



# Leitfaden zur Routineuntersuchung mit dem fluoreszenzoptischen Zellzählgerät

## 1 Allgemeines

Die Ermittlung der somatischen Zellen in der Anlieferungsmilch ist von hoher wirtschaftlicher Bedeutung und ist ein wichtiger Bestandteil der Gütebewertung. Die Überprüfung der somatischen Zellen ist in der EU Verordnung Nr. 853/2004 vorgeschrieben.

## 2 Anwendungsbereich

Dieser Leitfaden legt allgemeine Kriterien fest, die bei der fluoreszenzoptischen Zählung von somatischen Zellen in Rohmilch und chemisch konservierter Milch nach IDF Standard 148-2:2006 - Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters / ISO13366-2:2006 (Milch – Zählung somatischer Zellen – Teil 2: Leitfaden zum Betrieb fluoreszenzoptoelektronischer Zählgeräte) einzuhalten sind. Ganz besonderer Wert wird dabei auf die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Untersuchungsgeräte gelegt. Dieser Leitfaden bezieht sich hauptsächlich auf den Gebrauch von Zellzahlgeräten der Firma Foss, Die Vorgaben zur Geräteüberprüfung können aber auch auf Analysengeräte anderer Hersteller übernommen werden.

**Abweichungen vom ISO/IDF-Standard sind entsprechend begründet und dokumentiert.**

## 3 Probenvorbereitung

Alle zur Messung kommenden Proben sind, soweit in der Praxis möglich, einer Sichtprüfung zu unterziehen. Sinnfällig veränderte Proben sind von der Untersuchung auszuschließen.

Die unkonservierten Proben werden bis zur Untersuchung bei + 0 bis + 6 ° Celsius (C) gelagert und sollten innerhalb 48 Stunden nach der Probenahme untersucht werden.

**Abweichend von der Norm wird eine Lagerungstemperatur von + 2 bis + 8 ° C akzeptiert.**

Falls eine chemische Konservierung für notwendig gehalten wird, sollte die gekühlte Untersuchungsprobe so schnell wie möglich konserviert werden, in jedem Fall jedoch innerhalb von 24 h nach der Probenahme. In allen Fällen sollte die Untersuchungsprobe bis zur Zugabe des Konservierungsmittels kühl (0 °C bis 6 °C) gelagert werden. Mit Natriumazid konservierte Proben können bei 2 °C bis 10 °C für weitere 72 h gelagert werden. Mit Bronopol konservierte Proben können bei 2 °C bis 12 °C für weitere 6 Tage gelagert werden.

Die Proben werden vor der Untersuchung auf  $40 \pm 3^\circ \text{C}$  erwärmt. Die Erwärmung der Proben erfolgt in einem Wasserbad mit Umwälzung, einstellbar auf  $40 \pm 1^\circ \text{C}$ . Es können auch andere Erwärmungssysteme (z.B. Heißluft) zum Einsatz kommen, wenn die Probentemperatur von  $40 \pm 3^\circ \text{C}$  eingehalten wird.



Die Proben müssen nach der Erwärmung innerhalb von 30 Minuten untersucht werden, damit die Zellzahl- und Inhaltsstoffbestimmung nicht negativ beeinflusst wird. Das Durchmischen der Probe vor der Analyse hat so zu erfolgen, dass die Milch nicht in den für die Qualitätskontrolle zu bestimmenden Parametern verändert wird.

## **4 Durchzuführende Kontrollen im Routinebetrieb**

Für die verschiedenen Geräteüberprüfungen und Wartungsarbeiten sind die Anweisungen der Herstellerfirma zu berücksichtigen.

### **4.1 Chemikalien und Arbeitslösungen**

Bei der Vorbereitung der Arbeitslösungen sind die Herstellerangaben einzuhalten. Die eingesetzten Chemikalienchargen werden in einem Formular vermerkt (Bezeichnung, Chargennummer, Verfall, Datum Wareneingang, erster und letzter Einsatz). Das verwendete Wasser sollte demineralisiert sein und die vom Hersteller geforderte Reinheit aufweisen.

#### **Überprüfung Volumina Reagenzien:**

Die Überprüfung des effektiven Verhältnisses der Volumina Puffer- zur Farbstofflösung im Mischbehälter ist bei der Fossomatic 5000 und Fossomatic FC nicht möglich. Nach einer Wartung oder bei Geräteproblemen sollte das Verhältnis der Volumina Puffer- zur Farbstofflösung aber trotzdem beim Ausgang der „mixing pump“ überprüft werden (die korrekte Funktion der Ventile bis zum Mischbehälter kann damit aber nicht kontrolliert werden).

