3. Material und Methoden

3.1. Allgemeines

Die Untersuchungen wurden vom 1.03.2003 bis zum 31.08.2004 im Rahmen der Bestandsuntersuchungen der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin durchgeführt. Es wurden 50 Betriebe in Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg und Sachsen-Anhalt untersucht. Die Betriebe wurden 1- bis 3-mal besucht. Von den untersuchten Betrieben verfütterten 31 Anionen in ihren Vorbereiterrationen. Zwei Betriebe fütterten erst beim zweiten Besuch anionische Rationen. Ein Betrieb fütterte nur beim ersten Besuch Anionenrationen. Die Betriebsgröße variierte von 164 bis 2536 Kühen pro Bestand und lag im Mittel bei 615. Insgesamt repräsentieren die untersuchten Tiere einen Kuhbestand von ca. 29500 Tieren. Die untersuchten Rinder waren Rinder der Rasse Holstein-Friesian. Die Kühe wurden in Boxenlaufställen auf Spaltenboden gehalten. Nur selten wurden die Kühe in den Sommermonaten auf der Weide gehalten. Die Fütterung wurde in der Regel durch eine totale Mischration oder selten eine Mischration mit individueller Kraftfuttergabe durchgeführt. Die Fütterung erfolgte 1- bis 8-mal am Tag über einen Mischwagen oder Futterbänder.

3.2. Auswahl der Tiere

Bei den Bestandsbesuchen wurde eine Herdenanamnese anhand eines Fragebogens erhoben. Dieser behandelt Haltungs- und Fütterungsbedingungen sowie ausgewählte Erkrankungen. Besonderes Augenmerk bei der Anamnese wurde auf das Vorkommen der Gebärparese und auf Folgeerscheinungen einer subklinischen Hypokalzämie (Nachgeburtsverhaltungen, Labmagenverlagerungen, Endometritiden) im Bestand gelegt. Für die Untersuchung wurden nur Kühe genutzt, die schon einmal gekalbt hatten und klinisch gesund erschienen. Es wurden jeweils 10 Tiere in folgende Gruppen eingeteilt und untersucht (Tab. 10).

Tab. 10: Gruppeneinteilung zur Bestandsuntersuchung

Gruppe	Bezeichnung	Laktationsstadium
1	Vorbereiter	3 bis 0 Wochen ante partum
2	Frischkalber	0 bis 1 Woche post partum

3.3. Probenentnahme

Die Tiere wurden in den Liegeboxen, Fressfanggittern, Zwangsständen oder Treibgängen fixiert. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Arteria oder Vena caudalis mediana. Das Blut wurde in folgende Röhrchen aufgefangen. Zur Serumgewinnung wurden 10 ml Röhrchen ohne Koagulanzien der Firma Sarstedt verwendet. Das Vollblut wurde in 5 ml-EDTA-Röhrchen der Firma Sarstedt aufgefangen. Zur Blutgasanalyse wurde das Blut mit Hilfe von Heparin-Blutgasspritzen der Firma Kabe entnommen. Die Harnentnahme erfolgte durch einen Uteruskatheter nach BRESLAU. Der Harn wurde in 100 ml-Versandflaschen (FA Sarstedt) aufgefangen. Am Tag der Untersuchung wurde eine gut durchmischte Futterprobe (ca. 1 kg) der totalen Mischration der Vorbereiter entnommen.

3.4. Probenaufbereitung

Die Blutproben wurden bei ca. 4-10°C in einer Kühltasche und die Harnproben bei Raumtemperatur transportiert. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben in den 10 ml-Röhrchen ohne Koagulanzien 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Aus zehn Serumproben und zehn EDTA-Proben einer Gruppe wurde jeweils 1 ml entnommen und in ein Sammelröhrchen gegeben. Diese Proben wurden gut gemischt und stellten die Poolproben dar. Die Herstellung der Harnpoolproben erfolgte mit 6 ml Harn je Einzelprobe. Von der Gruppe 1 und 2 wurden 60ml jeder Probe als Einzelprobe eingelagert. Die Serumpoolproben wurden in das veterinärmedizinische Labor für klinische Prüfung Ludwigsburg GmbH durch einen Kurier geschickt. Die Harneinzel- und -poolproben wurden im Labor der Klinik für Klauentiere untersucht. Die Blutgasanalysen und die hämatologische Untersuchung wurden direkt nach Ankunft im klinikeigenen Labor nach jedem Bestandsbesuch durchgeführt.

