

### **3. Eigene Untersuchungen**

#### **3.1. Material und Methoden**

##### **3.1.1. Projektbetrieb**

Die Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden auf einem milcherzeugenden Betrieb mit weiblicher Nachzucht in Brandenburg durchgeführt. Der Betrieb wird biologisch-dynamisch nach den Richtlinien des DEMETER-Verbandes bewirtschaftet und seitens der Betriebsleitung wird ein weitgehender Verzicht auf konventionelle Behandlungsmethoden angestrebt.

Der Betrieb ist dem Landeskontrollverband Brandenburg e.V., Waldsiedersdorf angeschlossen und nutzt das EDV-Programm „HERDE 2“ Version 3.04.“ der Firmen Data Service Paretz Agrosoft GmbH und der Software Projektierungs- und Handels GmbH als Betriebsmanagement-Programm, in dem unter anderen die Daten der Milchleistungsprüfung (MLP) elektronisch aufgearbeitet werden.

Auf dem Betrieb wurden alle Untersuchungen und Behandlungen der Tiere von Tierärztinnen durchgeführt, so dass während des gesamten Versuchszeitraumes die Herde unter tierärztlicher Kontrolle stand.

##### **3.1.1.1. Tiere und Reproduktion**

In die Untersuchungen ging die gesamte etwa 300 Kühe umfassende Herde des Betriebes ein. Es handelte sich um überwiegend horntragende Tiere der Rasse Schwarzbuntes Milchrind mit hohem Holstein-Friesian-Anteil. Die weiblichen Tiere, die im Versuchszeitraum in die Herde eingeführt wurden, stammten aus der eigenen Nachzucht. In den Gruppen liefen zugekaufte Bullen mit und deckten im Natursprung. Die durchschnittliche Jahresleistung der Herde betrug zu Untersuchungsbeginn rund 5000 kg Milch und belief sich zum Ende der Untersuchungen auf etwa 5700 kg Milch.

### **3.1.1.2. Haltung der Tiere**

Der Betrieb hatte zum Zeitpunkt der Untersuchungen drei voneinander getrennte Stalleinheiten: den Milchproduktionsstall, den Abkalbebereich mit der Möglichkeit, erkrankte Tiere gesondert in Anbindehaltung aufzustellen (Krankenabteilung) und die Aufzuchtanlage für die weibliche Nachzucht. In den Sommermonaten wurde den Tieren ganztägiger Weidegang gewährt.

#### **3.1.1.2.1. Stall 1 (Milchproduktionsstall)**

Laktierende Tiere wurden im Winter im Tieflaufstall mit Stroheinstreu gehalten. Diese Tiere waren in vier Leistungsgruppen mit einer maximalen Stallplatzkapazität von 90 Tieren pro Gruppe aufgestellt. Einmal monatlich wurden die Leistungsdaten der Tiere anhand der MLP-Ergebnisse überprüft und die Kühe gegebenenfalls in eine andere Leistungsgruppe umgestellt. Während des Untersuchungszeitraumes wurde im September 1998 zur Senkung der Neuinfektionsrate in Verbindung mit dem Aufbau einer mastitisunverdächtigen Herde mit dem Aufbau einer Gruppe mit ausschließlich primiparen Tieren begonnen. Zum Ende der Untersuchungen bestand diese Gruppe aus ausschließlich primiparen Tieren und einigen wenigen, nachweislich eutergesunden multiparen Tieren mit mittlerer Milchleistung.

Die Kühe wurden sechs bis acht Wochen vor dem geschätzten Kalbetermin trocken gestellt und in die Trockenstehergruppe umgestellt. Das gruppenweise Trockenstellen erfolgte einmal pro Woche. Tiere, die zur monatlichen MLP eine Milchleistung von unter fünf Litern Tagesmelk aufwiesen, wurden schon vor diesem Zeitpunkt trocken gestellt.

#### **3.1.1.2.2. Stall 2 (Kontrollbereich)**

In dieser Stalleinheit befanden sich die zur Abkalbung anstehenden trockenstehenden Kühe und hochtragenden Färsen (Abkalbevorbereitung), der Abkalbebereich und die Anbindestallabteilung für erkrankte Tiere.

Trockenstehende Kühe und hochtragende Färsen wurden in den Wintermonaten getrennt voneinander in der Abkalbevorbereitung in Gruppen bis zu 20 Tieren auf Tiefstreu gehalten. In den Sommermonaten befanden sich diese Tiere bis unmittelbar vor und teilweise zur Abkalbung auf der Weide.

Im Abkalbbereich wurden die frischmelkenden Kühe mit Kalb in Einzelbuchten auf Stroh gehalten. Hier verblieben diese Tiere in der Regel während der Kolostralmilchphase über fünf Tage und wurden nach erfolgter Eutergesundheitskontrolle in den Milchproduktionsstall umgestallt.

Die „Krankenabteilung“ dieser Stalleinheit bestand aus einer Anbindehaltung auf Stroh, in der täglich ausgemistet wurde. In diesem Bereich wurden euterkrankte sowie anderweitig erkrankte Tiere und auch frischmelkende Kühe ohne Kalb aufgestallt.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden trockenstehende Tiere zur Beobachtung bis eine Woche nach Trockenstelltermin in der Anbindehaltung aufgestallt, später wurde darauf verzichtet und eine unmittelbare Umstellung in die Trockenstehergrupper oder auf die Weide durchgeführt, was zu einer Vermeidung von Mastitiden während der Trockenstehzeit führte.

### **3.1.1.2.3. Aufzuchtanlage**

Die weibliche Nachzucht wurde in den Wintermonaten in der Aufzuchtanlage des Betriebes in Gruppen auf Tiefstreu zum Teil mit Auslauf gehalten. In den Sommermonaten befanden sich die Färsen auf der Weide. In den Wintermonaten wurden hochtragende Färsen kurz vor der Abkalbung getrennt von den trockenstehenden Kühen auf Tiefstreu in der Abkalbevorbereitung aufgestallt. Die Umstellung erfolgte aufgrund regelmäßiger Sichtkontrollen, bei stark aufeuternden Tieren. In den Sommermonaten kamen diese Färsen zu den trockenstehenden Kühen auf die Weide.

### **3.1.1.3. Melken**

Die Kühe im Produktionsbereich wurden zweimal täglich in einem Polygon–vier-mal- sechs–Melkstand der Firma FULLWOOD gemolken. Die Melkarbeit erfolgte in geteilter Schicht über je 4 Stunden von jeweils 2 MelkerInnen und in der Regel einem Treiber. Gemolken wurde in der Reihenfolge der Leistungsgruppen: Gruppe 1 (frischmelkende Kühe / Anfütterungsgruppe / Primipare<sup>1</sup>) Gruppe 2 (Hochleistungsgruppe) Gruppe 3 (Kühe mit mittlerer Leistung) Gruppe 4 (Altmelker). Vor dem Melken wurde eine Vorgemelksprobe aller vier Viertel beurteilt und es erfolgte eine Reinigung der Euter mit einem Euterlappen pro Kuh. Stark verschmutzte Euter wurden mit einer Euterdusche vorgereinigt und mit

---

<sup>1</sup> Seit September 1998 Aufnahme primiparer Tiere weitgehend nur in dieser Gruppe

Euterlappen gesäubert und getrocknet. Es wurden jeweils sechs Tiere zunächst angerüstet und dann das Aggregat angehängt. Nach dem Melken wurde jede Kuh mit einem jodhaltigen Mittel gedippt.

Laktierende Kühe im Abkalbbereich und Krankenabteil (Stall 2) wurden zweimal täglich mit einer Rohmelkanlage der Firma HAPPEL gemolken. Die Melkarbeit wurde von einer Melkerin durchgeführt, die an ihren freien Tagen von Melkern des Produktionsstalles vertreten wurde. Hierbei wurde folgende Melkreihenfolge eingehalten: Frischmelker in den Abkalbbuchten Frischmelker in der Anbindung erkrankte Tiere ohne Störungen der Eutergesundheit erkrankte Tiere mit subklinischer Eutererkrankung Tiere mit chronisch klinischer Eutererkrankung Tiere mit akut klinischer Eutererkrankung. Es erfolgte eine Zwischendesinfektion der Melkzeuge mit Peressigsäure (0,3 %) zwischen jeder Kuh. Ansonsten erfolgte die Melkarbeit dieser Stalleinheit analog zu der im Produktionsbereich (Stall 1).

#### **3.1.1.4. Fütterung**

Unmittelbar nach dem Melken wurden die Tiere im Sommer wie im Winter im Fressgitter fixiert (zu-)gefüttert. Die Rationsgestaltung der Sommer- und Winterfütterung erfolgte entsprechend den DEMETER-Verbandsrichtlinien und dem Futterangebot mit hofeigenem Futter bestehend aus Grünfutter, Kleegrassilage, Maissilage, Heu und Getreideschrot. Das Kraftfutter wurde nicht individuell, sondern entsprechend der Zugehörigkeit zur jeweiligen Leistungsgruppe zugeteilt. Die Kühe der drei ersten Leistungsgruppen erhielten dabei Mengen zwischen 6 und 9 kg je Tag, die der Altmelkergruppe zwischen 1 und 3 kg. Zusätzlich wurde der Ration ein Mineralsalzgemisch entsprechend dem Laktationsstadium der Gruppe beigefügt. Gefüttert wurde mit einem Futtermischwagen.