### **4.2 Überprüfung der Funktionsfähigkeit**

#### **4.2.1 Täglich durchzuführende Kontrollen**

##### **4.2.1.1 Startroutine**

#### **Vorbereitung des Untersuchungsgerätes zur Untersuchung:**

- Laut Herstellerangaben

#### **Proben zur Gerätstabilisierung:**

- Mindestens 10 Einzelmessungen durchführen (mit Milch oder Spüllösung). Durch die abwechselnde Untersuchung von 2 Milchproben, 2 Spüllösungen 2 Milchproben usw. kann bereits in der Startroutine die Verschleppung des Analysegerätes (carry over) überprüft werden (zulässige Toleranz für die Spüllösung: alle Einzelwerte  $< 8$ )

#### **Blindproben:**

- 5 Einzelmessungen durchführen
- Zulässige Toleranz: alle Einzelwerte  $< 8$  ; Mittelwert  $\leq 3$

### Überprüfung der Wiederholpräzision:

- Die Wiederholpräzision ist täglich mit 10 Wiederholungsmessungen einer Versuchsprobe oder mit je 5 Wiederholungsmessungen von 2 unterschiedlichen Versuchsproben bei Inbetriebnahme entsprechend den Anweisungen des Herstellers zu prüfen. Dabei können Kalibrier- oder Pilotproben verwendet werden.
- Toleranzen für die relative Standardabweichung (sollte in nicht mehr als 5% der Fälle größer sein):

Anzahl der Zellen/ml	$S_r$ %	$r$ Zellen/ml
150 000	6	25 000
300 000	5	42 000
450 000	4	50 000
750 000	3	63 000
1 500 000	3	126 000

- Hinweis: Die Toleranzen für die Wiederholpräzision und Vergleichspräzision innerhalb des Labors gelten für Kuhmilch. Die Präzisionsdaten für Milch anderer Tierarten können weiter abweichen.

### Festlegung Vorgabewert Pilotprobe

Als Pilotprobe wird eine frische Rohmilch mit normaler Zusammensetzung und guter Qualität verwendet. Sie wird in der Startroutine und zur laufenden Überwachung der Messgeräte eingesetzt. Sie kann je nach Verwendungszweck konserviert oder unkonserviert eingesetzt werden. Die davon abhängigen Lager- und Haltbarkeitsbedingungen sind zu beachten.

Die vorbereiteten Pilotproben werden bis zum Zeitpunkt der Verwendung bei +2 bis +8 °C gelagert.

Vor der Festlegung des Vorgabewertes der Pilotprobe ist das Messniveau der Geräte mittels Kalibrier- und/ oder Pilotprobe zu überprüfen (mindestens 5 Einzelmessungen).

Anschließend wird der neue Vorgabewert wie folgt festgelegt:

- von mindestens 3 Probeflaschen je 3 Einzelmessungen durchführen
- sind in einem Labor mehrere Analysengeräte im Einsatz, sollte für die Festlegung des Vorgabewertes die neue Pilotprobe auf allen aktiven bzw. auf mindestens 3 Analysengeräten untersucht werden
- Der neue Sollwert wird aus allen verfügbaren Einzelwerten ermittelt (wurden mehrere Geräte zur Sollwertfestlegung eingesetzt, ist ein Ausreißertest z.B. nach Grubbs empfehlenswert)



- Alternativ kann der Sollwert auch mit einem Mastergerät festgelegt werden.

#### **Pilotprobenuntersuchung:**

- Vor Untersuchungsbeginn ist mindestens eine Pilotprobe zu untersuchen.

#### **Zulässige Toleranz: siehe Punkt 4.2.1.2 Punkt Pilotprobenuntersuchung 4.2.1.2 Routinekontrollen**

#### **Pilotprobenuntersuchung:**

- Nach 50 Proben ist im Routinebetrieb mindestens eine Pilotprobe zu untersuchen (zumindest dreimal je Stunde ist eine Pilotprobe zu untersuchen).
- Die zulässige Toleranz zum Starttroutinemittelwert beträgt:
  - $> 150.000/ \text{ ml}$ :  $\pm 10 \%$
  - $\leq 150.000/ \text{ ml}$ :  $\pm 15.000/\text{ml}$

Werden die oben genannten Toleranzen überschritten, wird eine neue Pilotprobe angewärmt und untersucht. Vorher kann eine Blindproben-Überprüfung durchgeführt werden. Wird die Abweichung bestätigt, muss das Problem behoben und der Probenzyklus nach untersucht werden.