Die Harneinzel- und -poolproben wurden bei -20°C gelagert und am folgenden Tag untersucht. Abbildung 4 zeigt die Gruppen- und Probeneinteilung. Die Futterprobe wurde zur Untersuchung an das Analytiklabor für Landwirtschaft und Umwelt Blgg GmbH in Parchim geschickt. In drei verschiedenen Betrieben wurden über 8 Wochen wöchentlich 10 Harnproben von Kühen in der Vorbereitungsgruppe genommen. Bei diesen Harnproben wurde der pH mit einem portablen elektrischen pH-Meter und pH-Streifen sowie mit einem elektrischen pH-Meter im Labor der Klinik für Klauentiere bestimmt.

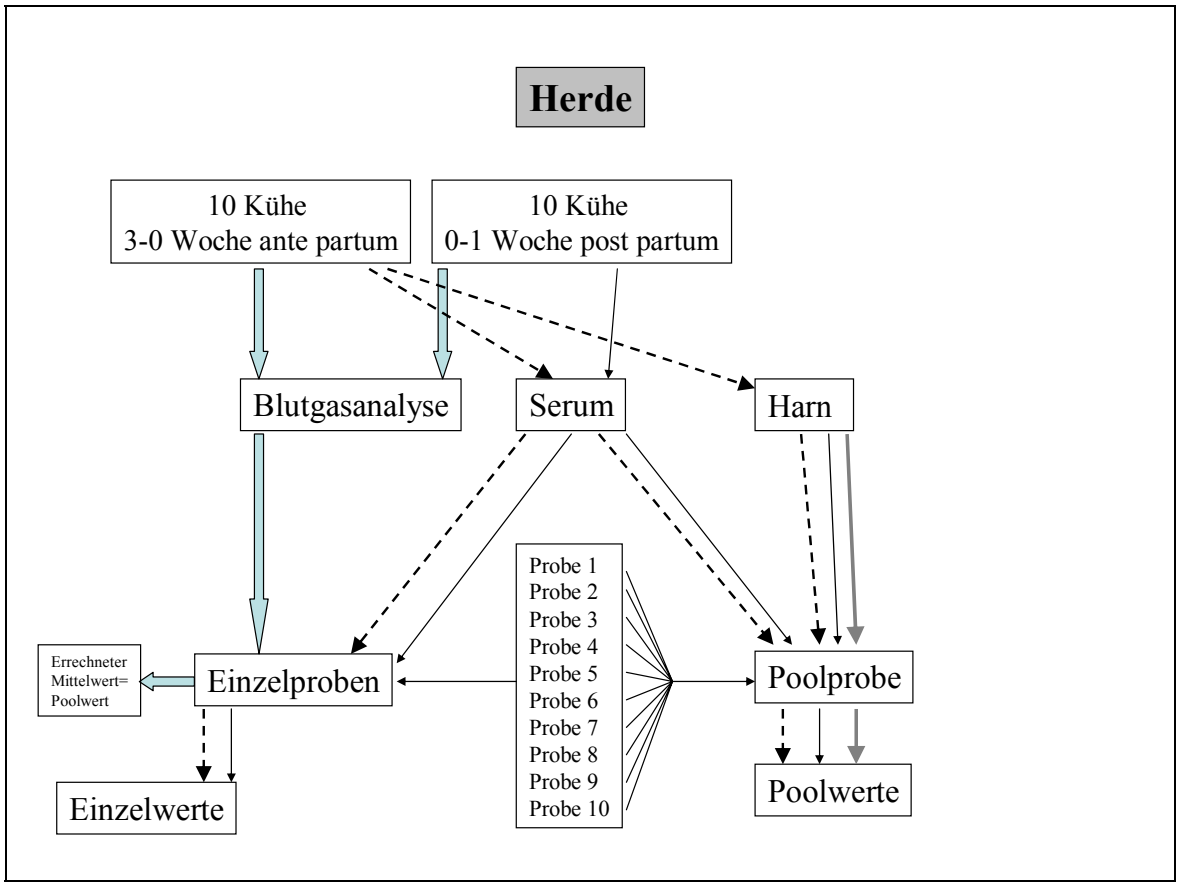

Abb. 4: Darstellung der Probenentnahme und Aufbereitung

3.5. Laboranalytische Untersuchungen

Die Serumeinzelproben, die Harnparameter (Pool- und Einzelwerte) sowie die Vollblut- und Blutgaswerte wurden im klinikeigenen Labor der Klinik für Klauentiere und die Poolproben wurden im veterinärmedizinischen Labor des Instituts für klinische Prüfung Ludwigsburg GmbH untersucht. Der Mittelwert (= Poolwert) der Blutgasanalyse wurde aus den Einzelwerten der 10 Proben errechnet. In Tabelle 11 sind die untersuchten Parameter aufgelistet.

Tab. 11: Übersicht über die untersuchten Parameter in den Gruppen

	Pool	Einzelwerte Vorbereiter	Einzelwerte 0-1 Woche p.p.
HARN			
NSBA	√	√	√
Basen	√		
Säuren	√		
NH_4	√		
BSQ	√		
Calcium	√	√	√
Magnesium	√		
Natrium	√		
Kalium	√		
Chlorid	√		
Kreatinin	√		
Phosphor	√		
Blut			
Hämoglobin	√		
Hämatokrit	√		
Erythrozyten	√		
Leukozyten	√		
Thrombozyten	√		
Serum			
ASAT	√		√
GLDH	√		√
CK	√		√
Magnesium	√		√
Kalzium	√		√
Phosphor	√		√
Bilirubin	√		√
β-HBS	√		√
Selen	√		
Kupfer	√		
Zink	√		
Eisen	√		
Blutgase			
pH	√		
pCO_2	√		
pO_2	√		
SBK	√		
BE	√		

