Projekttierärzte über 7 Wochen hinweg immer am selben Wochentag zur etwa selben Uhrzeit besucht, um möglichen Einflüssen wechselnder Tageszeiten auf die Probenergebnisse vorzubeugen. Um die Beeinflussung der Milchprobenanalyse durch den Melkzeitpunkt (FRIGGENS & RASMUSSEN, 2001; EASTRIDGE, 2012; TENG et al., 2021) zu vermeiden, wurde die Milchprobenentnahme im konventionellen Melkstand nach dem Schema eines regulären Probemelkens alternierend am Abend bzw. am Morgen vor dem Betriebsbesuch durch die betriebsleitende Person durchgeführt. Die Probenentnahme im AMS erfolgte via Probenentnahme-Shuttle über einen Zeitraum von 12 Stunden am Vortag. Zu beprobende Tiere wurden beim Betriebsbesuch durch die Projektierärzte so kurz wie möglich für die Untersuchung im Fressfanggitter oder in der Liegebox fixiert, um die Herde nicht an der Futteraufnahme zu hindern oder in ihrem Liegeverhalten zu stören. Dies sollte den Einfluss von Stressoren (LOMBORG et al., 2008) auf die Analyseergebnisse der Blutproben minimieren. Um ein adäquates Management auffälliger Tiere zu ermöglichen, wurden die Untersuchungsergebnisse des Betriebsbesuches am folgenden Tag durch die Projektierärzte mit den teilnehmenden Betriebsleitern besprochen.

Da das Projekt insgesamt 6554 Proben umfasste und die Betriebsbesuche in ganz Bayern stattfanden, konnte aufgrund der limitierten Arbeitszeit nur bei einem Teil der Tiere eine weitergehende klinische Untersuchung durchgeführt werden. Die Daten aus den klinischen Untersuchungen wurden aufgrund der kleinen Stichprobe daher nicht in die Gesamtauswertung einbezogen. Einige HP-beeinflussende Untersuchungsergebnisse, wie zum Beispiel mögliche pathologische Befunde am Ovar (BRODZKI et al., 2019) bei der rektalen Untersuchung oder unterschiedliche Lahmheitsgrade (TADICH et al., 2013) bei der Durchführung des Locomotion-Scorings, wurden somit nicht durch die statistische Datenauswertung erfasst. Ein Einfluss nicht-diagnostizierter Erkrankungen auf die gemessenen HP-Konzentrationen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Durchführung einer umfassenden klinischen Untersuchung sollte Bestandteil weiterer Studien sein, um den Einfluss klinischer Parameter final bewerten zu können.

3. Haptoglobin in Blut und Milch

Die Tiere der Rassen Holstein-Friesian, Braunvieh und Fleckvieh wurden im Zeitraum zwischen dem 5. und 65. Laktationstag beprobt, was die Beeinflussung der HP-Konzentrationen durch die Abkalbung minimieren, und dennoch die wichtigsten Tage der Früh-laktation abbilden sollte. Die HP-Konzentrationen im Gesamtgemelk sinken laut THOMAS et al. (2016) innerhalb von 3-5 Tagen p.p. ab. Die HP-Konzentrationen im Blut gehen innerhalb von 7 Tagen p.p. (HUMBLET et al., 2006) bis zu 4 Wochen p.p. (DEBSKI et al., 2016) auf ein physiologisches Ausgangsniveau zurück. Vor dem Hintergrund der Studie von DEBSKI et al. (2016) ist nicht vollständig auszuschließen, dass die im Blut gemessenen erhöhten HP-Konzentrationen der Cluster 2M¹, 2M² und 3B (Median 13 bzw. 15 Laktationstage) mit dem Attribut „negative Energiebilanz“ noch von der Kalbung beeinflusst wurden. Widersprüchlich dazu waren die bHP-Konzentrationen der Cluster 5M¹, 1B und 0M² im Vergleich zu den Konzentrationen der als auffällig beschriebenen Tiergruppen nicht erhöht, obwohl sich auch die Kühe dieser Cluster erst an Tag 18 bzw. 16 (Median) der Laktation befanden. Dem durch die Kalbung erhöhten bHP liegt laut HUMBLET et al. (2006) eine physiologische Akute-Phase-Reaktion zugrunde, während ARFUSO et al. (2023) von einer erhöhten Entzündungsanfälligkeit der Kühe im peripartalen Zeitraum aufgrund von Stress ausgehen. Bei der Interpretation von HP in Blut und Milch sollte der zeitliche Abstand zur Kalbung immer berücksichtigt werden.

Die bHP-Konzentrationen gesunder primiparer und multiparer Tiere unterschieden sich in der Arbeit von HUMBLET et al. (2006) nicht signifikant voneinander, obwohl die primiparen Tiere in der ersten Woche p.p. höhere mittlere bHP-Konzentrationen aufwiesen. POHL et al. (2015) beschrieben ebenfalls höhere bHP-Konzentrationen bei primiparen Kühen (2,25 g/L; IQR 1,45–2,50; n = 146) als bei multiparen Kühen (1,13 g/L; IQR 0,52–2,22; n = 297; p < 0,05). Damit im Einklang ging die Laktationsnummer in der vorliegenden Arbeit als signifikante Variable in die Clusteranalysen ein. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren bestanden die Cluster mit erhöhtem bHP und mHP aber aus multiparen Tieren mit einem Median von 2 (2M¹), 3 (2B, 2M²) bzw. 4 Laktationen (4M¹, 3M²), während primipare Jungkühe im bezüglich HP unauffälligen Cluster 1M¹ zu finden waren. Eine mögliche Ursache für die voneinander abweichenden Ergebnisse könnte der

Gesundheitszustand der Studienpopulation sein. Während POHL et al. (2015) und HUMBLET et al. (2006) die Konzentrationsunterschiede bei gesunden frischlaktierenden Tieren detektierten, setzten sich die Cluster 2B, 4M¹ und 3M² aus Tieren zusammen, die neben der Multiparität auch erhöhte Zellzahlen aufwiesen und damit nicht mehr als „gesund“ eingestuft werden können. Vermutlich beeinflussten die Zellzahlen die HP-Konzentrationen dieser Gruppen stärker als die Anzahl der Abkalbungen. Da ältere Kühe ein höheres Risiko für Mastitis haben (JAMALI et al., 2018), ist die Anordnung in den Clustern 2B, 4M¹ und 3M² nachvollziehbar. Darüber hinaus befanden sich die multiparen Kühe bereits an Tag 23 (Median 2B), 43 (Median 4M¹) bzw. 25 (Median 3M²) in der Laktation, während sich POHL et al. (2015) und HUMBLET et al. (2006) auf die Woche direkt nach der Kalbung bezogen.