Die Auswertung der Kontrollmilch kann auch über eine Regelkarte erfolgen (Kontrollblatt nach ISO 8196-2/IDF 128-2)

#### **Blindproben:**

Die laut ISO/IDF-Standard vorgesehene Überprüfung der Blindproben in der Routineuntersuchung nach höchstens 100 Proben oder alle 2 Stunden (je nachdem, was zuerst eintritt) ist nicht umsetzbar und wird deshalb nicht umgesetzt, da diese Gerätekontrolle von der Foss-Software nicht unterstützt wird.

#### **4.2.2 Wöchentlich durchzuführende Kontrollen**

##### **Kalibrierproben (Referenzmaterial)**

- Mindestens 5 Einzelmessungen durchführen
- Zulässige Toleranz:  $\pm 10 \%$  (bei Zellgehalt  $> 100.000/\text{ml}$ ) bzw. nach Herstellerangaben.

#### **4.2.3 Monatlich durchzuführende Kontrollen**

##### **Verschleppungsprüfung**

Nur nach einer kompletten Wartung des Gerätes wird der Verschleppungsfaktor ermittelt und im Gerät gespeichert. Bei der monatlichen Verschleppungsprüfung wird der



Verschleppungsfaktor nur überprüft, aber NICHT im Gerät gespeichert.

Bei der Verschleppungsprüfung ist eine Rohmilch mit einer Zellzahl > 750 000/ml vorzubereiten. Mindestens 5 Sequenzen einer Untersuchungsprobe mit einer Anzahl von mindestens 750 000 somatischen Zellen je Milliliter, gefolgt von 2 Blindproben sollten gemessen werden. Interpretation der Analysenergebnisse:

- 1. Blindprobe hoch bedeutet, dass die Verschleppung hoch ist
- 2. Blindprobe hoch weist auf mögliche Verunreinigungen im Gerät hin.

Formel für die Berechnung des Verschleppungsfaktors:

$$\text{Verschleppungswert} = ((\sum \text{Blind1} - \sum \text{Blind2}) / (\sum \text{Zellzahl Probe} - \sum \text{Blind 2})) * 100$$

Der resultierende Verschleppungswert darf max. 1 % betragen.

### Überprüfung Wiederholpräzision:

Monatlich sollten 20 verschiedene einzelne Untersuchungsproben doppelt in aufeinander folgenden Durchläufen untersucht werden.

Toleranzen: siehe Routinekontrollen „Überprüfung der Wiederholpräzision“

### Überprüfung Vergleichspräzision innerhalb des Labors:

Verfügbare Einzelergebnisse aus Prüfungen der Wiederholpräzision dürfen auch verwendet werden, um die Vergleichspräzision innerhalb des Labors zu prüfen.

Die absolute Differenz der Ergebnisse von zwei voneinander unabhängigen Bestimmungen sollte in nicht mehr als 5% der Fälle größer sein:

Anzahl der Zellen/ml	$S_{Rintra}$ %	$r_{intra}$ Zellen/ml
150 000	7	29 000
300 000	6	50 000
450 000	5	63 000
750 000	4	84 000
1 500 000	4	168 000

### Kalibrierproben (Referenzmaterial):



Vor der Kalibrierung sollte nachgeprüft werden, dass das Gerät einwandfrei funktioniert und die Anforderungen hinsichtlich Blindproben, Verschleppung und Wiederholpräzision erfüllt werden.

Die Kalibrierung erfolgt mit mindestens fünf Kalibrierproben, die den maßgeblichen Bereich der Anzahl der somatischen Zellen abdecken (Kuhmilch Herdengemelk 100 000 – 1 000 000, Kuhmilch einzelne Tiere 100 000 - 2 000 000).

Auswertung über Berechnung der linearen Regression - zulässige Toleranz:

- Mittelwert Messwerte darf max. 5 % vom Mittelwert der Referenzwerte abweichen
- Slope  $1 \pm 0,05$  (Berechnung mit Intercept 0)

Mit dieser Prüfung kann auch die Prüfung auf Linearität verbunden werden.