Folgende Methoden wurden im Labor der Klinik für Klauentiere zur Bestimmung der Werte durchgeführt (Tab. 12 - 15).

Tab. 12: Messverfahren der Harnparameter

Parameter	**Messverfahren**
pH	pH-Meter, Mikroprozessor pH-Meter WTW
NSBA	Titration nach KUTAS (1965)
Kalzium	AAS[1)]
Magnesium	AAS[1)]
Kalium	AAS[1)]
Natrium	AAS[1)]
Chlorid	Potentiometrie[3)]
Phosphor	Molybdat-Reaktion[2)]
Kreatinin	Jaffé[2)]

[1)] Atomabsorptionsspektrometrie (PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Phillips)

[2)] Hitachi 704 Automatic Analyzer

[3)] Synchron EL-ISE Elektrolyte Sys., Beckmann

Tab. 13: Messverfahren der Serumparameter

Parameter	**Messverfahren**
ASAT	Optimierte Standardmethode[2)]
GLDH	Optimierte Standardmethode[2)]
CK	Optimierte Standardmethode[2)]
Magnesium	AAS[1)]
Kalzium	AAS[1)]
Phosphor	Molybdat Reaktion
Bilirubin	Optimierte Standardmethode[2)]
β-HBS	Optimierte Standardmethode[2)]

[1)] Atomabsorptionsspektrometrie (PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips)

[2)] Hitachi 704 Automatic Analyzer

Tab. 14: Messverfahren der Parameter im Blut

Parameter	**Messverfahren**
Hämoglobin	Blutzellzählgerät, NOVA Celltrak 12
Hämatokrit	Blutzellzählgerät, NOVA Celltrak 12
Erythrozyten	Blutzellzählgerät, NOVA Celltrak 12
Leukozyten	Blutzellzählgerät, NOVA Celltrak 12
Thrombozyten	Blutzellzählgerät, NOVA Celltrak 12

Tab. 15: Messverfahren der Blutgase

Parameter	**Messverfahren**
pH	Blutgasanalysator, ABL 5, Radiometer Copenhagen
pCO_2	Blutgasanalysator, ABL 5, Radiometer Copenhagen
pO_2	Blutgasanalysator, ABL 5, Radiometer Copenhagen
SBK	Blutgasanalysator, ABL 5, Radiometer Copenhagen
BE	Blutgasanalysator, ABL 5, Radiometer Copenhagen

Einige Werte wurden im veterinärmedizinische Labor, Ludwigsburg GmbH, bestimmt (Tab. 16).

