

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Projektaufbau und ausgewählte Betriebe**

Die Studie war in zwei Teile gegliedert.

Der erste Teil beinhaltete die retrospektive Datenanalyse klinischer Mastitiden bei Erstkalbinnen auf 15 Milchviehbetrieben in Brandenburg.

Im zweiten Teil der Studie wurden das Erregerspektrum in der Kolostralmilch von Erstkalbinnen und das Erregerspektrum klinischer Mastitiden bei Erstkalbinnen und Altkühen auf zehn Milchviehbetrieben in Brandenburg ermittelt.

### **3.2 Teil 1: Retrospektive Datenanalyse klinischer Mastitiden bei Erstkalbinnen**

Für diesen Teil der Studie stellten die 15 Betriebe zur Erfassung der Daten ihre interne Dokumentation von Erkrankungen und Behandlungen im Computersystem Herde 4.51 (DSP-Agrosoft, Paretz) zur Verfügung.

Die Betriebe wurden willkürlich ausgesucht. Viele der Betriebe wurden jedoch aufgrund ihrer Mitarbeit an vorherigen Studien bevorzugt ausgewählt. Als Kriterien zur Teilnahme an dem ersten Teil der Studie wurde eine Mindestgröße der Betriebe von 100 Milchkühen, der Gebrauch des Computerprogramms Herde und die Dokumentation aller Mastitiden, sowie die Teilnahme an der monatlichen Milchleistungsprüfung (MLP) vorausgesetzt. Die Betriebe variierten in ihrer Größe von 150 bis 1500 laktierenden Tieren.

#### **3.2.1 Betriebsdaten**

Die 15 Betriebe hatten eine durchschnittliche Herdengröße von 671 laktierenden Tieren bei einer jährlichen Milchquote von 6 Millionen kg (Tabelle 6). Die Haltung erfolgte in sieben Betrieben in Boxenlaufställen mit Spaltenboden, fünf Betriebe hatten Boxenlaufställe mit planbefestigtem Boden. Drei Betriebe hielten die Tiere auf einer Tiefstreumatratze.

Die Herdengröße wurde auf allen Betrieben zu 100 % durch die eigene Färsenaufzucht gesichert.

In drei Betrieben wurden die Tiere auf einem Side-by-Side Melkstand gemolken. Von den übrigen Betrieben besaß die eine Hälfte ein Melkkarussell, die andere Hälfte einen Fischgrätenmelkstand.

Bei der Melkroutine konnte beobachtet werden, dass trotz angeordneter Zwischendesinfektion bei zehn Betrieben drei diese nicht oder nur sporadisch vornahmen. In vier Betrieben war eine Zwischendesinfektion gar nicht vorgesehen. Ein Betrieb ordnete diese nur nach behandelten Tieren an. Das Zitzendippen wurde bis auf einen Betrieb konsequent durchgeführt.

Alle Betriebe führten eine Vorbereitung der zur Geburt anstehenden Färsen durch. Die Tiere wurden im Mittel ca. 3,5 Wochen vor der Abkalbung aufgestellt. In zehn Betrieben standen die Tiere in diesem Bereich auf Tiefstreu, in den anderen standen sie in Boxenlaufställen mit Spaltenboden. In fünf Betrieben liefen die Färsen zusammen mit den Trockenstehern. Zwölf Betriebe verhinderten während der Vorbereitung die Kontaktmöglichkeit zu den laktierenden Tieren.

Im Abkalbebereich standen die Tiere in 14 Betrieben auf Stroh. Fünf Betriebe besaßen separate Stallgebäude für die Abkalbung. Sieben Betriebe verfügten über separate Abkalbebuchten für die Färsen.