Im gemischten Modell mit Kuh als zufälligem Effekt stellte sich die Jahreszeit als einer der signifikanten Parameter in Bezug auf HP heraus, weshalb die Variable Eingang in die Clusteranalysen fand. Es ergab sich kein einheitliches Bild der HP-Konzentrationen verschiedener Cluster in Bezug auf die Jahreszeiten. HAJEK et al. (2020) und ALBERGHINA et al. (2013) maßen signifikant höhere bHP-Konzentrationen ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$) während der Sommermonate (Juli bis September bzw. Juni bis Juli) als während des restlichen Jahres. In einer Studie von 2004 (CHAN et al.) blieb die bHP-Konzentration dagegen durch warme ($27,3 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$) und kalte ($19,8 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$) Temperaturen unbeeinflusst. CHAN et al. (2004) beprobten darüber hinaus nur Färsen, während die Daten von HAJEK et al. (2020) ebenso wie die der vorliegenden Arbeit primi- und multipare Tiere in der vulnerablen Phase der Früh-laktation einschlossen. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass hochleistende Kühe anfälliger für die negativen Auswirkungen von Hitzestress sein könnten als niederleistende Tiere, was höhere bHP-Konzentrationen von Kühen im Vergleich zu Färsen während der Sommermonate begründen könnte (KADZERE et al., 2002).

Insgesamt waren die HP-Konzentrationen in der vorliegenden Studie niedriger als die in der Literatur beschriebenen Werte für bHP (HUZZEY et al., 2009; ECKERSALL & BELL, 2010; HAJEK et al., 2020) und mHP (HISS et al., 2007; PYÖRÄLÄ et al., 2011; THOMAS et al., 2015; WOLLOWSKI et al., 2021). Eine mögliche Erklärung dafür ist der Ausschluss klinisch kranker und behandelter Tiere

von der Probennahme. Die Studienpopulation bestand aus gesunden frisch-laktierenden Kühen, die allenfalls unerkannt subklinisch erkrankt sein konnten. Die mit klinischen Attributen versehenen Cluster 2B, 2M¹, 2M², 4M¹ und 3M² wiesen sowohl erhöhtes bHP als auch erhöhtes mHP auf, was mit der in der Literatur beschriebenen Korrelation zwischen Blut- und Milch-Haptoglobin im Einklang steht (ECKERSALL et al., 2001; NIELSEN et al., 2004; KOVAC et al., 2007).

4. Haptoglobin im Zusammenhang mit Uteruserkrankungen

Um die Uterusgesundheit zu beurteilen und den Einfluss möglicher Uteruserkrankungen auf HP zu berücksichtigen, wurde bei der frischlaktierenden Studienpopulation neben der Probennahme auch eine Untersuchung des Vaginalsekretes mittels Metriceck (Simcro™ Datamars, Hamilton, NZL) durchgeführt. Das Gerät besteht aus einem Stab aus Edelstahl, an dessen vorderem Ende eine Halbkugel aus Silikon angebracht ist. Durch das vaginale Einführen des desinfizierten Metriceck-Stabes kann Vaginalsekret gewonnen, und gemäß folgender Einteilung beurteilt werden: Befund 0 = klarer Schleim, 1 = einzelne Eiterflocken, 2 = Eiterflocken < 50%, 3 = Eiterflocken > 50%, 4 = Blut. Durch die Untersuchung mit dem Metriceck-Gerät konnten in einer Studie von PLETICHA et al. (2009) mehr Kühe als von Endometritis betroffen diagnostiziert werden, als bei der Untersuchung mit dem Spekulum oder der behandschuhten Hand (47, vs. 36,9 und 36,8%).

Obwohl signifikant höhere bHP-Konzentrationen bei Kühen mit Endometritis (BRODZKI et al., 2015a; BRODZKI et al., 2015b) sowie akuter puerperaler Metritis (BURFEIND et al., 2014; POHL et al., 2015; BARRAGAN et al., 2018) nachgewiesen wurden, und erhöhtes bHP p.p. mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Metritis einhergeht (HUZZEY et al., 2009; DUBUC et al., 2010), ging der Metriceck-Befund wider Erwarten nicht als signifikante Variable aus dem linearen gemischten Modell mit Kuheffekt hervor. Dennoch hatten Tiere aus Cluster 2M¹ („negative Energiebilanz“) und 5M¹ („frischlaktierend“) einen höheren Metriceck-Score (Median Metriceck-Befund 1) als die restlichen Cluster und zeigten damit zumindest eine Tendenz zu geringgradig beeinträchtigter Uterusgesundheit (1 = einzelne Eiterflocken). Als Ursache für die fehlenden Zusammenhänge zwischen HP und dem Parameter Metriceck-Befund in den vorliegenden Daten könnte der Ausschluss von als krank erkannten und

behandelten Tiere vom Probemelken auf dem Betrieb und somit von der Probennahme vermutet werden. Da primär gut organisierte und moderne Betriebe am Projekt teilnahmen, könnte auch das gute Management von Transitkühen und Frischlaktierenden zu einem hohen Anteil uterusgesunder Tiere in der Studienpopulation beigetragen haben.

Eine Abnahme der HP-Konzentrationen ist in der Literatur auch im Zusammenhang mit der Uterusinvolution (SHELDON et al., 2001) beschrieben; ebenso scheint HP beim Auftreten von Ovarialzysten (BRODZKI et al., 2019) erhöht zu sein. Aufgrund dessen, dass keine rektale Untersuchung und Befundung von Uterus und Ovar durchgeführt wurden, sind der Auswertung von HP unter reproduktionsmedizinischen Aspekten in dieser Studie Grenzen gesetzt.

5. Haptoglobin im Zusammenhang mit Stoffwechselstörungen

Sowohl die NEFA- als auch die BHB-Konzentrationen gehörten zu den Parametern, die tagesaktuell aus den Blutproben der bei den Bestandsbesuchen untersuchten Tiere bestimmt wurden. Beide Parameter weisen eine positive Korrelation mit BHP (EL-DEEB & EL-BAHR, 2017; HAJEK et al., 2020) und mHP (HISS et al., 2009) auf und sind aussagekräftige Laborwerte für das Ausmaß der Fettmobilisierung im Rahmen der negativen Energiebilanz ($NEFA \geq 0,57$ mmol/l (OSPINA et al., 2010)) und das Vorliegen von Ketose ($BHB \geq 1,2$ mmol/l ((ENJALBERT et al., 2001; MCART et al., 2012; SUTHAR et al., 2013; VANHOLDER et al., 2015)). Lediglich in 7,7% der Blutproben aus dem gesamten Datensatz wurden erhöhte BHB-Konzentrationen ($BHB \geq 1,2$ mmol/l) gemessen, wohingegen in der Literatur für subklinische Ketose eine Prävalenz von 8,9 bis 43% (DOHOO et al., 1983; DUFFIELD et al., 1998; MCART et al., 2012; SUTHAR et al., 2013) beschrieben wird. Möglich wäre, dass Kühe mit übermäßiger Fettmobilisierung und erhöhten NEFA-Werten im Blut gar nicht erst eine Ketose entwickelten, da von der Norm abweichende Untersuchungsergebnisse am Folgetag des Betriebsbesuches mit den Betriebsleitern besprochen, und auffällige Tiere sogleich mittels Eingabe von Propylenglykol unterstützt bzw. dem Hoftierarzt vorgestellt werden konnten. Der geringe Anteil an Ketose-Erkrankungen und die frühzeitige Therapie von Stoffwechsellentgleisungen könnten die Ursache dafür sein, dass sich der

Zusammenhang zwischen BHB und HP in der vorliegenden Studie als nicht signifikant herausstellte.