Tab. 16: Parameterliste für das veterinärmedizinische Labor, Ludwigsburg GmbH

Enzyme	Aspartataminotransferase (ASAT), Creatinkinase (CK), Glutamatdehydrogenase (GLDH)
Mengenelemente	Magnesium, Kalzium, Phosphor
Spurenelemente	Zink, Kupfer, Eisen, Selen

Für die direkte pH-Messung wurde ein elektronisches pH-Meter der Marke Checkmite (Modell pH-15) und pH-Streifen der Firma Merck (pH-Bereich 6,5-10,0) verwendet. Von der totalen Mischration der Vorbereitergruppe wurden folgende Parameter bestimmt (Tab 17).

Tab. 17: Parameter der Futtermittelanalyse

Zellinhaltsstoffe	Rohasche, Rohprotein, Zucker, Stärke
Gerüstsubstanz	Rohfaser, ADF, ADF org.
Mengenelemente	Kalzium, Phosphor, Natrium, Kalium, Chlorid, Schwefel Kationen-Anionen-Bilanz (DCAB)
Energiekennzahlen	umsetzbare Energie (ME), Netto-Energie-Laktation (NEL)

3.6. Untersuchungen

3.6.1. Methodische Untersuchungen

3.6.1.1. Untersuchung der pH-Messverfahren im praktischen Einsatz

Zur genauen Beurteilung des pH-Wertes im Harn müssen mögliche Abweichungen der einzelnen Messverfahren bekannt sein. Hierzu wurde der Harn-pH mittels eines portablen elektrischen pH-Meter und pH-Streifen im Stall direkt nach der Harngewinnung bestimmt. Außerdem wurde der Harn-pH mittels eines elektrischen pH-Meter im Labor nach Einfrieren und wieder Auftauen des Harnes bestimmt. Diese drei pH-Messverfahren wurden miteinander verglichen.

3.6.1.2. Vergleich von Mittelwerten und Poolwerten

Die Bewertung von Poolwerten der Vorbereitergruppe zur Überprüfung der Anionenrationen in Beständen wäre eine Alternative zur Bewertung von mehreren Einzelwerten. Dies würde eine erhebliche Kostenersparnis für die Betriebe bedeuten.

Bei dieser Untersuchung wurden die Poolwerte mit den Mittelwerten des pH-Wertes, der NSBA und der Kalziumausscheidung durch den Harn verglichen.

3.6.2. Untersuchung der Rationsinhalte im Verlauf der Jahre 2002 bis 2004

Um Schwankungen der Inhaltstoffe von Rationen im Verlauf der Jahre zu vergleichen, wurden Rationsanalysen der Jahre 2002, 2003 und 2004 miteinander verglichen. Es wurden die DCAB, der Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Chlorid- und Schwefelgehalt der Totalen-Mischration verglichen.

3.6.3. Untersuchung der Effekte der Rationsinhalte auf die Wirkung von Anionen

Um die Effekte der Rationsinhalte auf die Wirkung der Anionen zu untersuchen, wurden die Gehalte der Inhaltsstoffe der Ration dem Harn-pH, der NSBA und dem Kalziumgehalt im Harn gegenübergestellt.

3.6.4. Vergleich von Betrieben mit und ohne Anionenrationen

Zur Diagnostik der Wirksamkeit von Anionenrationen müssen die Unterschiede zwischen den Betrieben, die Anionenrationen einsetzen, zu solchen, die keine Anionenrationen einsetzen, bekannt sein. Hierzu wurden folgende Bereiche verglichen:

1. Vergleich der Rationszusammensetzung mit und ohne Anionen.
2. Vergleich des Säuren-Basen-Haushaltes der Vorbereiter und Frischkalber mit und ohne Anionen.
3. Vergleich der Mengen- und Spurenelemente der Vorbereiter und Frischkalber mit und ohne Anionen.
4. Vergleich ausgewählter Stoffwechselparameter zur Überprüfung positiver Effekte der Anionen auf die Gesundheit der Vorbereiter und Frischkalber.