#### **3.1.1.5. Erkrankte Tiere**

Tiere, die während des Melkens vom Personal als an einer klinischen Mastitis oder einer anderen sichtbaren Störung erkrankt eingestuft wurden, wurden von diesem unmittelbar nach dem Melken in die Krankenabteilung des Stalles 2 umgestellt und dort der Tierärztin vorgestellt, die die Untersuchung und Behandlung der Tiere durchführte und die Dokumentation in das Behandlungsjournal und das EDV-Programm vornahm. Die

Entscheidung über die Rückkehr der Tiere in die Produktion nach Abschlussuntersuchung und nach Ablauf der Wartezeit wurde ebenfalls von der Tierärztin getroffen.

### **3.1.1.6. Milchleistungsprüfung**

Die Milchleistungsprüfung (MLP) des Landeskontrollverbandes Waldsiedersdorf e.V. (LKV) erfolgte einmal monatlich innerhalb der ersten Woche des laufenden Monats. Damit erhielt der Betrieb monatliche Einzeltierinformationen über Tagesmilchleistung, Fett-, Eiweiß- und Laktosegehalt der Milch sowie über die Zahl somatischer Zellen im Gesamtmelk. Diese Daten wurden über eine Schnittstelle des Programmsystems Herde 2 importiert und standen der Untersuchung zur Verfügung.

Stichprobenartig wurde im Untersuchungsbetrieb zur Überprüfung der Fütterung von jeder fünften Kuh die Milchprobe auch auf ihren Harnstoffgehalt untersucht. Die Ergebnisse der MLP lagen in der Regel zwei bis vier Tage nach dem Tag der Prüfung dem Betrieb vor.

### **3.1.2. Versuchsablauf**

In der vorliegenden Arbeit wurden über einen Zeitraum von 16 Monaten (1.12.1997 bis 31.03.1999) sowohl ein systematisch durchgeführtes Programm zur homöopathischen Mastitisprophylaxe als auch eine standardisierte Therapie mit homöopathischen Komplexmitteln dahingehend geprüft, ob sie als Alternative zu den derzeit praktizierten und empfohlenen Behandlungsstrategien geeignet sind.

Die Erfolge des Prophylaxeprogrammes und der therapeutischen Maßnahmen wurden anhand der Ergebnisse klinischer Euter- und bakteriozytologischer Milchsekretuntersuchungen zu Beginn, während des Verlaufes und nach Abschluss der Behandlung beurteilt. Des Weiteren wurden die monatlichen Milchleistungsprüfungsdaten des Landeskontrollverbandes Brandenburg e.V. (LKV) in die Auswertung einbezogen.

### **3.1.2.1. Voruntersuchungen**

Im Juni 1997 wurde mit einer Einarbeitungszeit und einer Reihe von Voruntersuchungen auf dem Betrieb begonnen, um die Eignung der zum Einsatz kommenden homöopathischen Komplexmittel zu überprüfen und abzusichern, die optimale Applikationsart der Homöopathika und die Durchführbarkeit des Probenplanes zu ermitteln. Im Dezember 1997 begann die praktische Durchführung der Untersuchungen.

### **3.1.2.2. Untersuchungen zur homöopathischen Prophylaxe**

Die Untersuchungen zur Mastitisprophylaxe wurden als randomisierter, placebokontrollierter Doppelblindversuch durchgeführt, bei der das Verum typ- und konstitutionsorientierte Komponenten zur Stärkung der allgemeinen und euterständigen unspezifischen Abwehr enthielt. Das Placebo war frei von den homöopathischen Komponenten, ansonsten in identischer Formulierung.

#### **3.1.2.2.1. Gruppeneinteilung**

Die Kühe des Betriebes waren neben der Ohrmarkennummer mit einer Halsbandnummer (Tiernummer) von 001 bis 399 gekennzeichnet.

A priori wurden zwei Gruppen gebildet. Über die Gruppenzugehörigkeit entschied die letzte Ziffer der Halsbandnummer. Tiere mit der Endziffer 0 bis 4 wurden der homöopathisch-prophylaktisch behandelten Gruppe „H<sub>ges.</sub>“ und Tiere mit der Endziffer 5 bis 9 der Kontrollgruppe „K<sub>ges.</sub>“ zugeordnet. Es wurden vom Hersteller zwei Formulierungen geliefert, die mit „A“ und „B“ gekennzeichnet waren. Lediglich der Hersteller besaß Kenntnis darüber, welche der Formulierungen das Verum beinhaltete. Die Zuordnung des Codes zu den Tieren in der Untersuchung erfolgte erst nach Abschluss der Untersuchungen und ergab für „A“ das Verum, also Zugehörigkeit zu Gruppe H<sub>ges.</sub> und für „B“ das Kontrollpräparat, sprich Gruppe K<sub>ges.</sub>.

Die Halsbandnummern wurden den Tieren unmittelbar nach der ersten Kalbung und ohne Kenntnis vorliegender Untersuchungsergebnisse von dem Anlagenleiter zugeteilt, so dass von einer zufälligen Verteilung der Tiere auf die Gruppen ausgegangen werden konnte. Eine Prüfung der Halsbandendziffern im Vorfeld der Untersuchung ergab eine annähernd gleiche Größe beider Gruppen. Neuzugänge in die Milchviehherde (Erstkalbinnen) während des

Untersuchungszeitraumes erhielten unmittelbar nach der Kalbung Halsbandnummern, die die Tiere alternierend den Gruppen „A“ und „B“ zuführten.

Daraus ergaben sich die in **Tabelle 7** dargestellten Gruppen und Behandlungen.

**Tabelle 7: Gruppenzugehörigkeit und Behandlungen**

Gruppe:	Halsbandendnummer	Behandlung:
<b>H<sub>ges.</sub></b>	0, 1, 2, 3, 4	Präparat „A“ = Verum
<b>K<sub>ges.</sub></b>	5, 6, 7, 8, 9	Präparat „B“ = Kontrolle

Die Behandlungen wurden sowohl zum Trockenstellen der Kühe als auch nach dem Abkalben der Kühe und Erstkalbinnen durchgeführt. Da bei der Auswertung der Ergebnisse auch zwischen Kühen unterschieden werden sollte, die mit oder ohne antibiotischen Schutz trockengestellt wurden, ergaben sich einschließlich der ebenfalls getrennt zu betrachtenden Erstkalbinnen folgende in der **Tabelle 8** dargestellten Untergruppen.

**Tabelle 8: Untergruppen der homöopathisch-prophylaktischen Behandlung und der Kontrollgruppen für Kühe und Erstkalbinnen**

Gruppe:	Laktationsnummer:	Behandlung:
<b>H<sub>3</sub></b> (n=81)	≥ 1	Verum zum Trockenstellen und zur Kalbung und antibiotisch trockengestellt
<b>K<sub>3</sub></b> (n=76)	≥ 1	Placebo zum Trockenstellen und zur Kalbung und antibiotisch trockengestellt
<b>H<sub>2</sub></b> (n=23)	≥ 1	Verum zum Trockenstellen und zur Kalbung
<b>K<sub>2</sub></b> (n=24)	≥ 1	Placebo zum Trockenstellen und zur Kalbung
<b>H<sub>1</sub></b> (n=49)	1	Verum zur Kalbung
<b>K<sub>1</sub></b> (n=47)	1	Placebo zur Kalbung

### 3.1.2.2.2. Protokoll der Prophylaxebehandlungen

Kühe erhielten eine Erstbehandlung mit Verum oder Placebo gemäß ihrer Gruppenzugehörigkeit über drei Tage vor dem Trockenstellen und einen zweiten Behandlungszyklus zur Kalbung. Erstkalbinnen, die im Untersuchungszeitraum kalbten, erhielten entsprechend einen einmaligen Behandlungszyklus zur Abkalbung. Appliziert wurden jeweils 5 ml einmal täglich mit einer Einwegspritze auf die Maulschleimhaut über drei Tage. Die Arzneimittel wurden von der WELEDA AG, Arlesheim (CH) zur Verfügung gestellt. Das Verum setzte sich zu gleichen Teilen aus folgenden homöopathischen Einzelmitteln in alkoholischer Lösung zusammen: *Phosphorus D15*, *Nux vomica D6*, *Chelidonium D6*, *China D3* und *Argentum D10*.

Alle Mittel haben gemäß homöopathischer Materia Medica Beziehung zu Verdauung, Stoffwechsel und/oder Leber und wurden mit dem Ziel eingesetzt, den Stoffwechsel vor Eintritt in die neue Laktation homöopathisch zu regulieren und damit entsprechend HAMANN und KRÖMKER (1999a) ein belastungsbedingtes Risiko für Eutergesundheitsstörungen in der Folgelaktation zu minimieren. Nähere Angaben zu den aufgeführten Arzneimitteln finden sich im Literaturteil unter Punkt 2.2.7.2. und im ANHANG in der **Tabelle 47** (Seite 188).