Im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur gingen dagegen die NEFA-Konzentration und der Milchfettgehalt als signifikante Parameter in die Clusteranalysen ein. Die Tiere der Cluster 2M¹, 3B und 2M² wiesen erhöhte NEFA-Konzentrationen, einen erhöhten Milchfettgehalt, erhöhtes mHP (außer Cluster 3B) und erhöhtes bHP auf (siehe Tab. 3 und 4 aus Veröffentlichung II). Zudem befanden sie sich mit 13 (2M¹) bzw. 15 (3B, 2M²) Laktationstagen noch am Anfang der Laktationsperiode. Den betreffenden Clustern wurde das klinische Attribut „negative Energiebilanz“ zugeordnet. Der Zusammenhang zwischen negativer Energiebilanz inklusive der damit einhergehenden Fettmobilisierung und dem Akute-Phase-Protein HP wurde von anderen Autoren damit begründet, dass durch die Oxidation der bei Energiemangel freigesetzten Fettsäuren ein pro-inflammatorischer Zustand entsteht (EL-DEEB & EL-BAHR, 2017). Eine andere Theorie lautet, dass die intestinale Permeabilität während der Transitphase erhöht ist (Leaky-gut Syndrom) und eine Infiltration von Lipopolysaccharid (LPS) erlaubt, was sich wiederum negativ auf die Stoffwechselfgesundheit auswirkt (ABUJAMIEH et al., 2016). Denkbar wäre aber auch, dass bereits während der Trockenstehzeit ein entzündlicher Zustand vorliegt, der die Futtermittelaufnahme im peripartalen Zeitraum beeinträchtigt, und somit die Entwicklung von negativer Energiebilanz und Ketose in der Frühlaktation begünstigt (HORST et al., 2021).

6. Haptoglobin im Zusammenhang mit Lahmheit

Durch die PraeRi-Studie aus dem Jahr 2020 wurden in deutschen Milchviehbeständen hohe Lahmheitsprävalenzen ermittelt. Etwa jede vierte Kuh wies in den Regionen Nord (22,8 %) und Süd (22,7 %) eine Lahmheit auf, während in der Region Ost (39,4 %) sogar jede zweite bis dritte Kuh eine Lahmheit zeigte (PRAERI, 2020). Die Konzentration von bHP steigt mit zunehmendem Locomotion-Score an (SMITH et al., 2010; TADICH et al., 2013) und verschiedene Klauenerkrankungen gehen mit einer signifikanten Erhöhung der bHP-Konzentration einher (SMITH et al., 2010; TÓTHOVÁ et al., 2011; BAGGA et al., 2016). Bei einer Lahmheitsprävalenz von deutschlandweit fast 30% ist davon auszugehen, dass auch Tiere aus der untersuchten Studienpopulation von Klauenerkrankungen und Lahmheiten betroffen waren. Da kein Locomotion-

Scoring durchgeführt wurde, bzw. die Daten der klinischen Untersuchungen aufgrund ihres geringen Umfangs nicht in die statistische Auswertung einbezogen werden konnten, kann eine Beeinflussung der HP-Konzentrationen der verschiedenen Cluster durch Klauenerkrankungen nur vermutet, aber nicht weitergehend ausgewertet werden.

7. Haptoglobin im Zusammenhang mit Mastitis

Die somatische Zellzahl wurde mittels Fossomatic™ FC (FOSS GmbH, Hamburg, DE) aus den wöchentlich vor dem Betriebsbesuch gezogenen Milchproben bestimmt. Die Zellzahl ging als signifikanter Parameter ($p < 0,00001$) aus dem gemischten Modell mit Kuh als zufälligem Effekt hervor und war somit eine der Eingangsvariablen für die Clusteranalysen. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der vielfach die signifikante Korrelation zwischen der Zellzahl und mHP (NIELSEN et al., 2004; ÅKERSTEDT et al., 2007; KOVAC et al., 2007; LAI et al., 2009) beschrieben wurde. HP kann sowohl von neutrophilen Granulozyten (LAI et al., 2009), deren Anzahl im Falle von Mastitis zunimmt, als auch im Alveolarepithel des Euters (THIELEN et al., 2007; WHELEHAN et al., 2011) selbst synthetisiert werden. Beide Mechanismen sichern eine schnelle lokale Abwehrreaktion nach Eintritt eines Pathogens in die Milchdrüse. HISS et al. (2004) wiesen bereits 3 Stunden nach der intramammären Infusion von LPS einen Konzentrationsanstieg von mHP nach.

Tiere der Cluster 2B, 4M¹, 3M² wiesen neben erhöhtem bHP und den höchsten mHP-Konzentrationen auch die höchsten Zellzahlen auf und wurden somit mit dem klinischen Attribut „euterkrank“ beschrieben (siehe Tab. 3 und 4 aus Veröffentlichung II). Der mHP-Mittelwert aus Cluster 3M² betrug 1,25 µg/ml (Standardabweichung 0,29) und der Median aus Cluster 4M¹ lag bei 0,88 µg/ml (IQR 0,997), während von anderen Autoren deutlich höhere mHP-Dimensionen mit Grenzwerten für die Differenzierung von gesunden Tieren und Tieren mit subklinischer Mastitis beschrieben wurden (HISS et al., 2007; THOMAS et al., 2015; WOLLOWSKI et al., 2021). HISS et al. (2007) nutzten eine mHP-Konzentration von 2,7 µg/ml um mit einer Spezifität von 0,92 und einer Sensitivität von 0,89 zwischen gesunden (< 200.000 Zellen / ml Milch) und subklinisch erkrankten Eutervierteln (> 200.000 Zellen / ml Milch und 2 von 3 positiven bakteriologischen Untersuchungsergebnissen) zu unterscheiden. Den vorliegenden

Ergebnissen ähnlichere Größenordnungen für mHP sind in einer Studie von ÅKERSTEDT et al. (2007) zu finden, in der das Gesamtmelk von Tieren ohne klinische Entzündungsanzeichen untersucht wurde. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Parameter mHP und der Zellzahl ($p < 0,0001$) ergab sich bei einer mHP-Konzentration von 1,5 µg/ml (Median) (ÅKERSTEDT et al., 2007). Auch in der hier vorliegenden Studie wurde das Gesamtmelk gesunder Tiere ohne Anzeichen für Entzündung untersucht, während kranke Tiere von der Probennahme ausgenommen wurden. Das Vorkommen subklinischer Mastitiden bei Tieren aus der Studienpopulation, verursacht durch Erreger wie KNS oder *S. aureus*, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Im Zusammenhang mit diesen Pathogenen werden die HP-Konzentrationen in der Literatur als nur geringgradig erhöht beschrieben (PYÖRÄLÄ et al., 2011; KALMUS et al., 2013; SIMÕES et al., 2018; THOMAS et al., 2018; WOLLOWSKI et al., 2021), während mHP-Werte bei Mastitiden, verursacht durch *E. coli* oder *T. pyogenes*, besonders hoch ausfallen (SUOJALA et al., 2008; WENZ et al., 2010; PYÖRÄLÄ et al., 2011; KALMUS et al., 2013; THOMAS et al., 2018). Da keine bakteriologische Untersuchung der Milchproben durchgeführt wurde, konnten mögliche Zusammenhänge zwischen HP und Mastitis-verursachenden Pathogenen in der vorliegenden Studie nicht weitergehend ausgewertet werden.

