

3. Material und Methoden

3.1. Vorversuche

In den Vorversuchen wurde untersucht, ob sich wässrige von milchigen Standards unterscheiden. Weiterhin ob es einen Unterschied zwischen den Konservierungsstoffen Natriumacid und Borsäure gibt.

Bei den Standards wurde handelsübliche Milch aus dem Supermarkt mit einem Fettgehalt von 3,5 % mit der entsprechenden Menge an Acetonstammlösung versetzt und die beiden Eichkurven verglichen.

Für die Konservierung wurden je 10 12 ml Plastikröhrchen mit 0,4ml Natriumacid 1,6%ig bzw. mit 1,5g Borsäure präpariert, dann mit verschiedenen milchigen Acetonstandards gefüllt und nach 1, 3 und 5 Tagen auf den Acetongehalt getestet.

3.2. Tiermaterial

Zur Untersuchung standen acht Milcherzeugerbetriebe mit zehn Produktionseinheiten in Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen-Anhalt. Insgesamt standen auf diesen Betrieben 6412 Tiere der Rassen Schwarzbuntes Milchrind (SMR), Holstein Frisian und deren Kreuzungen mit einer durchschnittlichen Jahresmilchleistung zwischen 8756 kg und 11330kg. Betrieb 6 war mit 1234 Tieren der größte und Betrieb 2 mit 192 Tieren der kleinste Betrieb. Die Tiere aller Betriebe wurden in Laufställen gehalten.

Auf allen Betrieben waren die Tiere nach ihrer Leistung in Gruppen sortiert und wurden dementsprechend mit TMR gefüttert, die mehrmals täglich frisch über Futterband zugeteilt wurde. Die Wasserversorgung erfolgte über Selbsttränken. Die Trockenstehenden Kühe erhielten ab drei Wochen a.p. zusätzlich 150 ml Propylenglycol.

Es wurde von allen Tieren in den ersten acht Wochen p.p. Milchproben genommen.

3.3. Entnahme der Milchproben

Die Milchproben wurden entweder zu den Mittags- oder den Nachmittagsmelkzeiten gewonnen. Ein 12 ml Plastikröhrchen¹ wurde nach Säuberung des Euters mit dem Vorgemelk eines beliebigen Euterviertels unter Umgehung von Schaumbildung vollständig gefüllt und sofort verschlossen. Die Röhrchen waren mit 0,4 ml einer 1,6 %igen Natriumacidlösung (Na-Acid) präpariert.

Von der Probennahme ausgeschlossen waren Tiere die in den Krankengruppen standen und Tiere der Kolostralphase, welche auf allen Betrieben fünf Tage betrug.

3.4. Bestimmung des Acetongehalts in den Milchproben

3.4.1. Methode

Die mit Na-Acid konservierten Milchproben wurden bei Kühlschranktemperatur maximal über 5 Tage aufbewahrt. Analysiert wurden die Proben mit dem Gerät Perstorp Analytical², welches mit einem Computer zur Erfassung der Meßwerte verbunden war. Die Umsetzung der Messsignale in Acetonkonzentrationen erfolgte mit dem Programm Soft Pac Plus². Analysengerät und Programm stammen von der Firma AlpKem².

Die Milchacetonkonzentration wurde mittels Fließlösungsanalyse (Flow solution analysis) bestimmt. Die Eichkurve wurde mittels wässriger Acetonstandards der Konzentrationen 0,1; 0,4; 0,8 und 3,2 mmol Aceton/l erstellt und in dieser Reihenfolge eingesetzt. Die Milchproben wurden vom Sampler kontinuierlich über einen Zeitraum von 20 Sekunden gezogen. Zwischen den einzelnen Proben war eine Spülphase von 40 Sekunden mit Brijwasser (15 Tropfen Brij/l Wasser). Die Probe wurde kontinuierlich mit einem Trägerstrom (Phosphatpuffer) versetzt. Das enthaltene Aceton diffundierte im Chemifold durch eine semipermeable Teflonmembran in den Indikatorstrom (Hydroxylamin + Methylorange). Um die chemische Reaktion zwischen Hydroxylamin und Aceton zu beschleunigen und zu

¹ Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenrath

² AlpKem Corporation, Clackamas, Oregon, USA

vervollständigen, wurde der Indikatorstrom durch ein Wasserbad mit einer Temperatur von 50 °C geleitet. Hier kam es zu einer pH-Wertsenkung, die einen Farbumschlag des Indikators induzierte, welcher im Durchflußphotometer bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen wurde.