Die Entscheidung, ob die Kühe zusätzlich zur Versuchsmedikation mit oder ohne antibiotischem Schutz trockengestellt wurden, wurde davon abhängig gemacht, ob die Kühe in den Milchproben vor dem Trockenstellen bakteriologisch positive Befunde mit euterpathogenen Erregern und/oder zytologisch auffälligem Befund mit Zellzahlen > 500.000 Zellen pro ml in Verbindung mit einem klinisch auffälligen Euterbefund mit starken, deutlichen bindegewebigen Zubildungen aufwiesen. Falls dies zutraf, wurden alle laktierenden Viertel der betreffenden Kuh mit einem antibiotischen Langzeitpräparat versorgt. Im Falle des medikamentellen Trockenstellens kamen Injektoren mit 200 mg *Cloxacillin-Natrium 1 H<sub>2</sub>O* und 800 mg *Cloxacillin, N,N'-Dibenzylethylendiamin-Salz* zum Einsatz, die nach Desinfektion der Zitzenkuppe mit Alkohol nach dem letzten Melken in jedes Viertel der Kuh verabreicht wurden.

Eine Übersicht der Kriterien ist der **Tabelle 9** zu entnehmen.



**Tabelle 9: Kriterien für das Trockenstellen der Kühe mit und ohne Antibiotika**

Bakteriologischer Befund:	Bakteriozytologischer Befund:				
	negativ				positiv
	≤ 500.000		> 500.000		≤/ > 500.000
Klinische Vorgeschichte <sup>*)</sup> :	nein	ja	nein	ja	nein / ja
Trockenstellen mit Antibiotika		X		X	X
Trockenstellen ohne Antibiotika	X		X		

<sup>\*)</sup> Vorliegen einer klinischen Eutererkrankung in der auslaufenden Laktation und/oder klinisch auffälliger Euterbefund mit deutlich erfassbaren bindegewebigen Zubildungen im Drüsengewebe

### 3.1.2.2.3. Milchprobennahme und klinische Euteruntersuchung

Zu definierten Terminen wurden zum Zeitpunkt des Melkens Anfangsviertelgemelkproben genommen. Nach Reinigung des Euters mit einem Euterlappen wurde das Vorgemelk grobsinnlich beurteilt. Es folgte die Desinfektion der Zitzenkuppe mit Alkohol und Probennahme in sterile Milchprobenröhrchen.

Im Zusammenhang mit der Milchprobennahme erfolgte nach dem Melken eine adspektorische und palpatorische Euteruntersuchung, in deren Rahmen Zitze und Drüsenparenchym beurteilt wurden. Die Befunde wurden nach einem definierten Diagnoseschlüssel festgehalten und dokumentiert. Besonderheiten wie Schwermelker, Incontinentia lactis, Beistriche, Papillomatose etc. wurden extra vermerkt (siehe auch ANHANG **Tabelle 48** und **Tabelle 49**, Seiten 189-190).

Eine vollständige Untersuchung der Milchdrüse bestand somit aus der Beurteilung des Sekretes mit grobsinnlicher Beurteilung und Ergebnis des Milch-Schnell-Testes (MST; siehe unten; nicht im Melkstand durchgeführt), der Beurteilung der Zitzen und des Drüsenparenchyms sowie der bakteriologischen und zytologischen Untersuchung der Viertelgemelkproben. Bei den Untersuchungen im Abkalbestall (im Zeitraum 0. bis 5. Tag p.p.) wurde trotz des zu erwartenden physiologisch erhöhten Zellgehaltes auf den MST nicht verzichtet, um frühzeitig einen Hinweis auf ein subklinisches oder klinisches Mastitisgeschehen zu erhalten (siehe auch 3.1.2.2.4.).

Milch-Schnell-Test (MST).

Zur indirekten, semiquantitativen Zellzahlmessung wurde der California-Mastitis-Test<sup>®</sup> der Firma Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG (WDT) genutzt.

Die Testflüssigkeit enthält einen oberflächenaktiven Stoff, hier Marlon PS 60, der Granulozyten und deren Kerne auflöst, die Desoxyribonukleinsäure freisetzen und mit dieser einen Komplex bildet, der in Gelform sichtbar wird. Als Indikator ist der Testflüssigkeit Bromkresolpurpur zugesetzt, so dass Verschiebungen des pH-Wertes der Milch in den alkalischen Bereich mit erfasst werden (GRUNERT, 1990).

Hierzu wurde von jedem Viertel etwas Milch in eine mit vier Schalen versehene schwarze Testplatte ermolken. Durch Ankippen der Testplatte wurde der Überstand abgossen und es verblieben pro Viertel circa 2 ml in den Schalen. Es wurden mindestens 2 ml der Testflüssigkeit zugegeben und durch sanft rotierende Bewegung der Testplatte mit der Milch vermischt. Die Reaktion wurde abgelesen und beurteilt. Das Beurteilungsschema erfolgte in Anlehnung an die Produktinformation zum California-Mastitis-Test<sup>®</sup> der WDT und ist der folgenden **Tabelle 10** zu entnehmen.

**Tabelle 10: Beurteilung des California-Mastitis-Test<sup>®</sup>**

Beurteilung		Reaktion	Vermutete Zellzahl <sup>1</sup> (Zellen pro ml)
-	(negativ)	keine	0 bis 200.000
(+)	(zweifelhaft)	leichte Schlieren	150.000 bis 550.000
+	(schwach positiv)	Schlieren, noch nicht schleimig	400.000 bis 1.5 Mio
++	(positiv)	stark verdickt, noch abfließend	800.000 bis 5 Mio
+++	(stark positiv)	zähschleimig, nicht mehr abfließend	> 5 Mio

<sup>1</sup>Die Erfahrungen auf dem Betrieb mit diesem Test und der Vergleich mit der zytologischen Untersuchung der Milchproben hat allerdings gezeigt, dass die Angaben des Herstellers über die bei den einzelnen Reaktionsstufen vermuteten Zellzahlen offensichtlich nicht korrekt sind. Das Kriterium positiv (++), das während der Untersuchungen die Grenze war, mit der Tiere auf dem Betrieb in die Produktion zurückgekehrt sind, lässt nach vorliegenden Untersuchungen eine deutlich niedrigere Zellzahl vermuten als in dem vorliegenden Schlüssel angegeben ist.

Trockenstellphase.

Eine Woche vor dem geplanten Trockenstellen wurde von den jeweiligen Tieren an zwei aufeinanderfolgenden Tagen Routinemilchproben als Anfangsviertelgemelkproben (RT1 und RT2) gezogen (**Tabelle 11**). Die klinische Euteruntersuchung erfolgte am ersten Probenstag (RT1). Bei unterschiedlichen bakteriologischen Ergebnissen der ersten und zweiten Milchprobe zum Trockenstellen wurde in der darauffolgenden Woche zur Absicherung der

Diagnose eine dritte Anfangsviertelgemelkprobe (RT3) genommen. Nach diesem Probenentwurf wurden die Tiere gemäß der in **Tabelle 9** (Seite 60) aufgeführten Kriterien trockengestellt.

Abkalbephase.

Von jedem Tier wurden auch nach der Abkalbung am Tag null oder eins (RK1), Tag vier oder fünf (RK2) und in der zweiten bis dritten Laktationswoche (RK3) Anfangsviertelgemelkproben für die bakteriologischen und zytologischen Laboruntersuchungen gezogen und jeweils die klinischen Euterbefunde erhoben. Im Falle, dass bei der bakteriologischen Untersuchung der dritten Milchprobe post partum (RK3) erstmals euterpathogene Erreger ermittelt wurden, wurde zur Absicherung der Diagnose eine Woche nach dieser Probennahme eine vierte Milchprobe (RK4) entnommen. Die ersten zwei Milchproben wurden im Abkalbestall entnommen (RK1 und RK2), die dritte Probe (RK3) im Melkstand nach Umstellung in den Milchproduktionsstall nach dem 5. Tag post partum. Bei auftretenden Gesundheitsstörungen in der Abkalbephase wurden die Tiere in die Krankenabteilung des Stall 2 umgestallt. Von euterkranken Kühen, die antibiotisch behandelt worden waren, wurden erst nach Ablauf der Milchsperrung Milchproben genommen. Zeitpunkt der Probennahmen und die erhobenen Befunde sind der **Tabelle 11** zu entnehmen.

**Tabelle 11: Datenerhebungsplan zum Zeitpunkt des Trockenstellens und der Kalbung**

Routine unter suchung:	Zeitpunkt:	erhobene Daten:			
		Sekret grobsinnlich	Milch-Schnell-Test (MST)	klinische Euter untersuchung	bakterio zytologische Untersuchung (AVG)
<b>RT1</b>	1 Woche vor Trockenstellen	X		X	X
<b>RT2*</b>	1 Tag nach RT1	X			X
<b>RK1</b>	Tag 0-1 post partum	X	X	X	X
<b>RK2</b>	Tag 4-5 post partum	X	X	X	X
<b>RK3*</b>	2 – 3 Wochen post partum	X		X	X

\*) bei unklaren bakteriozytologischen Befunden erfolgte eine Woche nach RT2 bzw. RK3 eine weitere Untersuchung

### 3.1.2.2.4. Kontrolle der Tiere

#### Kontrolle der trockengestellten Kühe.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Tiere nach dem letzten Melken aus dem Milchproduktionsstall in eine separate Reihe der Anbindehaltung umgestellt und dort trockengestellt. Die Tiere verblieben in der Anbindehaltung für eine Woche und wurden dort täglich adspektorisch kontrolliert. Tiere, die bei der Adspektion des Euters auffielen, wurden durch Palpation, Temperaturkontrolle und nötigenfalls durch visuelle Sekretkontrolle beurteilt.