3.6.5. Vergleich der Betriebe mit und ohne Wirkung der Anionenrationen

Durch den Vergleich von Betrieben die Anionen mit Erfolg füttern und solchen, die ohne den gewünschten Effekt Anionen füttern, ergeben sich mögliche Fehlerquellen und weitere Parameter zur Charakterisierung eines erfolgreichen Einsatzes von Anionen. Die Betriebe wurden anhand der Wirkung der Anionen eingeteilt. Durch Erhebung einer genauen Anamnese wurde die Gebärpareseinzidenz erfragt und die Betriebe in drei Gruppen unterteilt:

Tab. 18: Einteilung nach Gebärpareseinzidenz

Gruppe	Gebärpareseinzidenz
1. Anionen mit guter Wirkung	< 3 % der Kalbungen
2. Anionen mit befriedigender Wirkung	zw. 3 und 6 % der Kalbungen
3. Anionen ohne Wirkung	> 6 % der Kalbungen

Des Weiteren wurde die Wirkung der Anionen nach labordiagnostischen Gesichtspunkten eingeteilt, so dass sich zwei Gruppen von Betrieben ergaben:

Tab. 19: Einteilung nach labordiagnostischen Gesichtspunkten

Gruppe	pH-Wert im Harn	Kalziumausscheidung über den Harn
1. Anionen wirken	< 7,8	> 5 mmol/l
2. Anionen ohne Wirkung	>7,8	< 5 mmol/l

Es wurden folgende Bereiche untersucht:

1. Vergleich der Rationszusammensetzung mit und ohne Wirkung der Anionen.
2. Vergleich des Säuren-Basen-Haushaltes der Vorbereiter und Frischkalber mit und ohne Wirkung der Anionen.
3. Vergleich der Mengen- und Spurenelemente der Vorbereiter und Frischkalber mit und ohne Wirkung der Anionen.
4. Vergleich ausgewählter Stoffwechselparameter zur Überprüfung positiver Effekte bei Wirkung der Anionen auf die Gesundheit der Vorbereiter und Frischkalber.

3.6.6. Untersuchung der möglichen Fehlerquellen bei Fütterung der Anionen

Die Fehlerquellen beim Einsatz von Anionen sind eine zu hohe DCAB, ein zu hoher Kaliumgehalt, ein zu niedriger Kalziumgehalt und ein zu niedriger Schwefelgehalt in der Ration. Die Rationen wurden nach hoher und niedriger DCAB (4.5.6.1.), hohem und niedrigem Kaliumgehalt (4.5.6.2), hohem und niedrigem Kalziumgehalt (4.5.6.3.) und hohem und niedrigem Schwefelgehalt (4.5.6.4) aufgeteilt und jeweils miteinander verglichen. Als Grenzewerte dienen die Nährstoffempfehlungen nach dem National Research Council von 2001 (Tab.3).

3.6.7. Darstellung einzelner Betriebe

3.6.7.1 Darstellung von Betrieben mit Anionenrationen

In diesem Teil der Studie werden 2 Betriebe über einen Zeitraum von 8 Wochen untersucht. In beiden Betrieben wurden die Anionen über die totale Mischration gestreut. Der erste Betrieb (Betrieb 1) erhöhte die Anionenmenge kontinuierlich. Der zweite Betrieb fütterte die Anionen nur Tieren ab der zweiten Laktation. So wurden in diesem Betrieb zwei Gruppen von Tieren, also Tiere mit und ohne Anionen, untersucht. Es wurde der Säuren-Basen Haushalt und die Kalziumausscheidung untersucht.

3.6.7.2 Darstellung eines Betriebes, der mit der Anionenfütterung beginnt

Es wird ein Betrieb untersucht, der mit der Fütterung von Anionenrationen bei den Vorbereitern beginnt. Es werden der Harn-pH, die NSBA und die Kalziumausscheidung mit dem Harn sowie die Rationsinhaltsstoffe analysiert

3.7 Statistische Methoden

Die Erfassung und Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit dem Statistikprogamm SPSS Version 12.

a) Untersuchung der pH-Messverfahren im praktischen Einsatz

Zum Vergleich der Messverfahren wurde eine lineare Regressionsanalyse sowie ein Methodenvergleich nach Bland und Altmann (1986) durchgeführt. Die grafische Darstellung erfolgt in Scatterplots mit einer Regressionsgeraden beziehungsweise einer Bezugslinie zur Differenz der gemessenen Werte = 0.