Tagesaktuell gemessenes mHP könnte generell eine wertvolle Zusatzinformation zur Zellzahl darstellen. Da der Parameter innerhalb kurzer Zeit (HISS et al., 2004) und in Relation zur Schwere der Erkrankung (WENZ et al., 2010; PYÖRÄLÄ et al., 2011; KALMUS et al., 2013) ansteigt, wäre eine Interpretation von mHP in Kombination mit der Zellzahlerhöhung sinnvoll. Dies würde eine, dem Schweregrad angepasste, frühzeitige Therapie ermöglichen und könnte als Entscheidungshilfe beim Einsatz von Antibiotika, NSAID und Flüssigkeitssubstitution dienen. Ebenso wäre eine Kontrolle des Therapieerfolgs anhand von mHP denkbar, wie in den Arbeiten von EL-DEEB und ELMOSLEMANY (2016) und SMITH et al. (1998) bereits für bHP beschrieben.

V. SCHLUSSFOLGERUNGEN: MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN FÜR DIE NUTZUNG VON HAPTOGLOBIN ALS INDIKATOR FÜR DAS TIERGESUNDHEITS-MONITORING

Gewonnen aus der Milchleistungsprüfung oder durch automatisierte Melksysteme, stellen die Parameter der Milchanalytik schon seit langem einen wichtigen Bestandteil des Tiergesundheitsmonitorings dar. Haptoglobin steigt im Zusammenhang mit den wichtigsten Erkrankungen der Frühaktation innerhalb weniger Stunden an und es besteht eine Korrelation zwischen bHP und mHP. Intramammäre Entzündungsprozesse beeinflussen die Konzentration von mHP durch die lokale Synthese des Akute-Phase-Proteins im Euterepithel und in neutrophilen Granulozyten. Die Interpretation von mHP muss demnach immer kombiniert mit der Höhe der Zellzahl erfolgen um subklinische und klinische Mastitis als mHP beeinflussenden Faktor einschätzen zu können. Dennoch können extramammäre Entzündungsprozesse durch Mastitis kaschiert und somit nicht zuverlässig mittels mHP diagnostiziert werden.

Als unspezifischer Parameter ersetzt mHP nicht die klinische Untersuchung des betreffenden Tieres, erleichtert aber das Auffinden desselben auf Bestandsebene. Bei einem regulären Screening in der monatlichen MLP oder sogar tagesaktuell durch den Einsatz im automatisierten Melksystem wäre die mHP-Bestimmung hilfreich, um (sub-)klinisch erkrankte Tiere innerhalb einer Herde zu identifizieren und dem behandelnden Tierarzt vorzustellen. Auch für die Therapieerfolgskontrolle wäre die regelmäßige Untersuchung von mHP sinnvoll. Die bisher genutzten Parameter aus Milchanalytik oder smarten Sensorsystemen werden durch mHP um bislang fehlende Informationen zum Entzündungsgeschehen des einzelnen Tieres ergänzt. Der schnelle Konzentrationsanstieg ermöglicht eine frühzeitige Einschätzung des Gesundheitszustandes, verlangt aber auch nach einer tagesaktuellen Messung von mHP, die durch ein monatliches Probemelken momentan nicht gegeben ist. Im automatischen Melksystem könnte eine solche Konzentrationsbestimmung ermöglicht werden; ebenso ist im Krankheitsverdachtsfall eine MLP von Einzelproben jenseits des regulären

V. Schlussfolgerungen: Möglichkeiten und Grenzen für die Nutzung von Haptoglobin als Indikator für das Tiergesundheits-monitoring

Probemelkens der ganzen Herde vorstellbar.

Voraussetzung für den Einsatz von mHP auf Bestandesebene, unerheblich mit welchem System der Milchanalytik, wäre die Verfügbarkeit kostengünstiger Tests. Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Messung mittels ELISA ist für den routinemäßigen Einsatz auf Bestandesebene aus Kostengründen nicht praktikabel. Der Versuch, mHP-Konzentrationen indirekt mittels Infrarotspektroskopie zu bestimmen, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Basierend auf IR-Spektren und kuhassoziierten Informationen wäre die Etablierung eines Frühwarnsystems für Entzündungsgeschehen, ähnlich dem der Stoffwechsel-Doppelampel, vorstellbar, um mHP als Parameter für das Tiergesundheitsmonitoring zugänglich zu machen und auch auf Herdenebene nutzen zu können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Früh-laktation stellt eine besonders vulnerable Phase in der Laktation von Milchkühen dar. Aufgrund von Immunsuppression und negativer Energiebilanz treten gehäuft Erkrankungen wie Lahmheiten, Mastitiden, Störungen des Reproduktionstraktes und Stoffwechselstörungen auf. Die Untersuchungsparameter der Milchanalytik, die auf den meisten landwirtschaftlichen Betrieben mittels Milchleistungsprüfung oder automatischem Melksystem durchgeführt wird, ermöglichen ein Monitoring der Energiestoffwechselgesundheit, wohingegen ein standardisiertes Monitoring von Entzündungszuständen bisher nicht für die Betriebe verfügbar ist. Aufgrund dessen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Akute-Phase-Protein Haptoglobin als Indikator für entzündliche Erkrankungen bei Milchkühen in der Früh-laktation untersucht und dessen Nutzung für das Tiergesundheitsmonitorings diskutiert werden. Haptoglobin ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems und steigt beim Rind im Zuge entzündlicher Erkrankungen innerhalb kurzer Zeit um das Vielfache seiner Ausgangskonzentration an. Es besteht eine Korrelation von Haptoglobin in Blut und Milch.