Im Laufe der ersten Untersuchungsmonate zeigte sich, dass immer wieder Tiere, die ohne antibiotischen Schutz trockengestellt wurden ( $H_2$ ,  $K_2$ ), eine klinisch sichtbare Mastitis entwickelten. Diese Beobachtung erfolgte zu gleichen Teilen in beiden Behandlungsgruppen, wie der **Tabelle 12** zu entnehmen ist.

**Tabelle 12: Klinische Trockenstehermastitiden**

Tiere mit klinischen Mastitiden innerhalb zwei Wochen nach dem Trockenstellen		
Gruppe:	Tiere (n)	Mastitisrate (%)
<b><math>H_2</math> (n=29)*</b>	6	21
<b><math>K_2</math> (n=30)*</b>	6	20

n.s.

\*) Anzahl aller in der jeweiligen Behandlungsgruppe im Untersuchungszeitraum ohne Antibiotika trockengestellten Tiere

Diese insgesamt 12 Tiere wurden nach Behandlung ihrer Mastitiden nachträglich medikamentell trockengestellt und nicht in die Auswertung genommen. Nachdem als mögliche Ursache hierfür die Hygiene im Anbindestall erkannt wurde, wurde im weiteren auf eine Kontrolle trockengestellter Kühe in der Krankenabteilung verzichtet und die Tiere direkt nach dem Trockenstellen ausgestallt, wonach keine neuen Trockenstehermastitiden mehr verzeichnet wurden. Die Trockensteherkontrolle erfolgte somit ab Juni 1998 alle zwei Tage über einen Zeitraum von zwei Wochen durch Adspektion.

### Kontrolle der frischmelkenden Kühe und Erstkalbinnen.

Die Kontrolle der frischmelkenden Tiere erfolgte während der Kolostralphase für fünf Tage im Abkalbestall. Unmittelbar am Tag der Kalbung wurde im Zuge der ersten Milchprobennahme die Eutergesundheit klinisch überprüft (RK1). Bei Tieren, die in diesem Zusammenhang durch stark positive Befunde im MST bzw. insbesondere durch unterschiedlich stark ausgeprägte Befunde auf den einzelnen Eutervierteln auffielen, wurde nachfolgend täglich bis zum fünften Tag post partum eine Sekretkontrolle durchgeführt. Am 4. bis 5. Tag post partum (RK2) erfolgte eine abschließende Kontrolle der Eutergesundheit. Gesunde Tiere wurden dann nach dem 5. Tag in den Milchproduktionsstall umgestellt und erst bei der dritten Milchprobennahme (RK3) erneut untersucht. Tiere mit im MST stark erhöhten Zellzahlen in der Milch verblieben zur weiteren täglichen Beobachtung und Sekretkontrolle in der Anbindehaltung. Erst wenn der MST maximal als zweifach positiv (++) im Anfangsgemelk beurteilt wurde oder Ergebnisse der ersten Milchleistungsprüfung mit Zellzahlen unter 300.000 Zellen pro ml vorlagen, kamen die Tiere in die Produktion.

### **3.1.2.3. Untersuchungen zur Therapie klinischer Mastitiden mit Homöopathika**

Die Untersuchungen zur Mastitistherapie wurden mittels eines alternierenden Zuteilungsverfahrens durchgeführt. 50 % der im Untersuchungszeitraum erstmalig auftretenden klinischen Mastitiden wurden mit homöopathischen Komplexmitteln behandelt, die auf vier unterschiedliche Verlaufsformen der Mastitis abgestimmt waren. Die anderen 50 % wurden im Sinne einer positiven Kontrollgruppe konventionell mit Antibiotika therapiert. Rezidive und Neuerkrankungen wurden mit der bei der erstmalig auftretenden Mastitis zugeteilten Therapieform behandelt.

In die Auswertung bezüglich des Heilungserfolges gelangten allerdings lediglich die im Untersuchungszeitraum erstmalig auftretenden Mastitiden.

#### **3.1.2.3.1. Gruppeneinteilung**

Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Untersuchungen zur Mastitisprophylaxe wurden alle Tiere, die an einer klinischen Mastitis erkrankten der homöopathischen Behandlungs- (HT) oder der antibiotischen Kontrollgruppe (AT) zugeordnet.

Über die Gruppenzugehörigkeit entschied bei diesen Untersuchungen der Zeitpunkt des Auftretens. Die Tiere wurden alternierend den beiden Gruppen zugeordnet und erhielten eine

Fallnummer. Daraus ergaben sich die in der **Tabelle 13** folgend dargestellten Gruppen und Behandlungen.

**Tabelle 13: Gruppenbildung für die Therapie klinischer Mastitiden**

Gruppe	Fallnummer	Behandlung
<b>HT</b> (n=149)	geradzahlige Fallnummer	homöopathische Therapie
<b>AT</b> (n=139)	ungeradzahlige Fallnummer	antibiotische Therapie

### 3.1.2.3.2. Behandlungen

Kühe, die während des Untersuchungszeitraumes an einer klinischen Mastitis erkrankten, wurden in der Anbindehaltung (Stall 2) aufgestellt, behandelt und täglich kontrolliert.

Tiere der homöopathisch behandelten Gruppe HT wurden je nach Fallaufnahme mit einem der vier nachfolgend aufgeführten homöopathischen Komplexmitteln behandelt. Tiere der Gruppe AT wurden im Sinne einer positiven Kontrollgruppe konventionell überwiegend mit antibiotischen Eutermedikamenten behandelt. Eine begleitende Therapie (z.B. Infusionen von Elektrolytlösungen) war in beiden Gruppen möglich. In der homöopathisch behandelten Gruppe wurde die Therapie mit Antiphlogistika und Antihistaminika jedoch ausgeschlossen.

#### 3.1.2.3.2.1. Homöopathische Behandlungen

Zum Einsatz kamen vier verschiedene Komplexmittel, die auf vier verschiedene klinische Ausprägungen (Stadien) der Mastitis gemäß Arzneimittelbild der homöopathischen Komponenten abgestimmt waren. Die Arzneimittel wurden von der Firma WELEDA AG, Arlesheim (CH) zur Verfügung gestellt und setzten sich wie folgt zusammen:

- Komplexmittel MT 1: Aconitum D4, Apis D4, Jodum D6, Phytolacca D6
- Komplexmittel MT 2: Belladonna compositum<sup>®</sup>, Argentum D10, Lachesis D8, Phytolacca D6
- Komplexmittel MT 3: Jodum D20, Nux vomica D6, Chelidonium compositum<sup>®</sup>, Argentum D30
- Komplexmittel MT 4: Argentum/Berberis compositum<sup>®</sup>, Nux vomica compositum<sup>®</sup>

Während die beiden Kombinationsmittel MT 1 und MT 2, die für die akuten Verlaufsformen vorgesehen waren und somit vorwiegend organotrope Mittel zur lokalen Regulierung der Entzündungssymptome enthielten, bestanden die Mittel für die chronischen Verlaufsformen analog zum Kapitel 3.1.2.2.2. über die Prophylaxebehandlung überwiegend aus stoffwechselwirksamen Mitteln, um hierüber eine konstitutionelle Stabilität der Tiere zu erreichen und damit die Selbstheilung zu fördern. Nähere Angaben zu den einzelnen Arzneimitteln sind dem Literaturteil (siehe auch Punkt 2.2.7.) und dem ANHANG **Tabelle 47** (Seite 188) zu entnehmen.

In der nachfolgenden **Tabelle 14** wurden die klinischen Symptome für die Entscheidung, welches Komplexmittel jeweils verabreicht werden sollte, zusammengestellt.

**Tabelle 14: Komplexmittel und deren Einsatz in der Mastitistherapie**

		Komplexmittel			
		MT 1	MT 2	MT 3	MT 4
<b>Allgemeinbefinden</b>		stark gestört	ungestört bis leicht beeinträchtigt	ungestört	ungestört
		mit hochgradigem Fieber (> 40,5 ° C)	Körpertemperatur kann erhöht sein (bis 40,5 ° C)	physiologische Körpertemperatur	physiologische Körpertemperatur
<b>Lokale Symptome</b>	<b>Drüsenbefund:</b>	starke Entzündungssymptome einschließlich subcutanem Euterödem	geringgradig bis mäßig ausgeprägte Entzündungssymptome; diffus verhärtet	eventuell bereits Knoten- und / oder Strangbildungen	eventuell Knoten- und / oder Strangbildungen
	<b>Sekret:</b>	Milchcharakter verloren; serös bis blutig, Fibrinflocken	Milchcharakter wässrig bis stark verändert; i.d.R. starke Flockenbildung	Milchcharakter leicht wässrig bis erhalten; Flockenbildung	Milchcharakter; erhalten; evtl. salzig
<b>weitere Befunde bzw. Bemerkungen:</b>		Inappetenz, Somnolenz, ggf. Festliegen und Diarrhoe	evtl. geringgradige Inappetenz	nur veränderte Sekret- und evtl. Drüsenbefunde	Ausheilungsstadium
<b>entspricht der Klinik der:</b> (nach Grunert et al., 1996)		<b>Mastitis acuta gravis</b>	<b>Mastitis catarrhalis acuta</b>	<b>Mastitis catarrhalis chronica</b>	<b>Mastitis catarrhalis subclinica</b>
<b>entspricht der Verlaufsform in der Studie:</b> (nach DVG, 2002)		<b>TYP A</b> (hoch- bis mittelgradige klinische Mastitis )		<b>TYP B</b> (geringgradige klinische Mastitis)	<b>TYP C</b> (subklinische Mastitis)

Homöopathisch zu behandelnde Tiere HT erhielten zweimal täglich 5 ml des der jeweiligen Erscheinungsform der Mastitis zugehörigen Komplexmittels nach Fixation des Tieres im Untergriff per Applikation der Dilution in die Backentasche mit einer Einwegspritze. Bei Änderung der Krankheitssymptome während der Behandlung entsprechend der oben genannten Klassifizierung (**Tabelle 14**) war ein Therapiewechsel zu einem der anderen drei Komplexmittel angezeigt. Die Länge der Behandlung richtete sich individuell nach der Schwere der Erkrankung und der Persistenz der Symptome im jeweiligen Erscheinungsbild. Maximal wurden zehn Behandlungen über fünf Tage für die Applikation eines der Komplexmittel angesetzt.