#### 4.2.4 Prüfung der Linearität

Die Überprüfung der Linearität ist zumindest nach jeder Wartung bzw. mindestens zweimal jährlich durchzuführen. Diese Überprüfung kann mit der Überprüfung der Kalibrierung kombiniert werden.

Erfolgt eine getrennte Überprüfung mit einem im Laboratorium vorbereiteten Probenset, kann eine Milch mit hoher Zellzahl, die fortlaufend mit Milch niedriger Zellzahl verdünnt wird, verwendet werden. Mindestens 5 Proben sollen eingesetzt werden, welche den Konzentrationsbereich abdecken.

Vorbereitung Probenset für Linearitätsprüfung (vorgeschlagene Milchmenge ist ausreichend zur Überprüfung von 1 Analysegerät):

- mindestens 500 ml Milch mit  $< 20\,000$  somatischen Zellen / ml vorbereiten (= Probe 1)
- mindestens 500 ml Milch mit  $1\,000\,000 - 1\,500\,000$  somatischen Zellen / ml zusammenschütten oder vom Milcherzeuger holen (= Probe 5)
- Je 200 ml von den durchmischten Proben 1 und 5 zusammenmischen (= Probe 3)
- Je 100 ml von den durchmischten Proben 1 und 3 zusammenmischen (= Probe 2)
- Je 100 ml von den durchmischten Proben 3 und 5 zusammenmischen (= Probe 4)

Von der Probe 1 und 5 werden je 2 Proben in Vierfachbestimmung gemessen und der Mittelwert errechnet. Die Werte für die Zwischenproben werden nach dem angewendeten Mischverhältnis jeder einzelnen Probe berechnet. Die Proben 1 bis 5 werden mindestens in Vierfachbestimmung gemessen und für jede Probe wird das Durchschnittsergebnis berechnet.

Es wird eine lineare Regression bei den erwarteten Werten je Probe auf der x-Achse und auf der y-Achse bei den tatsächlich gemessenen Werten je Probe angewendet.



Die Residuen  $e_i = y_i - (bx_i + a)$  werden aus der Regression berechnet. Die Residuen  $e_i$  (y-Achse) werden den erwarteten Werten (x-Achse) in einer Grafik gegenübergestellt. Eine visuelle Untersuchung der Datenpunkte wird üblicherweise ausreichend Auskunft über die Linearität des Signals geben. Jedes gegebenenfalls außerhalb liegende Residuum sollte dazu führen, das entsprechende Ergebnis zu streichen und die Berechnung vor der nächsten Untersuchung erneut durchzuführen.

Wenn alles beachtet wurde, ist es zulässig, die Kurve durch das Verhältnis,  $r_C$  nach folgender Gleichung zu beschreiben:

$$r_C = ((e_{\max} - e_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})) * 100$$

Dabei ist

$e_{\max}$  der Zahlenwert des oberen Residuums aus der Regression;

$e_{\min}$  der Zahlenwert des unteren Residuums aus der Regression;

$M_{\max}$  der Zahlenwert der oberen Geräteablesung für den betroffenen Satz Proben

$M_{\min}$  der Zahlenwert der unteren Geräteablesung für den betroffenen Satz Proben

Das Verhältnis  $r_C$  sollte kleiner als 2% sein.

## 5 Empfehlungen

### **Anwendung auf Milch anderer Tierarten:**

Der Einfluss von hohem Fett- und Proteingehalt oder anderen Einflussfaktoren ist bei den verschiedenen Tierarten zu prüfen. Falls ein erheblicher Einfluss beobachtet wird, sollte eine Anpassung des Gerätes und/oder des Zählverfahrens in Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Geräteherstellers vorgenommen werden.

### **Konservierung der Proben:**

Borsäure, Natriumazid, Bronopol und Kaliumdichromat sind geeignete Konservierungsmittel. Bei den jeweiligen Konservierungsmitteln und beigemischten Farbindikatoren ist zu beachten, dass die Endkonzentration eingehalten wird. Abhängig vom eingesetzten Konservierungsmittel, ist die maximale Lagerzeit und die Lagerungstemperatur einzuhalten.

Andere Konservierungsmittel und Farbindikatoren dürfen verwendet werden, vorausgesetzt, dass deren Wirksamkeit und Beschaffenheit validiert worden ist.