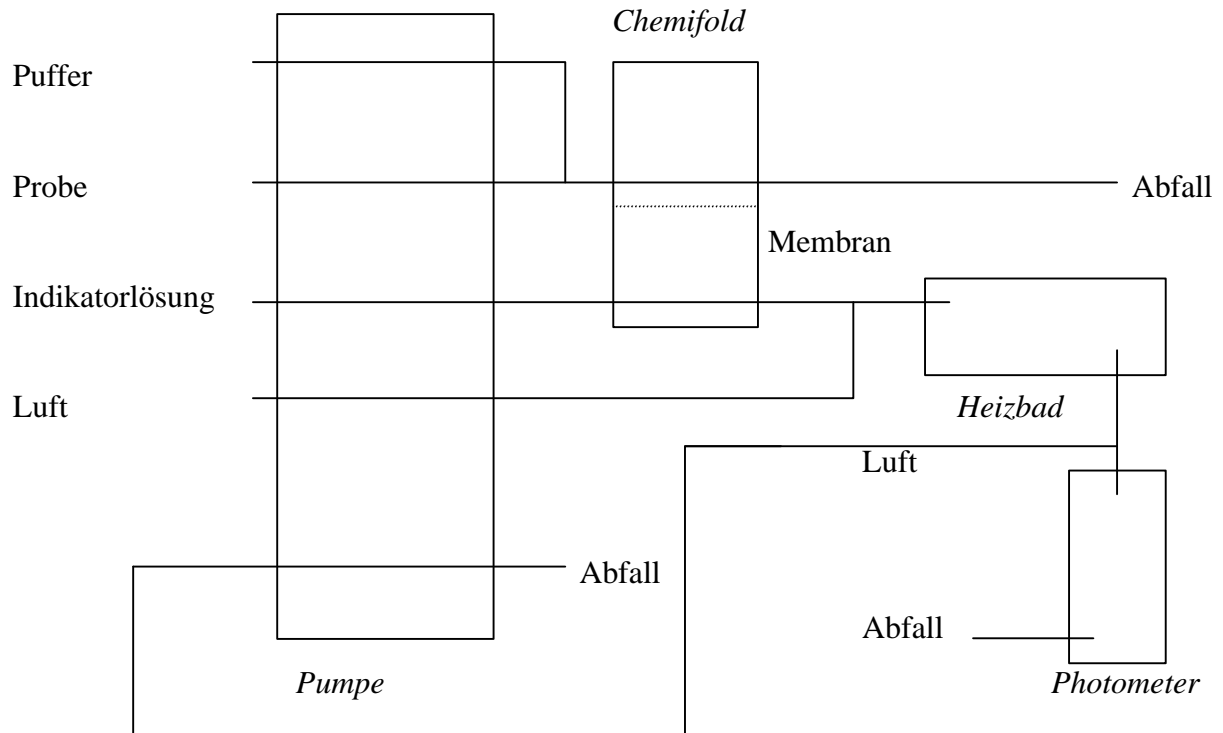


Abb. 6: Fließschema und Geräteaufbau

3.4.2. Eichkurve

Für die Bestimmung der Milchacetonkonzentration wurden folgende Lösungen verwendet.

Acetonstammlösung 10 mM (zur Herstellung der Acetonstandards):

0,58 g Aceton p.a. auf 1000 ml mit Aqua Bidest aufgefüllt ergibt die 10 mM Acetonstammlösung.

Acetonstandards:

0,1 mmol/l = 1 ml Acetonstammlösung auf 100 ml mit Aqua Bidest

0,4 mmol/l = 4 ml Acetonstammlösung auf 100 ml mit Aqua Bidest

0,8 mmol/l = 8 ml Acetonstammlösung auf 100 ml mit Aqua Bidest

3,2 mmol/l = 32 ml Acetonstammlösung auf 100 ml mit Aqua Bidest

Indikatorlösung:

Stammlösung 1: 20,0 g Hydroxylammoniumchlorid p.a. auf 1000 ml mit Aqua Bidest

Stammlösung 2: 0,25 g Methylorange p.a. auf 1000 ml mit Aqua Bidest

150 ml Stammlösung 1 und 100 ml Stammlösung 2 und 15 Tropfen Brij (als Schmiermittel) auf 1000 ml mit Aqua Bidest aufgefüllt ergibt die Indikatorlösung.