#### **3.1.2.3.2.2. Antibiotische Behandlungen**

Bei den konventionell zu behandelnden Tieren AT wurde nach dem im Betrieb üblichen Vorgehen verfahren. Zum primären Einsatz vor dem Vorliegen bakteriologischer Befunde kamen im Untersuchungszeitraum in Abhängigkeit von der klinischen Befundlage in Verbindung mit der Krankheitsgeschichte der Kuh *Cloxacillin / Ampicillin*-, *Cloxacillin / Neomycin*- Kombinationen, oder *Cephalosporine* und in Einzelfällen, insbesondere nach Vorliegen angefertigter Resistogramme, *Penicillin*, *Oxacillin* oder eine *Oxytetracyclin / Oleandomycin / Neomycin*- Kombination zum Einsatz.

Die Behandlung der Mastitiden erfolgte je nach Schweregrad der Mastitis überwiegend intrazisternal, in Einzelfällen in Kombination mit einer systemischen Behandlung.

Lokal behandelt wurden alle klinisch erkrankten Viertel und die im MST stark positiv (+++) eingestuften Viertel. Betroffene Viertel wurden einmal täglich nach dem Abendmelken über mindestens drei Tage nach Reinigung und Desinfektion der Zitzenkuppe intrazisternal antibiotisch versorgt. Die systemische Therapie erfolgte nach den für das jeweilige Medikament vorgeschriebenen Kriterien bzw. nach klinischer Wirkung.

#### **3.1.2.3.3. Nachbehandlung erfolglos therapierter Tiere (semi crossing over)**

Nach Therapieende oder bei Ablauf der maximalen Behandlungsdauer von fünf Tagen (innerhalb einer der oben beschriebenen Erscheinungsformen der Mastitis) folgte eine zweitägige Behandlungspause. Trat in diesem Zeitraum keine Besserung auf, folgte eine Fortsetzung des ersten Therapieverfahrens nach oben beschriebenem Behandlungsschema, wobei in der Gruppe AT in der Regel der Wirkstoff (wenn möglich nach Vorliegen des



Ergebnisses des Resistogrammes) gewechselt wurde. Konnte daraufhin keine Heilung erzielt werden, wurde im Sinne eines semi crossing over die Behandlungsgruppe gewechselt. Vormals antibiotisch behandelte Tiere wurden homöopathisch (ATx), homöopathisch behandelte Tiere wurden nun konventionell therapiert (HTx).

In Fällen, in denen unter der homöopathischen Therapie eine deutliche Verschlechterung des Krankheitsbildes (mit Verschlechterung der Allgemein- und Lokalsymptome oder Verlust des Milchcharakters des Sekretes) festgestellt wurde, erfolgte sofort ein Gruppenwechsel zur antibiotischen Behandlungsgruppe, das heißt es wurde eine antibiotische Therapie eingeleitet.

### 3.1.2.3.4. Milchprobennahme und klinische Euteruntersuchung

Zum Zeitpunkt des Auftretens einer klinischen Mastitis und vor Behandlung der Tiere wurden Viertelgemelkproben (als Doppelproben M1A und M1B, zeitlich direkt aufeinander folgend) gezogen. Da die Tiere in der Regel erst nach dem Melken der Tierärztin vorgestellt wurden, eine Behandlung aber nicht aufgeschoben werden konnte, wurden diese Proben häufig erst nach dem Milchentzug (0,5 bis 2 Stunden nach dem Melken) genommen. Weiterhin erfolgten zur Beurteilung der Behandlungsergebnisse 14 bis 21 Tage nach Behandlungsende (M2) oder vor einem Therapiegruppenwechsel (NP) nochmals eine Milchprobennahme von allen vier Vierteln des behandelten Euters (**Tabelle 15**).

**Tabelle 15: Datenerhebungsplan bei klinischen Mastitiden**

Milchprobe	Zeitpunkt	erhobene Daten			
		Sekret grobsinnlich	Milch-Schnell-Test (MST)	klinische Euteruntersuchung	bakteriozytologische Untersuchung (AVG)
<b>M1A+B</b>					
(Doppelprobe)	bei Auftreten der Mastitis	X	X	X	X
<b>M2</b>	14 – 21 Tage nach Behandlungsende	X		X	X
<b>NP</b>	vor Therapiewechsel (semi crossing over)	X	X	X	X

Das Procedere der Probennahme und die klinische Euteruntersuchung erfolgte wie unter 3.1.2.2.3. beschrieben.

### **3.1.2.3.5. Kontrolle der Tiere und Rückkehr in die Produktion**

Bei den in der Krankenabteilung (Stall 2) aufgestellten Tieren wurde täglich durch eine Allgemein- und klinische Euteruntersuchung der Verlauf der Krankheit kontrolliert. Diese Untersuchungen fanden nach dem Morgenmelken statt, bei schwer erkrankten Tieren zusätzlich nach dem Abendmelken.

Die Rückkehr der Tiere beider Behandlungsgruppen in die Milchproduktion richtete sich zunächst nach dem klinischen Befund, das heißt, dass das Sekret grobsinnlich unauffällig bzw. im Vor- und Endgemelk flockenfrei war. Weiter durfte das Sekret im MST maximal zweifach positiv (++) reagieren bzw. wenn aktuelle Daten der Milchleistungsprüfung vorlagen, sollte die Zellzahl unterhalb von 300.000 Zellen pro ml liegen. Die Rückkehr der Tiere beider Behandlungsgruppen in die Milchproduktion (Stall 1) richtete sich darüberhinaus auch nach der für die konventionelle Therapie gesetzlich vorgeschriebenen und nach Verbandsrichtlinien verdoppelten Wartezeit. Nach Ablauf der einfachen Wartezeit wurden die Tiere mit Fußbändern gekennzeichnet im Stall 1 separat in eine Kanne gemolken. Für die homöopathisch behandelte Gruppe wurde nach Behandlungsende eine theoretische Sperrfrist von vier Tagen festgelegt.

### **3.1.3. Laboruntersuchungen**

Die unter weitgehend sterilen Kautelen gezogenen Milch- und Mastitissekretproben wurden umgehend bei plus 4° Celsius aufbewahrt und nach einer Aufbewahrungszeit von höchstens sechs Tagen, in der Regel aber nach 24 bis 48 Stunden im Kliniklabor der Tierklinik für Fortpflanzung der Freien Universität Berlin bakteriozytologisch untersucht.

#### **3.1.3.1. Bakteriologische Untersuchungen**

Mit einer sterilen Einmal-Plastik-Impföse wurden aus jeder Milchprobenflasche, die zuvor nach Kühlschranksaufbewahrung auf Zimmertemperatur angeglichen und anschließend vorsichtig aufgeschüttelt wurde, je ein Tropfen Milch bzw. Mastitissekret aufgenommen. Dieser wurde auf einem Viertel der Fläche einer Schafblutagarplatte (d.h. jeweils vier Viertel

eines Tieres auf eine Platte) mit einem Durchmesser von etwa 90 mm ausgestrichen und die bei 37 ° C aerob bebrütete Platte nach einer 24-stündigen Bebrütung das erste Mal und nach einem nochmaligen 24-stündigen Aufenthalt im Brutschrank abschließend noch ein zweites Mal beurteilt und abgelesen.

Für die bakteriologische Diagnose war überwiegend die Morphologie der Koloniebildung sowie gegebenenfalls spezielle Zusatzuntersuchungen ausschlaggebend, in Einzelfällen erfolgte zusätzlich eine Gramfärbung des zu beurteilenden Isolates.

Im Einzelnen wurden die Diagnosen für die im Bestand isolierten Mastitiserreger bzw. Mastitiserregergruppen wie folgt gestellt:

Als *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) wurden grundsätzlich die Keime angesprochen, die in Form von pigmentierten, erhabenen Kolonien von 1-3 mm und mit einer „doppelzonigen“ Hämolyse wuchsen. Alle Staphylokokkenkolonien, die von einer kleineren, schmalen Hämolysezone umgeben waren, wurden einem Staphylasetest (Staphylase Test DR 595 A der Firma OXOID DIAGNOSTIC REAGENTS) unterzogen und je nach Ergebnis des Testes als *S.aureus* (Staphylasetest positiv) oder als *KNS* (Staphylasetest negativ) angesprochen.

Als *Koagulasenegative Staphylokokken* (*KNS*) wurden die Staphylokokken angesprochen, deren Kolonien auf dem Blutagar keine Hämolyse zeigten bzw. hämolytische Keime, die im Staphylasetest negativ reagierten (s.o.).