#### **3.2.2 Datenerhebung**

In einer retrospektiven Kohortenstudie wurden die Mastitiden aller Tiere, die im Zeitraum vom 01.06.2003 bis zum 31.05.2004 abgekalbt hatten, registriert und ausgewertet. In dem festgelegten Zeitraum kalbten 4393 Färsen und 7457 Kühe ab. Bei diesen Tieren wurden alle Mastitiden registriert, die drei Tage ante partum und innerhalb der ersten 305 Tage post

partum (p.p.) auftraten. Von einer klinischen Mastitis wurde gesprochen, wenn für das entsprechende Tier in betriebseigener Codierung eine klinische Mastitis verzeichnet war. Alle Informationen, wie Kalbedatum, Art der Erkrankung, Behandlungsdatum, Medikamenteneinsatz und Abgangsdatum sowie –grund waren im Computerprogramm „Herde“ dokumentiert. Trat später als zwei Wochen erneut eine Euterentzündung auf, wurde diese als neuer Mastitisfall gewertet.

Es wurde die Inzidenz der klinischen Mastitiden bei Erstkalbinnen sowie bei Altkühen ermittelt und verglichen. Weiterhin wurde analysiert, zu welchem Zeitpunkt die Erkrankungen innerhalb der ersten 305 Laktationstage auftraten. Es wurde geprüft, ob beim Auftreten der Mastitiden ein Zusammenhang zur Saison zu erkennen war und ob die Mastitisinzidenz von Erstkalbinnen und älteren Kühen miteinander in Beziehung stand.

Tabelle 6: Betriebsdaten der Studienbetriebe aus beiden Studienteilen (1 von 2)

Betriebe	Anzahl laktierende Tiere	Milchquote in Mio. kg pro Jahr	EKA*	Haltung im Abkalbebereich	Haltung in der Vorbereitung	Erstkalbinnen- haltung	Melkstand	Studienteil
1	1250	9,4	26	Gruppe auf Stroh	Boxenlaufstall Spaltenboden	Boxenlaufstall Spaltenboden	Karussell	1
2	1500	14,8	25	Anbindehaltung	Boxenlaufstall Spaltenboden	Boxenlaufstall Spaltenboden	Karussell	1
3	295	3,2	24	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Boxenlaufstall planbefestigt	Fischgrät	1,2
4	150	0,9	25	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Tiefstreu	Fischgrät	1
5	260	2,0	25	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Boxenlaufstall Spaltenboden	Fischgrät	1,2
6	355	3,1	27	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Boxenlaufstall planbefestigt	Fischgrät	1,2
7	480	4,0	26	einzel auf Stroh	Tiefstreu	Tiefstreu	Side-by- Side	1,2
8	286	3,6	25	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Boxenlaufstall planbefestigt	Fischgrät	1

\* EKA= Erstkalbealter in Monaten

Fortsetzung Tabelle 6: Betriebsdaten der Studienbetriebe aus beiden Studienteilen (2 von 2)

Betriebe	Anzahl laktierende Tiere	Milchquote in Mio. kg pro Jahr	EKA*	Haltung im Abkalbbereich	Haltung in der Vorbereitung	Erstkalbinnen- haltung	Melkstand	Studienteil
9	723	7,0	27	zu zweit auf Stroh	Boxenlaufstall Spaltenboden	Boxenlaufstall Spaltenboden	Karussell	1,2
10	1173	10,9	25	Gruppe auf Stroh	Boxenlaufstall Spaltenboden	Boxenlaufstall Spaltenboden	Side-by- Side	1,2
11	390	3,8	24	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Boxenlaufstall planbefestigt	Side-by- Side	1
12	240	1,5	29	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Tiefstreu	Fischgrät	1
13	868	8,5	24	Gruppe auf Stroh	Tiefstreu	Boxenlaufstall Spaltenboden	Karussell	1,2
14	900	6,8	26	einzel auf Stroh	Boxenlaufstall Spaltenboden	Boxenlaufstall planbefestigt	Karussell	1,2
15	1200	10,0	24	einzel auf Stroh	Tiefstreu	Boxenlaufstall Spaltenboden	Karussell	1,2
16	750	6,4	27	Anbindehaltung	Anbindehaltung	Boxenlaufstall Spaltenboden	Side-by- Side	2

\* EKA= Erstkalbealter in Monaten

### **3.2.3 Dokumentation und Datenaufbereitung**

Die Datenerfassung auf den Betrieben erfolgte mit dem Computerprogramm Herde 4.51 (DSP-Agrosoft, Paretz). Neben anderen betriebsrelevanten Daten der Tiere, wurden die für die Auswertung benötigten Informationen, wie Kalbedatum, Art und Datum von Erkrankungen, Medikamenteneinsatz, Behandlungsdatum, Abgangsdatum und –grund dokumentiert.