Phosphatpuffer:

7,22 g Kaliumhydrogenphosphat und 14,52 g di-Natriumhydrogenphosphat auf 2000 ml mit Aqua Bidest aufgefüllt ergibt den Phosphatpuffer.

3.5. Acetonklassen

Die von HÜNNIGER (1998) verwandte Einteilung in fünf Acetonklassen musste aufgrund der Beschränkung auf eine Kommastelle korrigiert werden. Die Klasse 2 wurde aufgelöst und entsprechend in Klasse 1 integriert. Tabelle 5 zeigt die vier Acetonklassen mit ihren Messbereichen, wie sie auch schon von GRAVERT et al.(1991) und BERGER (1995) postuliert wurden, mit zwei Ausnahmen: Aufgrund des Messbereichs des Gerätes mit nur einer Nachkommastelle, musste der Wert 0,25 in Klasse 1 auf 0,2 und in Klasse 2 auf 0,3 korrigiert werden.

Tab.5 : Beurteilung von Milchacetonkonzentrationen

| <u>Acetonklasse</u> | <u>Milchacetonkonzentration in mmol / l</u> | <u>Beurteilung</u> |
|---------------------|---|-------------------------------------|
| 1 | < 0,2 | Physiologischer Bereich |
| 2 | 0,3 - 1 | Subklinische Ketose |
| 3 | 1,1 - 2 | Risikobereich zur klinischen Ketose |
| 4 | > 2 | Klinische Ketose |

3.6. Ketosestatus

Der Ketosestatus eines Betriebes wurde anhand der prozentual von der Norm abweichenden Milchproben von Tieren aus den ersten 8 Wochen p.p. beurteilt. Der Grenzwert wurde auf 5 % festgelegt.

Tiere mit Milchproben in Klasse 3 und 4 wurden dem Betrieb umgehend mitgeteilt, um eine sofortige tierärztliche Behandlung zu ermöglichen.

3.7. Zeitlicher Verlauf der Ketose

Überschreitet die Ketoserate in einem Betrieb bei einer monatlichen Routineuntersuchung die 5 % -Marke, d.h. mehr als 5 % der Milchproben weisen Acetonkonzentrationen 0,3 mmol/l auf, spricht man von einem Bestandsproblem, das über einen längeren Zeitraum genauer beobachtet werden sollte. Im April 2001 waren in Betrieb 7 7 von 42 Milchproben in Acetonklasse 2 bis 4 klassifiziert. Die Tiere wurden daraufhin über einen Zeitraum von 7 Wochen beobachtet und es wurde von der gesamten Laktationsgruppe Milchproben genommen

3.8. Statistik

Als Originaldaten wurden Tiernummern, Kalbedaten und Acetonwerte erfasst alle anderen Daten mussten berechnet (Laktationswoche) oder aus den Sicherungskopien der Betriebe (Zuchtmanager¹) übertragen werden. Die Milchdaten und der Fett-Eiweiß-Quotient stammen aus den monatlichen Milchkontrollen, die Jahresmilchleistung, Krankheits- und Abgangsdaten sind Betriebsdaten. Die erhobenen Daten wurden mit dem Datenverarbeitungsprogramm Microsoft Excel 2000² erfasst und in das Statistikprogramm SPSS 10.0³ übertragen und dort bearbeitet. Für die Parameter Fett-Eiweiß-Quotient, Jahresmilchleistung und Tagesmilchleistung wurden Bestimmtheitsmaß, Korrelation und Signifikanz bestimmt. Das Signifikanzniveau war mit $\alpha = 5\%$ ($p = 0,05$) und das Konfidenzintervall mit 95 % festgelegt.

Bei den Parametern kann nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Deshalb wurden die Mediane bei den Boxplots bei zwei unabhängigen Medianen mit dem MANN-WHITNEY-U-Test verglichen. Bei mehr als zwei Medianen wurde der KRUSKAL-WALLIS-Test durchgeführt.

¹ Data Soft, Paretz

² Microsoft Corporation, USA

³ SPSS Inc.