Als *Mastitisstreptokokken* (*Streptokokken*) wurden die Keime diagnostiziert, die auf dem Blutagar zarte, in der Regel durchscheinende Kolonien von bis zu 1 mm Durchmesser bildeten und von keiner oder einer unterschiedlich großen Hämolysezone umgeben waren. Ein zusätzlich erfolgter prinzipiell durchgeführter CAMP-Test sollte das Vorliegen von *S.agalactiae* ausschließen. Im zweifelhaften Fall wurde noch ein Sero B- und Sero C-Test (Streptococcal Grouping Kit DR 585 A der Firma OXOID DIAGNOSTIC REAGENTS) durchgeführt. Die Diagnose *S.agalactiae* (CAMP-Test positiv, Sero B-Test positiv) wurde während des gesamten Untersuchungszeitraumes nicht gestellt. Eine weitere Differenzierung der *Streptokokken* erfolgte wegen des umfangreichen Materials nicht.

Der Gruppe *Coliforme Keime* wurden die Keime zugewiesen, die auf Blutagar 2-4 mm große, grau-weiße, feucht-glänzende und glattrandige, teilweise auch schleimige Kolonien (selten

mit Hämolysebildung) bildeten, nicht selten mit dem für *E.coli* typischen Geruch. Eine weitere Differenzierung erfolgte ebenfalls nicht.

Unter „sonstige Erreger“ sind insbesondere *Hefen* und *Arcanobacterium pyogenes* (*A.pyogenes*) zu nennen. Ihr Vorliegen wurde anhand der typischen weißen bis cremefarbenen Kolonien (*Hefen*) bzw. kleinen, feingranulierten Kolonien mit einer schmalen Hämolysezone (*A.pyogenes*) vermutet, deren Diagnose durch eine Gramfärbung des Isolates abgesichert wurde.

Nicht eindeutig einzuordnende Befunde von isolierten Keimen wurden zur Differenzierung an das Labor des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin (Leiter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler) weitergeleitet. Für die durchgeführten Untersuchungen und jederzeit gewährte Unterstützung sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Die quantitative Erfassung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) erfolgten nach dem in der **Tabelle 16** angegebenen Schema.

**Tabelle 16: Quantitative Bewertung der Milchprobenausstriche**

	Anzahl der Kolonien
(+)	1 bis 2
+	3 bis 5
++	5 bis 20
+++	> 20

Resistogramme wurden nicht generell, sondern nur stichprobenartig oder gezielt bei bestimmten klinischen Mastitiden sowie bei besonderen Mastitiserregern im Milchlabor der Tierklinik für Fortpflanzung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin erstellt. Die geprüften Wirkstoffgruppen bzw. Wirkstoffe und das Beurteilungsschema sind im ANHANG (**Tabelle 50**, Seite 191) dargestellt.

### **3.1.3.2. Zytologische Untersuchungen**

Die zytologische Untersuchung erfolgte mit einer FOSSOMATIC 360 der Firma FOSSO, Deutschland GmbH. Dabei handelt es sich um eine automatische Zählung der Zellen nach dem fluoreszenzoptischen Prinzip. Der Messbereich reicht von 1.000 bis zu 10.000.000 Zellen pro ml. Die FOSSOMATIC kann als automatisches Fluoreszenzmikroskop angesehen werden. Die Milchprobe wird verdünnt mit einer Ethidium-Bromide-Farbstofflösung, wobei sich Fluoreszenzkomplexe zwischen dem DNA-Material im Zellkern somatischer Zellen und dem Ethidium Bromide bilden. Die Probe wird starkem Licht im blauen Wellenlängenbereich ausgesetzt. Wird der Fluoreszenzkomplex einer somatischen Zellen von diesem Lichtstrahl passiert, sendet er ein rotes Lichtsignal aus, das nach Durchgang durch einen optischen Filter von einem Fotodioden-Detektorsystem aufgefangen und in einen elektronischen Impuls umgewandelt wird. Diese Impulse werden gezählt und in einem Display zur Anzeige gebracht. Zur Untersuchung kommen 2 µl Milch. Damit die Anzahl der Zellen in einem ml dargestellt wird, werden die gezählten Impulse vor der Anzeige mal 1.000 genommen und durch 2 dividiert.

Das Zählgerät wurde für die Zählung von Milchzellen vom Hersteller eingestellt. Zur Absicherung der Richtigkeit der Zählergebnisse wurden bei jeder Zählung ebenfalls vom Hersteller in monatlichen Abständen zur Verfügung gestellte Zellsuspensionen mitgeführt und auf die vorgegebene Zellzahl hin überprüft.

### **3.1.4. Dokumentation der Befunde**

Die erhobenen Daten und Befunde wurden zunächst im Datenverarbeitungsprogramm Microsoft® EXCEL 97 erfasst. Die weitere Be- und statistische Aufarbeitung der Daten und Befunde erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows, Version 10.0 (SPSS Inc.). Die Daten der Milchleistungsprüfung, die per Modem in den Betriebsrechner und dort in das System HERDE 2 (Data Service Paretz Agrosoft GmbH und Software Projektierungs- und Handels GmbH) importiert wurden, wurden über eine Datenschnittstelle in Excel laufend übernommen.

### 3.1.5. Datenauswertung

#### 3.1.5.1. Untersuchungen zur homöopathischen Prophylaxe

A priori wurden nur Kühe und Erstkalbinnen in die Auswertung genommen, die alle im Untersuchungsplan festgelegten Behandlungen erhalten haben und die nach der Kalbung mindestens drei Monate in der Laktation waren. Die detaillierte Auflistung der Anzahl in die Auswertung übernommener Tiere und Viertel zu den jeweiligen Untersuchungsterminen in den sechs Gruppen (H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>1</sub>, K<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>1</sub>) kann der **Tabelle 21** (Kapitel 3.2.1., Seite 82) entnommen werden.

Bei den Tieren, die vor dem Zeitpunkt der Routinemilchprobennahme an einer klinischen Mastitis erkrankt waren und therapiert werden mussten, erfolgte die Milchprobennahme unmittelbar vor dem jeweiligen Therapiebeginn.

Die Beurteilung der bakteriozytologischen Befunde der Viertelgemelkproben erfolgte in Anlehnung an die Definitionen zur Beurteilung zytologisch-mikrobiologischer Befunde der DVG, 1994 (**Tabelle 17**).

**Tabelle 17: Beurteilung bakteriozytologischer Befunde von Anfangsviertelgemelken einschließlich klinischer Viertelbefunde (in Anlehnung an DVG, 1994)**

<i>Diagnosen:</i>	Nachweis euterpathogener Erreger		Zellzahl (x 1.000 / ml)		Grobsinnliche Beurteilung des Milchsekretes	
	negativ	positiv	≤ 100	> 100	unverändert	verändert
<b><u>Normale Sekretion</u></b>	X		X		X	
<b><u>Latente Infektion</u></b>		X	X		X	
<b><u>Unspezifische Mastitis</u></b>						
→ <b>subklinischer Verlauf</b>	X			X	X	
→ <b>klinischer Verlauf</b>	X			X		X
<b><u>Mastitis</u></b>						
→ <b>subklinischer Verlauf</b>		X		X	X	
→ <b>klinischer Verlauf</b>		X		X		X

Neben den in der Tabelle 17 aufgeführten Vierteldiagnosen wurde auch eine Euterdiagnose für jedes Tier formuliert. Nach Gewichtung der Viertelbefunde war das Viertel mit dem bedeutsamsten Befund ausschlaggebend für die Euterdiagnose. Von gesund zu klinisch krank erfolgte die Gewichtung in folgender Reihenfolge: normale Sekretion – latente Infektion – subklinisch unspezifische Mastitis – subklinische Mastitis – klinisch unspezifische Mastitis – klinische Mastitis.

Entsprechend wurden die bakteriologischen Befunde der Viertelgemelkproben zu Euterdiagnosen auf Tierebene zusammengefasst, wobei die diagnostizierten Erreger in der Reihenfolge ihrer Wichtigkeit als euterpathogener Mastitiserreger ausschlaggebend für den Eutergesundheitsstatus des Tieres waren. Als wichtigster Erreger wurde in Anlehnung an die DVG (1994) *S.aureus* angesehen, gefolgt von *Streptokokken*, *Coliformen Keimen* und zuletzt *KNS* und den sporadisch auftretenden (sonstigen) Erregern. Im Vorfeld wurde überprüft, ob eine dergestaltete Gewichtung die Ergebnisse verfälschen würde, da *S.aureus* und *Streptokokken* durchaus als gleichwertig anzusehen sind. Da lediglich bei 1,4 % (n=3 Tiere) der Trockenstellproben (RT) und je 0,6 % (n=2 Tiere) der Milchproben zur Kalbung (RK1) und am 4. bzw. 5. Tag p.p. (RK2) Euter eines Tieres mit *S.aureus* und *Streptokokken* infiziert waren, konnte dies vernachlässigt werden und die oben genannte Gewichtung der Erreger gewählt werden. Bei den Kontrollproben zwei bis drei Wochen p.p. (RK3) trat der Fall eines gleichzeitigen Auftretens *S.aureus*- und *Streptokokken*-infizierter Viertel bei keinem Tier auf.