Es wurde eine umfassende wissenschaftliche Literaturrecherche (Publikation I) mit dem Fokus auf Haptoglobin in Blut und Milch im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen der Früh-laktation durchgeführt. Während für Haptoglobin im Blut Grenzwerte für die Unterscheidung von gesunden und kranken Tieren verfügbar sind, wurde Haptoglobin in der Milch bisher primär im Kontext von Erkrankungen der Milchdrüse untersucht. Haptoglobin in der Milch lässt Aussagen über den Schweregrad einer Mastitis zu, weist auf das verursachende Pathogen hin und ermöglicht eine Unterscheidung gesunder und subklinisch infizierter Euterviertel. Die Nutzung des Parameters in der routinemäßigen Milchanalytik als Indikator für Entzündungsreaktionen auf Einzeltier- und Bestandesebene wurde bislang nicht evaluiert. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Zusammenhänge zwischen erhöhten Haptoglobin-Konzentrationen in Blut und Milch, sowie klinischen sowie labordiagnostischen Parametern bei Kühen in der Früh-laktation zu untersuchen und Grenzwerte für die Unterscheidung zwischen gesunden und kranken Tieren zu ermitteln.

In der hier durchgeführten Untersuchung (Publikation II) wurden Blut- und Milchproben von klinisch unauffälligen Kühen zwischen dem 5. und 65. Laktationstag gewonnen und, neben einer Körperkonditionsbeurteilung und einer Untersuchung des Vaginalsekrets, bei einem Teil der Studienpopulation auch eine klinische Untersuchung durchgeführt. Die Blutproben wurden auf die Parameter Creatinin, Aspartat-Aminotransferase, Gamma-Glutamyl-Transferase, Glutamat-Dehydrogenase, Gesamtprotein, Albumin, Creatinkinase, β -Hydroxybutyrat, freie Fettsäuren und Haptoglobin untersucht. In den Milchproben wurden die Parameter MilCHFett, Milcheiweiß, Laktose, Harnstoff, somatische Zellzahl, β -Hydroxybutyrat, freie Fettsäuren und Haptoglobin bestimmt. Die statistische Auswertung des finalen Datensatzes aus 3950 Proben wurde mittels R v3.6.3 und Python v3.8.5 durchgeführt. Mittels eines gemischten Modells mit Kuh als zufälligem Effekt wurden signifikante Variablen für HP identifiziert, die in die Clusteranalysen unter Verwendung der Algorithmen k-means und k-prototypes einbezogen wurden. Es ergaben sich 5 (Analyse mit k-means) bzw. 4 (Analyse mit k-prototypes) Cluster, die anhand der Höhe der Haptoglobin-Konzentrationen in Blut (0B-3B) und Milch ($1M^1$ - $5M^1$ und $0M^2$ - $3M^2$) voneinander unterschieden, und durch klinische sowie labordiagnostische Parameter charakterisiert werden konnten.

Die Cluster $4M^1$, $3M^2$ und 2B beinhalten Tiere mit erhöhtem Haptoglobin in Milch, erhöhten Zellzahlen und erhöhtem Haptoglobin in Blut, denen das klinische Attribut „euterkrank“ zugeordnet wurde. Die Cluster $2M^1$, $2M^2$ und 3B beinhalten Tiere mit wenigen Laktationstagen, erhöhten Gehalten freier Fettsäuren im Blut, einem erhöhten MilCHFettgehalt und einer Tendenz zu entzündlichen Veränderungen des Reproduktionstraktes. Aus klinischer Sicht wurden in diesen Clustern Tiere mit „negativer Energiebilanz“ zusammengefasst. Die Cluster $1M^1$, $3M^1$, $5M^1$, $0M^2$, $1M^2$, 0B und 1B waren hinsichtlich der Haptoglobin-Konzentrationen in Blut und Milch unauffällig.

Es wurde ein Grenzwert von $0,5 \mu\text{g/ml}$ für Haptoglobin in Milch ermittelt, der eine Unterscheidung von gesunden und kranken Tieren ermöglicht. Bei der Überschreitung des in Milch gemessenen Grenzwertes im routinemäßigen Einsatz sollte das auffällige Tier klinisch untersucht werden, um die Ursache der durch Haptoglobin angezeigten Entzündungsreaktion zu diagnostizieren. Eine Nutzung

als Indikator für Erkrankungen müsste immer unter Berücksichtigung der Zellzahl des entsprechenden Tieres erfolgen, da eine beeinträchtigte Eutergesundheit die Höhe der Haptoglobin-Konzentration in Milch beeinflusst und nicht zwischen intra- und extramammären Entzündungsprozessen unterschieden werden kann.

Um Haptoglobin in Milch in der routinemäßigen Milchanalytik zu nutzen, wäre die Verfügbarkeit kostengünstiger Testsysteme Voraussetzung. Ein Ansatz könnte die Bestimmung von Haptoglobin mittels Infrarot-Spektroskopie sein, die Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte. Eine Kombination des Parameters mit weiteren kuhassoziierten Informationen wäre für die Nutzung in einem Frühwarnsystem auf Bestandsebene denkbar.

VII. SUMMARY

Early lactation is a highly vulnerable phase in a dairy cow's lactation period. Due to immunosuppression and negative energy balance, diseases such as lameness, mastitis, reproductive disorders, and metabolic diseases occur more frequently. Information from milk analysis, which is conducted on most farms by using dairy milk recording or automatic milking systems, allow monitoring of metabolic health, whereas standardized monitoring of inflammatory conditions is not yet available on farm. Therefore, the acute phase protein haptoglobin should be evaluated as an indicator for inflammatory diseases in dairy cows in early lactation. Furthermore, its use for animal health monitoring should be discussed. Haptoglobin is part of the innate immune system and increases, associated with inflammatory diseases, severalfold of its initial concentration in cattle within a short period of time. There is a correlation between haptoglobin in blood and milk.

Extensive research of scientific literature (Publication I) with a focus on haptoglobin in blood and milk in relation to various diseases of early lactation was conducted. While threshold values for haptoglobin in blood are available to differentiate between healthy and affected animals, haptoglobin in milk has been primarily investigated in the context of diseases of the mammary gland. Haptoglobin in milk allows conclusions to be made on the severity of mastitis, hints at the causative pathogen and allows distinguishing between healthy and subclinically infected udder quarters. The use of this parameter as an indicator of inflammatory disorders for individual animals and at herd level in routine milk analysis has not yet been evaluated. The aim of the present study was therefore to investigate the relationships between elevated haptoglobin concentrations in blood and milk, as well as clinical and laboratory diagnostic parameters in early lactating cows, and to identify cut-off values for differentiating between healthy and affected animals.

In the present study (publication II), blood and milk samples were collected from cows between the 5th and 65th day in milk and, in addition to a body condition scoring and an examination of vaginal secretion, a clinical examination was also performed in parts of the study population. The blood samples were analyzed for the parameters creatinine, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transferase,

glutamate dehydrogenase, total protein, albumin, creatine kinase, β -hydroxybutyrate, non-esterified free fatty acids and haptoglobin. The milk samples were analyzed for the parameters milk fat, milk protein, lactose, urea, somatic cell count, β -hydroxybutyrate, non-esterified free fatty acids and haptoglobin. Statistical analysis of the final data set of 3950 samples was performed using R v3.6.3 and Python v3.8.5. A mixed model with cow as random effect was used to identify significant variables for HP, which were included in cluster analyses using k-means and k-prototypes algorithms. This resulted in 5 (k-means) resp. 4 (k-prototypes) clusters, which were differentiated by the level of haptoglobin concentrations in blood (0B-3B) and milk (1M¹-5M¹ and 0M²-3M²) and could be characterized by clinical and laboratory parameters.