### **Externe Vergleiche:**

Mindestens zweimal im Jahr ist an Ringversuchen mit Laborleistungstest teilzunehmen. Der maßgebliche Zählbereich sollte von mindestens 10 Proben abgedeckt werden, wo jeweils eine



Doppelbestimmung gemacht wird.

### **Wartung:**

Die Häufigkeit der Wartungsarbeiten ist abhängig von der Anzahl der untersuchten Proben und kann deshalb je nach Gerätelaufzeit variieren.

### **Überprüfung Volumina Untersuchungsprobe:**

Bei der Fossomatic 5000 und Fossomatic FC sollte zumindest wöchentlich überprüft werden, dass die zu untersuchende Probe bis zur Peristaltikpumpe angesaugt wird (visuelle Kontrolle).

### **5.1 Maßnahmen bei Nichteinhalten der Grenzwerte**

Werden die Toleranzen nicht erreicht, sind Gerät und Untersuchungsreagenzien gemäß Anleitung des Herstellers auf Fehlermöglichkeiten zu prüfen, die Ursachen zu beheben und der Gerätecheck zu wiederholen. Kann die Ursache durch das Bedienungspersonal nicht ermittelt bzw. nicht behoben werden, entscheidet der Labor- oder Bereichsleiter über das weitere Vorgehen.

### **5.2 Empfehlung für die Fossomatic FC und Fossomatic 5000 - Anlage**

- In der Startroutine prüfen, ob sich der Mittelwert (Mean) der Zellzahlprobe zwischen 60 und 100 befindet (PHA- Bild) – Dokumentation in der Checkliste.
- Wöchentlich, oder nach Bedarf sollten Kalibrierproben eingesetzt werden. Die Grenzwerte für den Mittelwert und Zählwert werden vom Hersteller geliefert und sind einzuhalten.
- Alle 6 Betriebsstunden und bei Arbeitsende sollte eine Rückspülung der Durchflussmesszelle (Flowcell- Flush) und eine Spülung des Abflußschlauches (Waste Flush) durchgeführt werden.
- Bei Problemen sind folgende Punkte zu überprüfen bzw. durchzuführen:
  - Trägerflüssigkeitsmenge
  - Reinigung der Messzelle
  - Messzelleneinstellung
  - Lampeneinstellung
  - Verhältnis Farbstoff zu Pufferlösung (optische Kontrolle)
- Extended Rinse wöchentlich bzw. nach ca. 25.000 Proben mittels FOSS- Programm durchführen.

### **Wartungsarbeiten wöchentlich:**

- Filtereinsätze Ansaugstutzen reinigen
- Filter Rinse- und Sheat Liquid reinigen

### **Wartungsarbeiten monatlich:**





- Luftfilter reinigen bzw. bei Bedarf austauschen (auch unter der Lampe)
- Dichte der 3 Kolbenspritzen prüfen
- Inline- Filter im Ultraschallbad reinigen bzw. bei Bedarf austauschen.
- DC-Test durchführen, blaue und rote Linie überprüfen (lange Messzeit aktivieren)
- Reinigung Kunststoffbehälter für Arbeitslösungen mit heißem Wasser + Ammoniak

#### **Vierteljährlich:**

- Schläuche der peristaltischen Pumpe austauschen
- Reinigung der Abfall-, Sheat Liquid- und Mischkammer

#### **Halbjährlich:**

- Alle Verbindungsschläuche und T-Stücke austauschen

#### **Jährlich:**

- Revision der 3 Dosierspritzen, der Mixing Pump und der problematischen Ventile
- Filtereinsätze in Ansaugstutzen austauschen
- Filter für Trägerflüssigkeits- und Spülpumpe austauschen
- Dye-Anschluss reinigen

Hinweis: Die Häufigkeit Wartungsarbeiten durchzuführen und die Häufigkeit Verschleißteile auszutauschen ist abhängig von der untersuchten Probenanzahl.

## **6 Mitgeltende Dokumente**

Diese Kontrollen sind als Erweiterung zum IDF-Standard 148-2:2006 - Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters/ ISO Standard 13366-2:2006 (Milch – Zählung somatischer Zellen – Teil 2: Leitfaden zum Betrieb fluoreszenzoptoelektronischer Zählgeräte) und den Anweisungen der Herstellerfirma zu verstehen.

## **7 History- Chart**

- Version 1.01 vom 22.06.2004, Originalversion
- Version 1.02 vom 08.02.2011, Anpassung an FIL/IDF 148:2006 / ISO 13366:2006