

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Allgemeines

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum Juni 2003 bis Mai 2004 in einem Milchviehbetrieb in Brandenburg durchgeführt. Dieser Betrieb befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchungen im zweiten Jahr der Umstellungsphase auf eine ökologische Wirtschaftsweise. Die Betriebsumstellung hatte im Juli 2002 begonnen. Die Betriebsgröße lag bei 280 Milchkühen und 250 weiblichen Jungrindern aus eigener Nachzucht.

Pflanzenbau, Fütterung und Haltung fanden nach ökologischen Richtlinien statt, die Behandlung der Tiere erfolgte noch weitestgehend konventionell. Alle laktierenden Kühe wurden dreimal täglich in einem Doppel-Zehner-Fischgrätenmelkstand gemolken. Die Zwischenmelkzeiten betragen ca. acht Stunden. Die erzeugte Milch wurde konventionell vermarktet.

Die jährliche Milchleistung pro Kuh lag im Durchschnitt bei ca. 9000 kg. Bei den untersuchten Rindern handelte es sich um Tiere der Rasse Holstein Frisian. Die Unterbringung der melkenden Kühe erfolgte ganzjährig in Laufställen mit planbefestigtem Boden und Stroh Einstreu, die einmal täglich gemistet und neu eingestreut wurden. Die Trockensteher und Vorbereiter wurden auf Tiefstreu gehalten, nach Bedarf alle 2-3 Wochen ausgemistet und in zweitägigem Abstand mit Stroh übergestreut.

Gefüttert wurde eine Mehrkomponentenration, die als totale Mischration per Futtermischwagen zweimal täglich vorgelegt wurde. Zusätzlich wurde das Futter viermal täglich an das Fressgitter herangeschoben. In der Vorbereitergruppe (2-0 Wochen ante partum) wurden saure Salze zur Gebärpareseprophylaxe eingesetzt. Ziel der Sauren-Salze-Fütterung ist das Hervorrufen einer leichten metabolischen Azidose innerhalb der physiologischen Grenzen, um sowohl die Kalziummobilisation aus dem Knochen als auch die Kalziumresorption aus dem Darm zu aktivieren und damit die Kalziumverfügbarkeit nach dem Abkalben zu verbessern (STAUFENBIEL et al. 2003).

### 3.2 Auswahl der Probanden

Für die Probenentnahme wurden nur Tiere herangezogen, die äußerlich keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung erkennen ließen. Die für die Untersuchung in Frage kommenden Kühe wurden in Abhängigkeit von den Laktationstagen in verschiedene Gruppen eingeordnet.

- Gruppe 1: Kühe 6 bis 3 Wochen ante partum (frühe Trockensteher)
- Gruppe 2: Kühe 2 bis 0 Wochen ante partum (Vorbereiter)
- Gruppe 3: Kühe 0 bis 1 Woche post partum
- Gruppe 4: Kühe 3 bis 5 Wochen post partum
- Gruppe 5: Kühe 15 bis 18 Wochen post partum
- Gruppe 6: Kühe 25 bis 30 Wochen post partum
- Gruppe 7: Kühe 35 bis 40 Wochen post partum

Zusätzlich wurden noch Junggrinder und Kälber untersucht.

- Gruppe 8: Besamungsfärsen (>12 Monate)
- Gruppe 9: Kälber (1. Lebenswoche)
- Gruppe 10: Kälber (4. Lebenswoche)

Pro Gruppe wurde jeweils eine Stichprobe von zehn Tieren untersucht, deren Auswahl zufällig erfolgte.

### 3.3 Probenentnahme

Als Probenmaterial wurden Blut und Harn entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Schwanzvene oder Schwanzarterie. Das Blut wurde in

- 10-ml-Röhrchen ohne Antikoagulanzen (Fa. Sarstedt) zur Serumgewinnung
- 5-ml-EDTA-Röhrchen (Fa. Sarstedt) für die hämatologische Untersuchung aufgefangen.