Auftretende klinische Mastitiden wurden unter Berücksichtigung der in der **Tabelle 14** (Seite 66) beschriebenen klinischen Ausprägung der Mastitis in drei Ausprägungsstufen eingeteilt:

- Typ A-1: hochgradige klinische Symptome starker akuter Ausprägung  
(= Mastitis acuta gravis)
- Typ A-2: mittelgradige klinische Symptome akuter Ausprägung  
(= Mastitis catarrhalis acuta)
- Typ B: geringgradige klinische Symptome mehr chronischer bis subakuter Ausprägung (= Mastitis catarrhalis chronica)

Für eine Auswertung, bei der der Eutergesundheitsstatus der Tiere vor dem Trockenstellen berücksichtigt werden sollte, wurde aus den im Rahmen der Milchleistungsprüfung (MLP) erhobenen Zellzahlbefunden aus dem Gesamtgemelk der letzten drei Monate vor Trockenstellen der Tiere durch Bestimmung des geometrischen Mittelwertes eine theoretische

Endlaktationszellzahl berechnet. Aus diesen wurden dann zwei Eutergesundheitsklassen (EGK) zum einen mit einer mittleren Zellzahl von  $\leq 200.000$  pro ml (EGK1) und zum anderen einer mit  $> 200.000$  Zellen pro ml (EGK2) gebildet. Die Anzahl der Kühe in den jeweiligen homöopathisch-prophylaktisch behandelten (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>) und den Kontrollgruppen (K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>), unterteilt nach den oben genannten Eutergesundheitsklassen zu Untersuchungsbeginn, sind der **Tabelle 18** zu entnehmen.

**Tabelle 18: Anzahl der untersuchten Kühe in den homöopathisch-prophylaktisch behandelten und den Kontrollgruppen unter Berücksichtigung des Eutergesundheitsstatus zum Trockenstellen**

Tiere mit einer mittleren Zellzahl <sup>1</sup> von:  (EGK <sup>2</sup> )	homöopathisch-prophylaktische Behandlung		Placebobehandlung	
	mit Antibiotika trockengestellt	ohne Antibiotika trockengestellt	mit Antibiotika trockengestellt	ohne Antibiotika trockengestellt
	<b>H<sub>3</sub></b> (n=81)	<b>H<sub>2</sub></b> (n=23)	<b>K<sub>3</sub></b> (n=76)	<b>K<sub>2</sub></b> (n=24)
n-Tiere				
<b><math>\leq 200.000</math> (EGK 1)</b>	16	16	18	19
<b><math>&gt; 200.000</math> (EGK 2)</b>	65	7	58	5

- 1) geometrisches Mittel der Zellzahlen der jeweils letzten drei Milchleistungsprüfungen vor dem Trockenstellen  
2) Eutergesundheitsklasse

Im weiteren wurden die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung und der Milchmengenmessung der ersten drei Milchleistungsprüfungen (MLP) post partum der Tiere bzw. Gruppen miteinander verglichen.

Von den im Untersuchungszeitraum vom 1. Dezember 1997 bis 31. März 1999 302 trockengestellten Kühen konnten insgesamt n=204 in die Auswertungen genommen werden. Nicht zur Auswertung gelangten neben den Tieren, die zum Untersuchungsende weniger als drei Monate post partum in der Laktation waren, vier Tiere, die zum Trockenstellen eine Mastitis aufwiesen und aus diesem Grund vor dem Trockenstellen mit Antibiotika behandelt wurden. Weiterhin wurden 12 Tiere aus den unter 3.1.2.2.4. aufgeführten Gründen nicht in der Auswertung berücksichtigt (siehe auch **Tabelle 12**, Seite 63). Von den 204 ausgewerteten Tieren fehlten zu drei Untersuchungsterminen bei insgesamt zwei Tieren die



Untersuchungsergebnisse der Milchproben. Ein Tier der Behandlungsgruppe H<sub>3</sub> (n=81) konnte aufgrund einer Hypocalcämie mit Downer-cow-Syndrom zur Kalbung (RK1) und am 4. oder 5. Tag post partum (RK2) nicht beprobt werden. Bei einem Tier der Kontrollgruppe K<sub>3</sub> (n=76) konnte aufgrund eines Aufenthaltes in der Tierklinik für Fortpflanzung der FU Berlin aus anderen Gründen als einer klinischen Mastitis zwei bis drei Wochen post partum (RK3) keine Untersuchung vorgenommen werden. In den Gruppen der ohne Antibiotika trockengestellten Kühe (H<sub>2</sub>: n=23, K<sub>2</sub>: n=24) konnte zu allen Untersuchungsterminen der vollständige Datensatz erhoben werden.

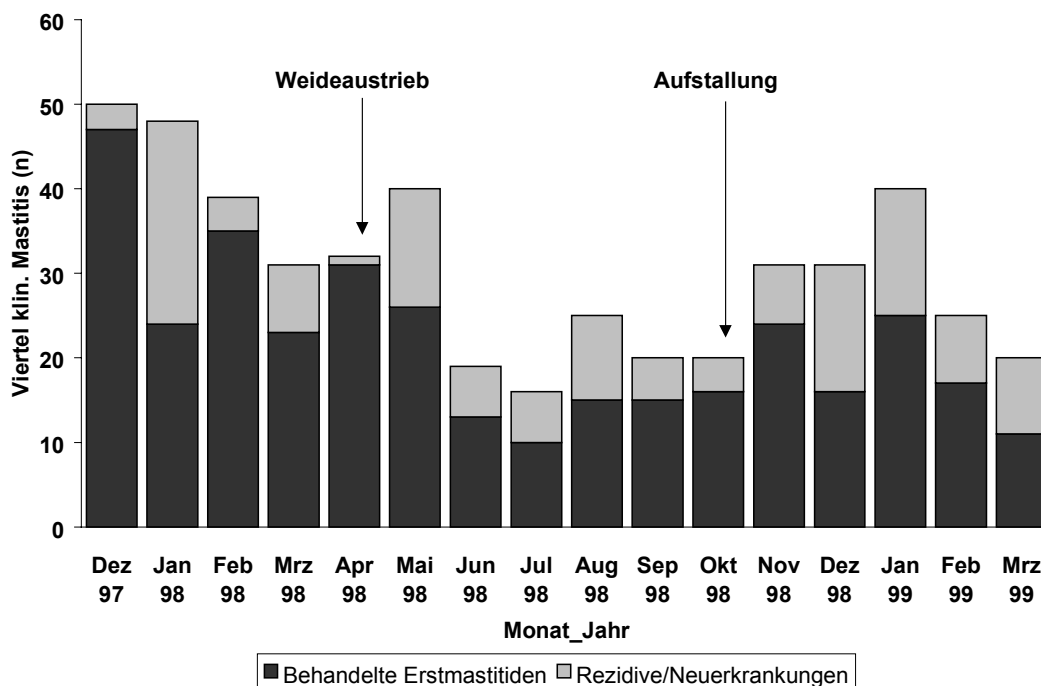
Im Untersuchungszeitraum kalbten 126 Färsen, die zum Ende der Untersuchungen mindestens drei Monate in der Laktation waren. Davon gelangten jedoch lediglich 96 Erstkalbinnen (H<sub>1</sub>: n=49, K<sub>1</sub>: n=47) in die Auswertungen, da insgesamt 30 Tiere (24 %) bereits zum Zeitpunkt der Abkalbung (bis 24 Stunden p.p.) an einer klinischen Mastitis erkrankt waren. Da bei diesen Tieren eine Wirkung der unmittelbar post partum durchgeführten Prophylaxebehandlung ausgeschlossen werden kann, wurden diese Tiere von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Von den Erstkalbinnen der Gruppe H<sub>1</sub> ließen sich zwei Tiere sowohl zur Kalbung (RK1) als auch am 4. bzw. 5. Tag post partum (RK2) im Abkalbbereich nicht gefahrlos beproben. In der Kontrollgruppe K<sub>1</sub> musste aus demselben Grund zur Kalbung bei drei Tieren, am 4. bis 5. Tag (RK2) noch bei einem Tier auf die Untersuchungsergebnisse der Milchproben verzichtet werden.

### 3.1.5.2. Untersuchungen zur homöopathischen Mastitistherapie

Im Untersuchungszeitraum wurden 288 Tiere mit einer klinischen Mastitis auf insgesamt 348 Vierteln nach oben beschriebenem Schema homöopathisch oder antibiotisch behandelt. Davon wiesen 182 Euterviertel Symptome einer hoch- bis mittelgradigen klinischen Mastitis (Typ A) und 166 Euterviertel, die einer geringgradigen klinischen Mastitis (Typ B) auf (Vergleiche auch **Tabelle 14**, Seite 66). Bei 112 Vierteln handelte es sich um klinische Mastitiden von Erstkalbinnen, während Kühe auf 236 Vierteln erkrankten. Von der Untersuchung ausgeschlossen wurden Tiere mit klinischen Mastitiden, die durch eine Infektion mit dem Erreger *A.pyogenes* verursacht wurden. Eine detaillierte Auflistung der Anzahl untersuchter Tiere und Viertel zu den jeweiligen Untersuchungsterminen in den beiden Therapiegruppen (HT, AT) erfolgte in der unter 3.2.2. aufgeführten **Tabelle 29** (Seite 102).

Die im Untersuchungszeitraum von Dezember 1997 bis März 1999 erstmals aufgetretenen und behandelten klinischen Mastitiden einschließlich der aufgetretenen Rezidive und Neuerkrankungen, verteilt auf die jeweiligen Monate, sind in der **Abbildung 1** dargestellt.