Clusters 4M¹, 3M² and 2B contain animals with increased haptoglobin concentration in milk, elevated cell counts and increased haptoglobin concentration in blood. These clusters were classified with the clinical attribute "udder disease". Clusters 2M¹, 2M² and 3B contain animals with very few days in milk, increased concentrations of free fatty acids in the blood, increased milk fat content and a tendency for inflammatory disorders in the reproductive tract. From a clinical perspective, animals with "negative energy balance" were added to these clusters. Clusters 1M¹, 3M¹, 5M¹, 0M², 1M², 0B and 1B were unremarkable regarding haptoglobin concentrations in blood and milk.

A threshold concentration of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ for haptoglobin in milk was identified, which allows a distinction of healthy and affected animals. If the haptoglobin threshold is exceeded in routine milk analysis, the susceptible animal should be clinically examined in order to diagnose the cause of the inflammatory disorder. As impaired udder health affects the level of haptoglobin concentration in milk and distinguishing between intra- and extramammary inflammatory processes is not possible, the cell count of the animal in question should always be considered.

To use milk haptoglobin in the routine milk analysis, the availability of cost-effective test systems would be a precondition. The determination of haptoglobin via infrared spectroscopy could be one approach and should be further investigated. A combination of the parameter with other cow-associated information would be feasible for the use in an early warning system at herd level.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abernethy TJ, Avery OT. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood : I. Distribution of the protein in patient's sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with c polysaccharide of pneumococcus. *Journal of Experimental Medicine* 1941; 73: 173-82.

Abuajamieh M, Kvidera S, Fernandez MVS, Amir N, Upah N, Nolan E, Lei S, DeFrain J, Green H, Schoenberg K, Trout W, Baumgard L. Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows. *Research in Veterinary Science* 2016; 109: 81-5.

Adewuyi A, Gruys E, Van Eerdenburg F. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly* 2005; 27: 117-26.

Åkerstedt M, Waller KP, Sternesjö Å. Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Research* 2007; 74: 198-203.

Alberghina D, Piccione G, Casella S, Panzera M, Morgante M, Giancesella M. The effect of the season on some blood metabolites and haptoglobin in dairy cows during postpartum period. *Archives Animal Breeding* 2013; 56: 354-9.

Ametaj BN, Bradford BJ, Bobe G, Nafikov RA, Lu Y, Young JW, Beitz DC. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 2005; 85: 165-75.

Arfuso F, Minuti A, Liotta L, Giannetto C, Trevisi E, Piccione G, Lopreiato V. Stress and inflammatory response of cows and their calves during peripartum and early neonatal period. *Theriogenology* 2023; 196: 157-66.

Bagga A, Randhawa SS, Sharma S, Bansal BK. Acute phase response in lame crossbred dairy cattle. *Veterinary World* 2016; 9: 1204-8.

Baird GD. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *Journal of Dairy Science* 1982; 65: 1-10.

Barragan A, Piñeiro J, Schuenemann G, Rajala-Schultz P, Sanders D, Lakritz J, Bas S. Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 8248-58.

Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2018) *Stryer Biochemie*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg

Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J. Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. *Theriogenology* 2015a; 84: 11-8.

Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Veterinary Research Communications* 2015b; 39: 143-9.

Brodzki P, Brodzki A, Krakowski L, Dabrowski R, Szczubial M, Bochniarz M. Levels of selected cytokines and acute-phase proteins in the serum of dairy cows with cystic ovarian disease and those in follicular and luteal phases of normal ovarian cycle. *Research in Veterinary Science* 2019; 123: 20-5.

Bundesverband praktizierender Tierärzte: Leitlinien für die Durchführung einer „Tierärztlichen Bestandsbetreuung“ in Rinderbeständen, Stand: September 2019. https://intern.tieraerzterverband.de/bpt/berufspolitik/leitlinien/dokumente/bestandsbetreuung/nutztierbereich/ITB-Leitlinien_Rind.pdf. (06.03.2024).

Bundesverband Rind und Schwein (2020) *Rinder- und Schweineproduktion in*

Deutschland 2019. Bundesverband Rind und Schwein e.V.

Burfeind O, Sannmann I, Voigtsberger R, Heuwieser W. Receiver operating characteristic curve analysis to determine the diagnostic performance of serum haptoglobin concentration for the diagnosis of acute puerperal metritis in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 2014; 149: 145-51.

Carvalho M, Peñagaricano F, Santos J, DeVries T, McBride B, Ribeiro E. Long-term effects of postpartum clinical disease on milk production, reproduction, and culling of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2019; 102: 11701-17.

Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics* 2012; 75: 4207-31.

Chan JPW, Chu CC, Fung HP, Chuang ST, Lin YC, Chu RM, Lee SL. Serum haptoglobin concentration in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science* 2004; 66: 43-6.

Chan JPW, Chang CC, Hsu WL, Liu WB, Chen TH. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. *Veterinary Clinical Pathology* 2010; 39: 72-8.

Collard B, Boettcher P, Dekkers JM, Petitclerc D, Schaeffer L. Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *Journal of Dairy Science* 2000; 83: 2683-90.

Debski B, Nowicki T, Zalewski W, Ochota M, Mrowiec J, Twardon J. Evaluation of acute phase proteins in clinically healthy dairy cows in perinatal period and during lactation. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2016; 19: 519-23.

Dobryszczycka W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1997; 35: 647-54.

Dohoo IR, Martin SW, Meek AH, Sandals W. Disease, production and culling in Holstein-Friesian cows I. The data. Preventive Veterinary Medicine 1983; 1: 321-34.

Drackley JK. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? Journal of Dairy Science 1999; 82: 2259-73.

Dubuc J, Duffield T, Leslie K, Walton J, LeBlanc S. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. Journal of Dairy Science 2010; 93: 5764-71.

Duffield T, Sandals D, Leslie K, Lissemore K, McBride B, Lumsden J, Dick P, Bagg R. Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 1998; 81: 2866-73.

Duffield T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 2000; 16: 231-53.

Duffield T, Lissemore K, McBride B, Leslie K. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. Journal of Dairy Science 2009; 92: 571-80.

Duffield T, LeBlanc S (2009) Interpretation of serum metabolic parameters around the transition period. Southwest Nutrition and Management Conference. 106-14

Eastridge ML (2012) Variation in milk fat of fresh cows. Proceedings of the 21st Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, USA, 24-25 April 2012. 59-65

Eckersall P, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. The Veterinary Journal 2010; 185: 23-7.

Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan AM, Fitzpatrick JL. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows

with clinical mastitis. *Veterinary Record* 2001; 148: 35-41.

Edwards J, Tozer P. Using activity and milk yield as predictors of fresh cow disorders. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 524-31.

El-Deeb WM, Elmoslemany AM. Acute phase proteins as biomarkers of Urinary Tract Infection in dairy cows: diagnostic and prognostic accuracy. *Japanese Journal of Veterinary Research* 2016; 64: 57-66.

El-Deeb WM, El-Bahr SM. Biomarkers of ketosis in dairy cows at postparturient period: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. *Veterinarski Arhiv* 2017; 87: 431-40.

Enjalbert F, Nicot M, Bayourthe C, Moncoulon. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science* 2001; 84: 583-9.

Friedrichs WE, Navarijoashbaugh AL, Bowman BH, Yang F. Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 209: 250-6.

Friggens N, Rasmussen M. Milk quality assessment in automatic milking systems: accounting for the effects of variable intervals between milkings on milk composition. *Livestock Production Science* 2001; 73: 45-54.

Gernand E, Rehbein P, von Borstel UU, König S. Incidences of and genetic parameters for mastitis, claw disorders, and common health traits recorded in dairy cattle contract herds. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 2144-56.

Glatz-Hoppe J, Boldt A, Spiekers H, Mohr E, Losand B. Relationship between milk constituents from milk testing and health, feeding, and metabolic data of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2020; 103: 10175-94.

Hajek F, Reus A, Gruber S, Plattner S, Kammer M, Baumgartner C, Smink M, Döpfer D, Hachenberg S, Mansfeld R. Use of serum haptoglobin concentration as an indicator in animal health monitoring of dairy cows. *Tierärztliche Praxis*. Ausgabe G, Grosstiere/nutztiere 2020; 48: 228-38.

Hiss S, Mielenz M, Bruckmaier RM, Sauerwein H. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 3778-84.

Hiss S, Mueller U, Neu-Zahren A, Sauerwein H. Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters. *VETERINARNI MEDICINA-PRAHA*- 2007; 52: 245.

Hiss S, Weinkauff C, Hachenberg S, Sauerwein H. Short communication: Relationship between metabolic status and the milk concentrations of haptoglobin and lactoferrin in dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 4439-43.

Hoedemaker M, Mansfeld R, De Kruif A, Heuwieser W. "Ergebnisinterpretation und Strategien - Betrachtung einzelner Kontrollbereiche" In: *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. De Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M, eds. Stuttgart: Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH 2014: 46-281.

Holtenius P, Holtenius K. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1996; 43: 579-87.

Horadagoda NU, Knox KM, Gibbs HA, Reid SW, Horadagoda A, Edwards SE, Eckersall PD. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Veterinary Record* 1999; 144: 437-41.

Horst E, Kvidera S, Baumgard L. Invited review: The influence of immune activation on transition cow health and performance—A critical evaluation of traditional dogmas. *Journal of Dairy Science* 2021; 104: 8380-410.

Humblet MF, Guyot H, Boudry B, Mbayahi F, Hanzen C, Rollin F, Godeau JM. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. *Veterinary Clinical Pathology* 2006; 35: 188-93.

Huzzey J, Duffield T, LeBlanc S, Veira D, Weary D, Von Keyserlingk M. Haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 621-5.

Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2011; 3: 118-127.

Jamali H, Barkema HW, Jacques M, Lavallée-Bourget E-M, Malouin F, Saini V, Stryhn H, Dufour S. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 4729-46.

Kadzere CT, Murphy M, Silanikove N, Maltz E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 2002; 77: 59-91.

Kalmus P, Simojoki H, Pyörälä S, Taponen S, Holopainen J, Orro T. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *Journal of Dairy Science* 2013; 96: 3662-70.

King M, LeBlanc S, Pajor E, Wright T, DeVries T. Behavior and productivity of cows milked in automated systems before diagnosis of health disorders in early lactation. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 4343-56.

Kovac G, Popelkova M, Tkacikova L, Burdova O, Ihnat I. Interrelationship between somatic cell count and acute phase proteins in serum and milk of dairy cows. *Acta Veterinaria Brno* 2007; 76: 51-7.

Lai I-H, Tsao JH, Lu YP, Lee JW, Zhao X, Chien FL, Mao SJ. Neutrophils as one

of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk. *Veterinary Research* 2009; 40: 1.

Lomborg S, Nielsen L, Heegaard PM, Jacobsen S. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Veterinary Research Communications* 2008; 32: 575-82.

Macmillan K, Gobikrushanth M, Behrouzi A, Hoff B, Colazo MG. Prevalence of early postpartum health disorders in Holstein cows and associations with production, reproduction, and survival outcomes on Alberta dairy farms. *The Canadian Veterinary Journal* 2021; 62: 273-80.

Mansfeld R, Hoedemaker M, De Kruif A. "Einführung in die Bestandsbetreuung" In: *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. De Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M, eds. Stuttgart: Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH 2014: 13-23.

McArt J, Nydam D, Oetzel G. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 5056-66.

McArt JA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal* 2013; 198: 560-70.

Nielsen BH, Jacobsen S, Andersen P, Niewold TA, Heegaard PM. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Veterinary Record* 2004; 154: 361-5.

Ospina P, Nydam D, Stokol T, Overton T. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science* 2010; 93: 546-54.

Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W. Evaluation of the Metricheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2009; 92: 5429-35.

Pohl A, Burfeind O, Heuwieser W. The associations between postpartum serum haptoglobin concentration and metabolic status, calving difficulties, retained fetal membranes, and metritis. *Journal of Dairy Science* 2015; 98: 4544-51.

PraeRi (2020) Tiergesundheit, Hygiene und Biosicherheit in deutschen Milchkuhbetrieben – eine Prävalenzstudie (PraeRi). Abschlussbericht, 30.06.2020. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, https://ibi.tiho-hannover.de/praeRi/pages/69#_AB (06.03.2024)

Pyörälä S, Hovinen M, Simojoki H, Fitzpatrick J, Eckersall P, Orro T. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Veterinary Record* 2011; 168: 535-39.

Sheldon I, Noakes D, Rycroft A, Dobson H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Veterinary Record* 2001; 148: 172-5.

Simões P, Campbell M, Viora L, Gibbons J, Geraghty T, Eckersall P, Zadoks R. Pilot study into milk haptoglobin as an indicator of udder health in heifers after calving. *Research in Veterinary Science* 2018; 116: 83-7.

Smith BI, Donovan GA, Risco CA, Young CR, Stanker LH. Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis. *Veterinary Record* 1998; 142: 83-5.

Smith BI, Kauffold J, Sherman L. Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders. *Veterinary Journal* 2010; 186: 162-5.

Sordillo LM, Raphael W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and

inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 2013; 29: 267-78.

Stöber M, Gründer H, Dirksen G. Krankheiten von Leber und Gallenblase. In: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Dirksen G, Stöber M, Gründer H, eds. Stuttgart: Parey Verlag 2006: 627-65.