Für die Harnuntersuchung wurden die Tiere handbreit unterhalb der Vulva massiert und der daraufhin spontan abgesetzte Harn aufgefangen. Bei Tieren, die keinen Harn absetzten, wurde mit Hilfe des Uteruskatheters nach BRESLAU eine Harnprobe entnommen. Der Harn wurde

in 100-ml-Versandflaschen (Fa. Sarstedt) aufgefangen. Von den Gruppen 2-5 wurden monatlich jeweils zehn Blut- und Harnproben pro Gruppe genommen. In der Gruppe 1 (Trockenstehher) wurden einmal im Monat zehn Harnproben genommen. Eine Blutprobenentnahme erfolgte nur nach Bedarf. In der Gruppe 2 (Vorbereiter) wurden zusätzlich zu der monatlichen Untersuchung weitere Harnuntersuchungen durchgeführt, bei der ebenfalls zehn Tiere zur Probenentnahme herangezogen wurden. Von den Kühen der Gruppen 6 und 7 wurden nur Blutproben genommen. Nach Bedarf wurden weitere Gruppen und Parameter zusätzlich untersucht oder der Zeitabstand zwischen den Probenentnahmen verändert.

Einmal im Monat erfolgte zum Zeitpunkt der Probenentnahme die sonographische Messung der Rückenfettdicken der laktierenden Herde. Die Rückenfettdickenmessung der trockenstehenden Gruppen 1 und 2 erfolgte zweimal im Monat. Für die Rückenfettdickenmessung (nach STAUFENBIEL u. SCHRÖDER 2004) wurde ein transportables Ultraschallgerät mit 5 MHz Schallkopf verwendet. Für die Messung wurde ein Messpunkt auf der gedachten Verbindungslinie zwischen dem oberen Bereich des Tuber coxae und dem oberen Bereich des Tuber ischiadicum etwa handbreit kranial des Tuber ischiadicum gewählt. Handelsüblicher Brennspiritus wurde als Kopplungsmittel auf die nicht enthaarte Haut aufgetragen. Die Haut und das subkutane Fett wurden bis zur Fascia trunci profunda gemessen. Die so gemessene Rückenfettdicke wird in Millimeter angegeben und beinhaltet neben der Fettdicke auch die Hautdicke. Die Beurteilung der Rückenfettdicken erfolgt anhand von Referenzwerten (nach SCHRÖDER 2000).

### **3.4 Probenaufbereitung**

Die Blutproben zur Serumgewinnung wurden nach der Probenentnahme noch im Betrieb 15 Minuten bei 4.000 U/min zentrifugiert. Von den zehn zu einer Gruppe gehörenden Einzelproben wurde jeweils 1 ml Serum in ein Sammelröhrchen pipettiert und gemischt. Dieses Mischserum wurde als Poolprobe bezeichnet. Die Einzel- und Poolproben wurden im Kühlschrank bei 4-10°C gekühlt und am folgenden Tag im Labor der Klinik für Klauentiere an der Freien Universität Berlin bestimmt. 3-4 ml der Serumpoolproben wurden jeweils per Kurier an das Veterinärmedizinische Labor des Instituts für klinische Prüfung Ludwigsburg GmbH gesendet. Die EDTA-Blut-Einzelproben für die hämatologische Untersuchung wurden 10-15 Minu-

ten geschwenkt, danach wurden jeweils 250 µl Blut jeder Einzelprobe für die Bildung der entsprechenden Poolprobe verwendet.

Die Harnuntersuchung erfolgte im Labor der Klinik für Klautiere. Die Harnproben wurden vom Entnahmezeitpunkt bis zur Bearbeitung gekühlt gelagert. Auch hier erfolgte eine Poolprobenbildung. Dafür wurden jeweils 6 ml einer Einzelprobe der zehn zu einer Gruppe gehörenden Einzelproben in das Sammelröhrchen gegeben.