Auf Tierebene wurden die Unterdateien in einer im Programm MS-Access 2003 angelegten Datenbank verknüpft. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS für Windows (Version 12.0, SPSS Inc., München).

### **3.2.4 Statistische Auswertung**

Die Korrelation zwischen den monatlichen Inzidenzen klinischer Mastitiden von Erstkalbinnen und Altkühen (Abbildung 7) wurde als Spearmansche Rangkorrelation berechnet.

### **3.3 Teil 2: Erregerspektrum klinischer Mastitiden im postpartalen Zeitraum und in der Kolostralmilch von Erstkalbinnen binnen 48 Stunden post partum**

Für diesen Teil der Studie wurden neun der 15 bereits im ersten Teil analysierten Betriebe ausgewählt. Ein weiterer Betrieb kam hinzu.

#### **3.3.1 Betriebsdaten**

Die zehn Betriebe hatten eine durchschnittliche Herdengröße von 700 laktierenden Tieren bei einer jährlichen Milchquote von 6,2 Millionen kg (Tabelle 6). Die Haltung erfolgte in sechs Betrieben in Boxenlaufställen mit Spaltenböden. Drei Betriebe hatten Boxenlaufställe mit planbefestigtem Boden. Ein Betrieb hielt die Tiere auf einer Tiefstreumatratze.

Die Herdengröße wurde auf allen Betrieben zu 100 % durch die eigene Färsenaufzucht gesichert.

In drei Betrieben wurden die Tiere auf einem Side-by-Side Melkstand gemolken. Von den übrigen Betrieben besaßen vier ein Melkkarussell, die übrigen drei einen Fischgrätenmelkstand.

Bei der Melkroutine konnte beobachtet werden, dass trotz angeordneter Zwischendesinfektion bei acht Betrieben zwei diese nicht oder nur sporadisch vornahm. In einem Betrieb war eine Zwischendesinfektion gar nicht vorgesehen. Ein Betrieb ordnete diese nur nach behandelten Tieren an. Das Zitzendippen wurde bis auf einen Betrieb konsequent durchgeführt, wobei die Effektivität in vier Betrieben nicht ausreichend war, da nicht alle Zitzen nach dem Dippvorgang mit Dippmittel benetzt waren (Versuchsdurchführung und –beurteilung siehe unter „Betriebsdaten“ in Teil 1). Alle Betriebe führten eine Vorbereitung der zur Geburt anstehenden Färsen durch. Die Tiere wurden im Mittel ca. 2,8 Wochen vor der Abkalbung aufgestellt. In sechs Betrieben standen die Tiere in diesem Bereich auf Tiefstreu, in drei Betrieben in Boxenlaufställen mit Spaltenböden. In einem Betrieb wurden die Tiere mit Grabnerkette in Anbindehaltung auf einem Kurzstand mit Gitterrost gehalten. In drei Betrieben liefen die Färsen zusammen mit den Trockenstehern. Sieben Betriebe verhinderten während der Vorbereitung die Kontaktmöglichkeit zu den laktierenden Tieren.

Im Abkalbbereich standen die Tiere in neun Betrieben auf Stroh. Ein Betrieb hielt die Tiere wie auch in der Vorbereitung in Anbindehaltung. Fünf Betriebe besaßen separate Stallgebäude für die Abkalbung. Vier Betriebe verfügten über separate Abkalbebuchten für die Färsen.

#### **3.3.2 Datenerhebung**

##### **3.3.2.1 Beprobung der Tiere für die bakteriologische Untersuchung**

Die Entnahme der Kolostrumproben erfolgte bei Erstkalbinnen innerhalb der ersten 48 Stunden post partum. Das Melkpersonal entnahm zur Melkzeit Anfangsviertelgemelkproben (AVG). Pro Betrieb wurden bis zu acht Tiere pro Woche beprobt. Dabei wurden die Tiere vom Wochenbeginn an der Reihenfolge des Abkalbens nach beprobt.