b) Vergleich von Mittelwerten und Poolwerten

Das errechnete arithmetische Mittel ($x_{ar.}$) wurde dem gemessenen Poolwert gegenübergestellt und verglichen. Zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den für jeweils einen Parameter verfügbaren Mittel- und Poolwerten wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet und eine lineare Regression durchgeführt. Die grafische Darstellung erfolgt in Scatterplots mit einer Regressionsgeraden. Zudem wurden die Geradengleichungen ($y = bx + a$) und die Bestimmtheitsmaße angegeben.

c) Untersuchung der Rationsinhalte im Verlauf der Jahre 2002 bis 2004

Zum Vergleich der einzelnen Parameter innerhalb eines Jahres wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die grafische Darstellung erfolgt mit Hilfe von Box- und Whisker-Plots. Zusätzlich wurden die arithmetischen Mittel ($x_{ar.}$), die Standardabweichungen (s), Minimum- und Maximumwerte ($x_{min,}$ x_{max}) sowie die Quartile ($x_{0,25}$, $x_{0,5}$, $x_{0,75}$) berechnet.

d) Untersuchung der Effekte der Rationsinhalte auf die Wirkung von Anionen

Zur Untersuchung der Effekt der Rationsinhalte auf die Wirkung der Anionen wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen den Laborparametern (Harn-pH, NSBA, Kalziumgehalt im Harn) und den Rationsinhalten ermittelt. Zur grafischen Darstellung wurden Streudiagramme verwendet.

e) Vergleich von Betrieben mit und ohne Anionenrationen

Zum Vergleich der Betriebe mit und ohne Anionen wurde bei den gemessenen Blut und Harnparametern ein parametrischer Test durchgeführt. Dies stützt sich auf den zentralen Grenzwertsatz der Wahrscheinlichkeitsrechnung, da bei dieser Untersuchung Poolwerte verglichen wurden (LORENZ 1962). Bei dem Vergleich der Rationsinhalte wurde auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen. Zur grafischen Darstellung wurden Box- und Whisker-Plots verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgesetzt. Bei den gemessenen Harn und Blutparametern wurde ein t-Test und bei den Rationsinhalten ein Mann-Whitney-Test (U-Test) durchgeführt. Zusätzlich wurden die arithmetischen Mittel ($x_{ar.}$), die Standardabweichungen (s), die Minimum- und Maximumwerte ($x_{min,}$ x_{max}) sowie die Quartile ($x_{0,25}$, $x_{0,5}$, $x_{0,75}$) berechnet.

f) Vergleich der Betriebe mit und ohne Wirkung der Anionen

Zum Vergleich der Betriebe mit und ohne Wirkung der Anionen wurde bei den gemessenen Blut und Harnparametern ein parametrischer Test durchgeführt, und bei dem Vergleich der Rationsinhalte wurde ebenfalls auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen. Bei der Untersuchung der Einteilung in drei Gruppen wurde bei den Blut- und Harnparametern ein Vergleich mit Hilfe der Anova durchgeführt. Beim Vergleich der Rationsinhalte wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Bei der Einteilung in zwei Gruppen durch den Harn-pH und die Kalziumausscheidung mit dem Harn wurden die Gruppen in gleicher Weise wie beim Vergleich der Betriebe mit und ohne Anionen verglichen.

g) Untersuchung der Fehlerquellen bei Fütterung von Anionen

Bei der Untersuchung der Fehlerquellen ergaben sich auch wieder zwei Gruppen von Betrieben. Zum Vergleich der Betriebe mit hohen oder niedrigen Inhalten der Ration wurde in analoger Weise wie bei den zwei zuvor durchgeführten Untersuchungen (e und f) vorgegangen.

So wurde auch bei dieser Untersuchung bei den gemessenen Harnparametern ein parametrischer Test (t-Test) und bei dem Vergleich der Rationsinhalte ein nicht-parametrischer Test durchgeführt (U-Test). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

h) Darstellung einzelner Betriebe

Bei der Darstellung einzelner Betriebe wurden die arithmetischen Mittelwerte in Tabellen dargestellt. Die Einzelwerte der gemessenen Parameter wurden mit Hilfe eines Streudiagrammes grafisch dargestellt.

Bei der Untersuchung zur Art der Verabreichung wurden der Harn-pH, die NSBA und der Kalziumgehalt im Harn durch Streudiagramme der Zeit gegenübergestellt.