### 3.5 Laboranalytische Untersuchungen

Die gewonnenen Proben wurden unterschiedlichen Analyseverfahren unterzogen. Dabei wurden mit Ausnahme der Harnproben der Gruppe 2 nur die gebildeten Poolproben untersucht. Bei der Harnuntersuchung der Gruppe 2 wurden sowohl die Einzelproben als auch die daraus gebildeten Poolproben analysiert. Die Analysen wurden an der FU Berlin im Labor der Klinik für Klautiere durchgeführt, mit Ausnahme der  $\beta$ -Carotin- und Selen-Bestimmung, die im Veterinärmedizinischen Labor des Instituts für klinische Prüfung Ludwigsburg durchgeführt wurde. Für die Beurteilung der Ergebnisse werden die Referenzwerte des Untersuchungs-labors herangezogen, in dem die Proben analysiert wurden. Die angewendeten Analysemethoden und die untersuchten Parameter sind in den Tabellen 12-14 aufgeführt. Zusätzlich wurden Futtermittelproben aus den Rationen der verschiedenen Laktationsgruppen entnommen und im Analytiklabor für Landwirtschaft und Umwelt, Parchim oder im Umwelt- und Agrarlabor GmbH, Fehrbellin analysiert. Die Ergebnisse der Futtermitteluntersuchungen sind in Anhang D (Tab.109-111) aufgeführt.

Tab.12: Parameter im EDTA-Blut

Parameter	Analysenmethoden
Hämoglobin	Blutzellzählgerät; NOVA Celltrak 12
Hämatokrit	dto.
Erythrozyten	dto.
Leukozyten	dto.
Thrombozyten	dto.

Tab.13: Serumparameter

Parameter	Analysenmethoden
Bilirubin	DPD-Methode; Hitachi 704 Automatic Analyzer
Kreatinin	Optimierte Standardmethode <sup>1)</sup> ; Hitachi 704 Automatic Analyzer
Harnstoff	nach NEUMANN u. ZIEGENHORN; Hitachi 704 Automatic Analyzer
ASAT	Optimierte Standardmethode <sup>1)</sup> ; Hitachi 704 Automatic Analyzer
CK	Optimierte Standardmethode <sup>1)</sup> ; Hitachi 704 Automatic Analyzer
Protein	Biuret-Methode; Hitachi 704 Automatic Analyzer
Albumin	Optimierte Standardmethode <sup>1)</sup> ; Hitachi 704 Automatic Analyzer
GLDH	Optimierte Standardmethode <sup>1)</sup> ; Hitachi 704 Automatic Analyzer
$\gamma$ -GT	nach PERSIJN u. v. d. SLIK; Hitachi 704 Automatic Analyzer
$\beta$ -Hydroxybutyrat	nach DARGEL; Hitachi 704 Automatic Analyzer
Magnesium	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Kalzium	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Phosphor	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Natrium	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Kalium	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Chlorid	Potentiometrie; Synchron EL-ISE Electrolyte Sys., Beckmann
Selen	Veterinärmedizinisches Labor Ludwigsburg
Eisen	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Kupfer	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Zink	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
$\beta$ -Karotin	Veterinärmedizinisches Labor Ludwigsburg

<sup>1)</sup> nach Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie<sup>2)</sup> Atomabsorptionsspektrometrie

Tab.14: Harnparameter

Parameter	Analysenmethoden
pH	pH-Meter, Fa. INOLAB
NSBA	titrimetrische Bestimmung nach KUTAS (1965)
Basen	dto.
Säuren	dto.
NH <sub>4</sub>	dto.
BSQ	dto.
Magnesium	AAS <sup>2)</sup> ; PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips
Kalzium	dto.
Natrium	dto.
Kalium	dto.
Chlorid	Potentiometrie; Synchron EL-ISE Electrolyte Sys., Beckmann

<sup>2)</sup>Atomabsorptionsspektrometrie

### 3.6 Statistische Methoden

Die Erfassung und statistische Auswertung der erzielten Werte erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 12.

a) Beurteilung der Milchleistungsdaten, Fruchtbarkeitsdaten und Rückenfettdicken

Für alle dargestellten Parameter lagen Einzelwerte vor, aus denen die arithmetischen Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichungen ( $s$ ), Minimum- und Maximum-Werte ( $x_{\min}$ ,  $x_{\max}$ ) und die Median-Werte ( $\tilde{x}$ ) berechnet wurden.