Bei Erstkalbinnen und Kühen, die innerhalb der Laktation an einer klinischen Mastitis erkrankten, wurden vor Behandlungsbeginn ebenfalls Proben von den erkrankten Vierteln genommen. Es war daher möglich, dass Viertel, von denen bereits eine Kalbprobe entnommen wurde, zu einem späteren Zeitpunkt als Mastitisviertel erneut in die Auswertung mit eingegangen sind. Diese Viertel wurden bei der Auswertung der Kalbe- und der Mastitisproben nicht ausgeschlossen.

Die Euter wurden vom Melkpersonal gesäubert und vorgemolken. Die Zitzen wurden mit den handelsüblichen Zitzendesinfektionstüchern abgerieben. Anschließend wurde die Milchprobe in das sterile Einmalröhrchen gemolken. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Betriebe wurden einmal pro Woche angefahren und die

Proben in einer Kühlbox in das Milchlabor der Tierklinik für Fortpflanzung gebracht. Die Milchproben konnten so spätestens nach 7 Tagen für die Diagnostik auf Agarplatten ausgestrichen werden.

### 3.3.2.2 Bakteriologische Untersuchung

Von den gut durchmischten Milchproben wurde jeweils ein Inokulum von 0,01 ml auf einer Hälfte einer Schafblutagarplatte (Blood Agar Base Nr. 2, Oxoid, Wesel, Zusatz von 5 % Schafblut, Zusatz von 0,1 % Aesculin) ausgestrichen. Die beimpften Agarplatten wurden für 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Es erfolgte eine Differenzierung der Erreger in *Staphylococcus aureus*, Koagulase negative Staphylokokken, *Streptococcus spp.*, koliforme Keime, *Arcanobacterium pyogenes* und Hefen.

Die Differenzierung in *Staphylococcus aureus* und in Koagulase negative Staphylokokken erfolgte mittels Koagulase Test (BBL Coagulase Plasma, Rabbit; Becton, Dickinson and Company). Es wurden alle Kolonien, die im Durchmesser ca. 3-8 mm groß, von glatter Oberfläche, unpigmentiert (weiß) oder pigmentiert (cremefarben, grau-weiß, bräunlich, goldgelb) waren und eine unvollständige, eine vollständige oder eine doppelzonige Hämolyse aufwiesen, dem Koagulase Test unterzogen.

Kolonien, die aufgrund ihrer Morphologie (im Durchmesser ca. 1-3 mm große Kolonien, von glatter, konvexer Oberfläche) den Streptokokken zugehörig schienen, wurden dem Katalase Test unterzogen. Katalase negative Kolonien wurden anhand des CAMP-Tests und eines kommerziellen Latex-Agglutinationstest Systems (Streptococcal grouping kit; Oxoid, Wesel) differenziert. Streptokokken, die ein positives CAMP-Phänomen verursachten, wurden auf die Zugehörigkeit zur Lancefield Gruppe B geprüft. Wurde die Zugehörigkeit auf diese Weise bestätigt, wurden sie als *Streptococcus agalactiae* identifiziert. Streptokokken, die in der Lancefield Gruppe C positiv ausfielen, wurden als *Streptococcus dysgalactiae* identifiziert. Die übrigen Streptokokken wurden auf *Streptococcus uberis* geprüft. Dazu wurden die zu prüfenden Kolonien auf einem Streptokokken Selektivagar (Streptococci Selektivagar, Heipha GmbH) ausgestrichen. Die beimpften Agarplatten wurden für 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Kolonien die eine Aesculinspaltung zeigten, wurden in eine 6,5 %ige Natriumchlorid Nährbouillon überführt (Nährbouillon 6,5 % Kochsalz, Heipha GmbH) und für 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Mit diesem Verfahren sollten eventuell vorhandene *Enterococcus spp.* von den Streptokokken abgegrenzt werden. Fand ein Wachstum in dieser Bouillon statt, konnten die Keime als *Enterococcus spp.* vom weiteren Vorgehen ausgeschlossen werden, da nur *Enterococcus spp.* in diesem Nährmedium angezüchtet werden können. Der Kochsalzgehalt verhindert das Wachstum anderer Keime. Konnte in der Nährbouillon kein Wachstum festgestellt werden, wurden die entsprechenden Keime von der Blutagarplatte anhand des Latex-Agglutinationstest Systems (Streptococcal grouping kit; Oxoid, Wesel) auf die Zugehörigkeit zur Lancefield Gruppe D überprüft. Als *Streptococcus uberis* wurden letztendlich die Keime identifiziert, die eine Aesculinspaltung auf dem Blutagar verursachten, kein Wachstum in der Natriumchlorid Nährbouillon zeigten und außerdem der Lancefield Gruppe D zugeordnet werden konnten. Streptokokken, die weder als *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* oder *Streptococcus uberis* identifiziert wurden, fielen in der Auswertung unter *Streptococcus spp.*.