**Abbildung 1: Anzahl klinischer Mastitiden (Erstbehandlungen und Behandlungen von Rezidiven bzw. Neuerkrankungen) im Untersuchungszeitraum von Dezember 1997 bis März 1999**



Unter Einbezug der in der Studie nicht ausgewerteten Rezidive und Neuerkrankungen lag die Mastitisrate im ersten Untersuchungsabschnitt (1. Stallhaltungsperiode; Dezember 1997 bis April 1998) durchschnittlich bei 15,5 %. Der um einen Monat länger dauernde zweite Untersuchungsabschnitt (Weideperiode; Mai 1998 bis Oktober 1998) stellte sich mit einer durchschnittlichen Mastitisrate von 9 % am günstigsten dar. Der daran anschließende wiederum fünf Monate dauernde dritte Untersuchungsabschnitt (2. Stallhaltungsperiode; November 1998 bis März 1999) zeigte eine durchschnittliche Mastitisrate von 11,3 %. Die Rezidive und Neuerkrankungen verteilten sich mit n=40, n=45 und n=54 auf die drei genannten Untersuchungsabschnitte. Eine detaillierte Aufstellung der behandelten klinischen Mastitiden pro Monat findet sich im ANHANG (**Tabelle 51**, Seite 192).

Die Diagnosen für die klinischen Mastitiden wurden, wie bereits beschrieben, anhand der klinischen Untersuchungsbefunde (siehe auch **Tabelle 14**, Seite 66) und der Bewertung der bakteriozytologischen Befunde der zum Zeitpunkt des Auftretens der Mastitis zweifach gezogenen Milchproben (M1A+B) erstellt (siehe auch **Tabelle 17**, Seite 73).

Grundlage für die Bewertung des Behandlungserfolges war ein in **Tabelle 19** dargestelltes Beurteilungsschema.

**Tabelle 19: Beurteilungsschema für den Behandlungserfolg**

Klinische Euterbefunde / labordiagnostische Sekretbefunde	geheilt (kumulativ)			nicht geheilt*
	Klinische Heilung			
	Bakteriologische Heilung			
	Bakt.zyt. Heilung			
<b>Sekretbeurteilung:</b>	<b>obB</b>	<b>obB</b>	<b>obB</b>	verändert
<b>Bakteriologischer Befund:</b>	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>	neg. o. pos.	neg. o. pos.
<b>Zytologischer Befund (x1.000 Zellen/ml)</b>	<b>≤ 100</b>	≤ / > 100	≤ / > 100	> 100

\* als „**nicht geheilt**“ (Therapieversager) werden Tiere mit nachfolgenden Befunden bzw. Konstellationen angesprochen:

- **TV1:** semi crossing over aufgrund Erfolglosigkeit der Erstbehandlung (Therapiewechsel)
- **TV2a:** Klinische Neuerkrankungen homologer (erkrankt gewesener) oder heterologer (bisher gesund gebliebener) Viertel innerhalb der 14 – 21 tägigen Beobachtungszeit (bis M2); sowie
- **TV2b:** Tiere, die trotz klinischer Heilung nicht innerhalb von 30 Tagen in die Produktion zurückkehrten (in der Regel bedingt durch einen zu hohen Milchzellgehalt (MST +++))
- **TV3:** Abgang des Tieres innerhalb der 14 – 21 tägigen Beobachtungszeit (bis M2)

Grundsätzlich basieren die ermittelten Behandlungsergebnisse auf den während und nach der Behandlung festgestellten klinischen Befunden und den labordiagnostischen Ergebnissen der 14 bis 21 Tage nach Behandlungsende gezogenen Milchproben (M2).

Die Behandlungserfolge wurden, wie aus der Tabelle 19 hervorgeht, nach unterschiedlichen Kriterien beurteilt. So wurde nicht nur zwischen einer bakteriozytologischen, bakteriologischen und klinischen Heilung unterschieden, sondern auch eine differenzierte Beurteilung der nicht geheilten Fälle (Therapieversager = TV) vorgenommen. Dazu gehörten sowohl die Tiere bzw. Viertel, bei denen aufgrund einer erfolglosen Erstbehandlung ein Therapiewechsel vollzogen werden musste (TV1; siehe auch 3.1.2.3.3.), als auch Tiere, die zum Behandlungsende zwar klinisch gesunde Euterviertel aufwiesen, die aber innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 14 bis 21 Tagen nach Behandlungsende (M2) erneut klinisch erkrankten (TV2a) oder wegen eines zu stark erhöhten Zellgehaltes nicht in der vorgegebenen

Frist von 30 Tagen in die Produktion (Stall 1) zurückgingen (TV2b). Weiterhin zählten zu den nicht geheilten Vierteln zusätzlich die innerhalb der Beobachtungszeit (bis M2) abgängigen Tiere (TV3).

Zur Beurteilung längerfristiger Effekte der Therapie und der Auswirkungen auf die Milchleistung der Tiere wurden die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung und der Milchmengenmessung der ersten drei Milchleistungsprüfungen (MLP) nach Auftreten der klinischen Mastitis herangezogen.

Ausgehend von einer Grundgesamtheit von 149 homöopathisch behandelten Tieren (HT) und 139 antibiotisch behandelten Tieren (AT) fehlten im dritten Laktationsmonat nach Auftreten und Behandlung der klinischen Mastitis aus Gründen vorzeitigen Abganges oder regulärem Trockenstellens der Tiere von insgesamt 62 Tieren (HT = 29; AT = 34) die MLP-Daten (**Tabelle 20**). Von einem weiteren Tier der homöopathischen Therapiegruppe wurde im dritten MLP-Monat aus unbekannter Ursache, die Zellzahl vom Landeskontrollverband (LKV) nicht bestimmt.

**Tabelle 20: Anzahl und Ursachen fehlender Daten der Milchleistungsprüfung (MLP) für die Therapiegruppen**

		Ursachen fehlender Daten der Milchleistungsprüfung (MLP)	
Therapierichtung:	Monat der MLP	regulär trocken gestellt	vorzeitiger Abgang
		(n) Tiere	
<b>homöopathische Therapie</b> <b>HT (n=149)</b>	<b>1</b>	-	5 (3,4%)
	<b>2</b>	2 (1,3%)	10 (6,7%)
	<b>3*</b>	5 (3,4%)	23 (15,4%)
<b>antibiotische Therapie</b> <b>AT (n=139)</b>	<b>1</b>	-	3 (2,2%)
	<b>2</b>	3 (2,2%)	15 (10,8%)
	<b>3</b>	10 (7,2%)	24 (17,3%)

\*) plus einem Tier, bei dem vom LKV aus unbekannter Ursache die Zellzahl nicht bestimmt wurde (Milchmengenmessung erfolgt; das Tier hatte zum Untersuchungstag keine klinische Mastitis)

### 3.1.6. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm SPSS für Windows (SPSS Inc.). Kategorische Daten wurden über ihre Häufigkeitsverteilung, nicht normal verteilte kontinuierliche Variablen über ihren Medianwert  $\tilde{x}$  und normal verteilte kontinuierliche Variablen über ihr arithmetisches Mittel und Standardabweichung  $\bar{x} \pm s$  deskriptiv ausgewertet.

Zur Analyse eventueller Unterschiede der Häufigkeitsverteilungen kategorischer Zielvariablen wurde der Chi-Quadrat-Test nach PEARSON bzw. bei kleinen Fallzahlen (erwartete Häufigkeit in jeder Zelle der Kontingenztafel kleiner als 5) der exakte Test nach FISHER verwendet. Zur Klärung der Frage, ob in einzelnen Kategorien einer Subgruppe Häufungen oder Defizite einzelner Befunde bzw. Variablen auftraten, wurde das standardisierte Residuum (s.R.) herangezogen. Ein Unterschied zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit lag vor, wenn das standardisierte Residuum einen Wert größer oder gleich zwei annahm und unter der Voraussetzung, dass die erwartete Häufigkeit mindestens  $n=5$  betrug (BÜHL und ZÖFEL, 2000).

Weil die Gehalte an somatischen Zellen im Milchsekret nicht normalverteilt sind, wurden bei den Auswertungen der Gesamtgemelkzellgehalte der Milch (MLP-Daten) der Median  $\tilde{x}$  bestimmt und mittels dem verteilungsunabhängigen MANN-WHITNEY-Test geprüft, ob die beprobten Grundgesamtheiten der Subgruppen die gleiche Lage besaßen (LORENZ, 1988).

Die Prüfung eventueller Unterschiede der ermittelten Milchleistungsdaten in den Subgruppen erfolgte mittels T-Test nach STUDENT. Die Daten wurden vorher anhand des KOLMOGOROV-SMIRNOV-Tests auf ihre Normalverteilung überprüft, die eine Voraussetzung für den T-Test darstellt (LORENZ, 1988).

Um eine Beurteilung zur Verwerfung der Nullhypothese, dass die Werte und Häufigkeitsverteilungen der Zielparameter in den Subgruppen sich nicht unterscheiden, zu ermöglichen, wurde das Signifikanzniveau auf  $\alpha = 0.05$  festgelegt. Da sich aber die Irrtumswahrscheinlichkeiten mit der Anzahl der an einem Datensatz durchgeführten Einzeluntersuchungen vervielfachen, haben die Ergebnisse der so ermittelten Unterschiede lediglich Hinweischarakter. Wurden mit den genannten Testverfahren Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0.05$  ermittelt, so wurden diese dementsprechend als statistisch *auffällig* bzw. *deutlich* angesprochen.