Suojala L, Orro T, Järvinen H, Saatsi J, Pyörälä S. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2008; 50: 1-10.

Suthar V, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2013; 96: 2925-38.

Tadich N, Tejada C, Bastias S, Rosenfeld C, Green LE. Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. *Veterinary Journal* 2013; 197: 401-5.

Tatone EH, Duffield TF, LeBlanc SJ, DeVries TJ, Gordon JL. Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of β -hydroxybutyrate in milk. *Journal of Dairy Science* 2017; 100: 1308-18.

Teng Z, Yang G, Wang L, Fu T, Lian H, Sun Y, Han L, Zhang L, Gao T. Effects of the circadian rhythm on milk composition in dairy cows: Does day milk differ from night milk? *Journal of Dairy Science* 2021; 104: 8301-13.

Thielen M, Mielenz M, Hiss S, Zerbe H, Petzl W, Schuberth H-J, Seyfert H-M, Sauerwein H. Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 2007; 90: 1215-9.

Thomas F, Geraghty T, Simões P, Mshelbwala F, Haining H, Eckersall P. A pilot

study of acute phase proteins as indicators of bovine mastitis caused by different pathogens. *Research in Veterinary Science* 2018; 119: 176-81.

Thomas FC, Waterston M, Hastie P, Parkin T, Haining H, Eckersall PD. The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd. *BMC Veterinary Research* 2015; 11: 1-10.

Thomas FC, Waterston M, Hastie P, Haining H, Eckersall PD. Early post parturient changes in milk acute phase proteins. *Journal of Dairy Research* 2016; 83: 352-9.

Tóthová C, Nagy O, Seidel H, Paulíková I, Kováč G. The influence of hoof diseases on the concentrations of some acute phase proteins and other variables of the protein profile in heifers. *Acta Veterinaria* 2011; 61: 141-50.

Vanholder T, Papen J, Bemers R, Vertenten G, Berge A. Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands. *Journal of Dairy Science* 2015; 98: 880-8.

Wenz JR, Fox L, Muller F, Rinaldi M, Zeng R, Bannerman D. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 2010; 93: 2458-70.

Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011; 140: 181-9.

Whitaker D, Macrae A, Burrough E. Disposal and disease rates in British dairy herds between April 1998 and March 2002. *Veterinary Record* 2004; 155: 43-7.

Wollowski L, Heuwieser W, Kossatz A, Addis M, Puggioni G, Meriaux L, Bertulat S. The value of the biomarkers cathelicidin, milk amyloid A, and haptoglobin to diagnose and classify clinical and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*

2021; 104: 2106-22.

Yang F, Friedrichs WE, Navarajo-Ashbaugh AL, Bowman B, Coalson J. Cell type-specific and inflammatory-induced expression of haptoglobin gene in lung. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1995; 73: 433-40.

IX. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung einiger wichtiger Menschen nicht zustande gekommen und niemals zu Ende geführt worden.

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Mansfeld für die Überlassung des Dissertationsthemas. Vielen Dank für Ihre Unterstützung während der letzten fünf Jahre, die schnelle Hilfe bei drängenden Fragen und für das Teilen Ihrer Expertise & Erfahrung. Nicht zuletzt, danke für das schnelle Weiterleiten meiner Bewerbungs-Mail kurz vor Bewerbungsschluss für die Doktorandenstelle – ohne Sie wäre vieles nie passiert!

Ganz besonders danke ich auch den Partnern im Projekt „MetAlarm“; allen voran dem MPR Bayern e.V., dem LKV Bayern e.V., milch.bayern e.V., dem Bayrischen Milchförderungsfonds, der University of Wisconsin-Madison und der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München.

Dr. Christian Baumgartner möchte ich für sein Vertrauen danken, das er uns in jeder Phase des Projektes entgegengebracht hat. Sie haben andere Meinungen stets geschätzt, Diskussionen und freies Arbeiten gefördert, und dennoch immer ein offenes Ohr für aufkommende Probleme gehabt. Ohne Ihr Engagement und Ihre Begeisterung hätte es das „MetAlarm“-Projekt nie gegeben.

Ein riesiger Dank gebührt auch Dr. Martin Kammer, der mich auf dem Weg durch die statistische Datenaufarbeitung aus anderthalb Jahren Projektarbeit begleitet hat. Danke für deine Argusaugen mit dem Blick für die Details, deinen wertvollen Input, dein Feedback und deine humorvolle Art. Möge die Macht stets mit dir sein!

PD Dr. habil Florian Trefz (aka „der beste inoffizielle Betreuer der Welt“) danke ich für nächtliche Ratschläge zur Formulierung von Anschreiben an die Schriftleitung, für das kurzfristige Organisieren von Veröffentlichungen, die über die Uni-Zugänge nicht zu bekommen waren, fürs Feedback, für einen gelegentlichen Tritt in den Hintern und nicht zuletzt für entspannte Tage in den Bergen, um den Kopf frei zu bekommen.

Euch, dem Münchner Harem, Angie & Max, Stanglos, den Praxismädels, und allen anderen besten Freunden, danke ich für die gemeinsame Zeit, die Verbundenheit

IX. Danksagung

und das Mitfiebern. Danke, dass ihr seit langer Zeit so viele Schritte des Weges mit mir gemeinsam geht und ich mich immer auf euch verlassen kann.

Dasselbe gilt für meine Teampartnerin Nici, mit der mich inzwischen nicht nur die gemeinsamen Fahrten in alle Teile Bayerns, Schwächeanfälle in der Liegebox und das Untersuchen unzähliger (wirklich vieler!) Kühe verbindet, sondern auch eine tolle Freundschaft. Danke für deine Sicht auf die Welt und deine unfassbar positive & gelassene Art. Ich hätte mir keine bessere Projektpartnerin vorstellen können und schätze dich als Tierärztin und als Freundin wirklich sehr!

Meiner Familie, Barbara, Claus, Elena, Rolf und Gabi, möchte ich für die fortwährende Unterstützung, den Zuspruch, und das Ermöglichen des Tiermedizin-Studiums danken. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter Barbara, die mit ihrer Stärke, solange ich denken kann, das Rückgrat der Familie bildet und die für mich bis heute in vielen Situationen ein Vorbild ist. Du bist die Meisterin im „alles unter einen Hut kriegen“ und ich bin stolz darauf, wie du die letzten zwei Jahre gestemmt hast.

Last but not least: Ohne meinen Mann Stefan hätte ich wohl niemals die Motivation aufgebracht, um diese Arbeit fertig zu schreiben. Danke für einfach ALLES. Du hast mich von Anfang an mit Rat & Tat begleitet und bedingungslos unterstützt, hast mit Geduld den Stress der letzten Wochen ertragen, bist mein schärfster Kritiker und mein größter Fan. Ich freue mich auf die nächsten Abenteuer, die das Leben für uns bereithält und bin unendlich froh, dich an meiner Seite zu haben.