Mit dem KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test wurde das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Unabhängig davon, ob es sich um eine Normalverteilung oder um nicht normal verteilte Parameter handelte, wurden die oben genannten Lage- und Streuungsmaße berechnet und in tabellarischer Form angegeben. Abweichungen von den Referenzwerten sind in den Tabellen grau unterlegt dargestellt.

Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde für die entsprechenden Parameter eine einfaktorische Varianzanalyse (ONEWAY ANOVA) mit anschließendem POST HOC-Test (geringste signifikante Differenz (LSD)) durchgeführt. Mit diesem Test wurde für jeden normalver-

teilten Parameter getestet, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsmonaten vorliegen. Dabei wurde jeweils ein Monat mit dem nächstfolgenden Monat verglichen, so z.B. der Monat Juni 02 mit dem Monat Juni 03, Juni 03 mit Juli 03 usw. Der Monat Mai 04 wurde auf signifikante Unterschiede zum Monat Juni 03 getestet. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0,05$ ) festgelegt. Bei Auftreten von signifikanten Unterschieden wurde der entsprechende Mittelwert ( $\bar{x}$ ) des getesteten Monats mit dem Buchstaben A gekennzeichnet.

Bei Parametern, die keine Normalverteilung zeigten wurde zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Untersuchungsmonate der nichtparametrische KRUSKAL-WALLIS-H-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) wurden durch die Kennzeichnung des entsprechenden Medians ( $\tilde{x}$ ) mit dem Buchstaben B markiert.

#### b) Vergleich von Mittelwerten und Poolwerten

Die von den Vorbereitungskühen (Gr.2) pro Untersuchungstag genommenen Einzelproben wurden analysiert und aus den entsprechenden Einzelwerten der jeweilige arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ) errechnet. Die aus den Einzelproben hergestellte Poolprobe wurde ebenfalls analysiert. Die arithmetischen Mittelwerte und die jeweils entsprechenden Harn-Poolwerte eines Untersuchungstages wurden miteinander verglichen. Zur Beurteilung einer Übereinstimmung wurde die graphische Darstellung nach BLAND u. ALTMAN (1986) zum Vergleich zweier Methoden durchgeführt (BLAND-ALTMAN-Vergleich). Dafür wurden die prozentualen Abweichungen der Poolwerte von den entsprechenden Mittelwerten auf der y-Achse und die entsprechenden Mittelwerte auf der x-Achse aufgetragen. Je größer die Übereinstimmung zwischen Poolwert und Mittelwert ist, desto näher liegen die Poolwerte an der eingezeichneten Null-Linie (0 % - Abweichung). Zusätzlich zur graphischen Darstellung wurden für die prozentualen Abweichungen der Poolwerte von den Mittelwerten die arithmetischen Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichungen (s), Minimum- und Maximum-Werte ( $x_{\min}$ ,  $x_{\max}$ ), die Median-Werte ( $\tilde{x}$ ) und die 25- und 75 % - Quartile berechnet.

### c) Stoffwechselfparameter und Erkrankungen/Abgänge

Für die Ergebnisse der Stoffwechseluntersuchung und für die Beschreibung der Erkrankungen und Abgänge erfolgte eine rein deskriptive Darstellung in tabellarischer Form. Auch hier wurden Abweichungen von Referenzwerten durch eine graue Unterlegung gekennzeichnet. Bei der Darstellung der Harnparameter wurden die Ergebnisse der Vorbereitungskühe (Gr.2) in gesonderten Tabellen dargestellt. Die Fütterung von sauren Salzen führt in der Regel zu einer erhöhten Kalziumausscheidung über den Harn und zu einer leichten Absenkung des Harn-pH, wodurch für die Kühe der Gruppe 2 zum Teil andere Referenzbereiche gelten.