Weiterhin wurden die Proben durch makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Kolonie- und Keimmorphologie auf Hefen, *Arcanobacterium pyogenes* und koliforme Keime untersucht.

Andere Keime, die nicht nach dem oben beschriebenen Identifizierungsprinzip zugeordnet werden konnten, wurden unter „sonstige Keime“ zusammengefasst. Proben, die den Agar mit

drei und mehr verschiedenen Keimen überwucherten, wurden als bakteriologisch verunreinigt bezeichnet und von der weiteren Differenzierung ausgeschlossen.

Ab welcher Anzahl gewachsener Kolonien ein Befund erhoben wurde, zeigt die Tabelle 7.

Tabelle 7: Ausschlaggebende Anzahl der Kolonien zur Befunderhebung

Keimart	Anzahl der Kolonien
<i>Staphylococcus aureus</i>	≥1
KNS	≥3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	≥3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	≥3
<i>Streptococcus uberis</i>	≥3
<i>Streptococcus spp.</i>	≥3
Koliforme Keime	≥3
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	≥1
Sonstige	≥3
bakteriell verunreinigt (b.v.)	≥3 verschiedene Keime

### 3.3.3 Dokumentation und Datenaufbereitung

Die Datenerfassung auf den Betrieben erfolgte wie für den Teil 1 mit dem Computerprogramm Herde 4.51 (DSP-Agrosoft, Paretz).

Für die Dokumentation der Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der klinischen Mastitiden und der Viertelgemelkproben wurde eine Datenbank im Programm MS-Access 2003 angelegt. Die Analyse dieser Daten erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Programms SPSS für Windows (Version 12.0, SPSS Inc., München).

### 3.3.4 Statistische Auswertung

Die Häufigkeiten der Erregerbefunde wurde auf der Basis der auswertbaren bakteriologischen Untersuchungen berechnet. Die Beziehung zwischen den Keimspektren der drei Probengruppen (Kalbproben der Erstkalbinnen, Mastitisproben der Erstkalbinnen, Mastitisproben der Altkühe) innerhalb der Betriebe wurde als Spearmansche Rangkorrelation berechnet. Der Einfluss der Faktoren Betrieb, Altersgruppe (Erstkalbinnen, Altkühe), Probenart und Probensaison wurde für die Spezies (Koagulase negative Staphylokokken, koliforme Keime, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis*) jeweils als logistische Regression berechnet. Dabei wurde der Nachweis des jeweiligen Keims in einer Probe als abhängige Variable definiert. Die Variable Betrieb ging als kategoriale Variable mit zehn möglichen Ausprägungen in die Modelle ein. Die Variablen Altersgruppe, Probenart und Probensaison wurden als binäre Variablen kodiert. Dabei wurden bei der Altersgruppe Erstkalbinnen mit 1 und Altkühe mit 2 kodiert. Bei der Probenart wurden Kalbproben mit 1 und Mastitisproben mit 2 und bei der Probensaison der Sommer mit 1 und der Winter mit 2 kodiert. Für alle Berechnungen wurde  $p \leq 0,05$  gesetzt. Die Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS für Windows (Version 12.0, SPSS Inc., München) durchgeführt.