

Einstreumaterialien und -management – ihre Bedeutung für die Entwicklung von Mastitiserregern und das Infektionsgeschehen in der Ökologischen Milchviehhaltung

**Bedding materials and management – their significance for the development of mastitis pathogens
and infections in organic dairy farming**

FKZ: 08OE196

Projektnehmer:

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Institut für Ökologischen Landbau
Trenthorst 32, 23847 Westerau
Tel.: +49 4539 8880-0
Fax: +49 4539 8880-120
E-Mail: oel@vti.bund.de
Internet: <http://www.vti.bund.de>

Autoren:

Barth, Kerstin; Krömker, Volker; Aulrich, Karen

FKZ: 09OE012

Projektnehmer:

Fachhochschule Hannover
Fakultät II - Abt. Bioverfahrenstechnik
Heisterbergallee 12, 30453 Hannover
Tel.: +49 511 9296-2202
Fax: +49 511 9296-2210
E-Mail: dekanat-bv@fh-hannover.de
Internet: <http://www.fh-hannover.de>

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft (BÖLN)

Schlussbericht

Einstreumaterialien und -management – ihre Bedeutung für die Entwicklung von Mastitiserregern und das Infektionsgeschehen in der Ökologischen Milchviehhaltung

Bedding materials and management – their significance for the development of mastitis pathogens and infections in organic dairy farming

FKZ: 2808OE196 & 2809OE012

Zuwendungsempfänger:

Johann Heinrich von Thünen-Institut – Bundesforschungsinstitut für ländliche Räume, Wald und Fischerei (vTI)

Institut für Ökologischen Landbau (OEL)

Dr. Kerstin Barth

Trenthorst 32, D-23847 Westerau

Tel.: 04539 8880 312, Fax: 04539 8880 140

E-Mail: kerstin.barth@vti.bund.de

Fachhochschule Hannover

Fakultät 2 - Abteilung Bioverfahrenstechnik - Mikrobiologie

Prof. Dr. med. vet. Volker Krömker

Heisterbergallee 12, D-30453 Hannover

Tel.: 0511 9296 2205, Fax: 0511 9296 2210

E-Mail: volker.kroemker@fh-hannover.de

Laufzeit: 01. September 2009 bis 15. November 2011

Berichtszeitraum: 01. September 2009 bis 15. November 2011

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Ziele und Aufgabenstellung des Projektes..... | 3 |
| 1.1 | Planung und Ablauf des Projekts..... | 3 |
| 1.1.1 | Gegenüberstellung der geplanten und durchgeführten Arbeiten..... | 3 |
| 1.1.2 | Abweichungen im Arbeits- und Zeitplan..... | 3 |
| 1.2 | Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde..... | 5 |
| 2 | Material und Methoden..... | 7 |
| 2.1 | Vertiefende Erhebung auf allen Projektbetrieben..... | 7 |
| 2.2 | Erhebungen auf ausgewählten Projektbetrieben..... | 7 |
| 2.3 | Laboranalysen..... | 8 |
| 2.3.1 | Bakteriologische Untersuchung der Einstreu- und Tupferproben..... | 8 |
| 2.3.1.1 | Probenvorbereitung Einstreuproben..... | 8 |
| 2.3.1.2 | Vorbereitung der Tupferproben..... | 9 |
| 2.3.1.3 | Keimzahlbestimmung..... | 9 |
| 2.3.2 | Zytobakteriologische Untersuchung der Viertelanfangsgemelksproben..... | 10 |
| 2.3.2.1 | Kulturelle Untersuchung der Viertelanfangsgemelksproben..... | 10 |
| 2.3.2.2 | Differenzierung von Infektionserregern in Milchproben..... | 10 |
| 2.3.2.3 | Beurteilung der Ergebnisse..... | 11 |
| 2.3.3 | Isolierung der Stämme..... | 11 |
| 2.3.3.1 | Bestimmung des Gehaltes somatischer Zellen..... | 12 |
| 2.3.4 | Identifizierung koagulase-negativer Staphylokokken, S. aureus und Streptokokken mittels PCR-Verfahren..... | 12 |
| 2.4 | Statistische Auswertungen..... | 14 |
| 3 | Ergebnisse..... | 14 |
| 3.1 | Darstellung der wichtigsten Ergebnisse..... | 14 |
| 3.1.1 | Status quo des Einstreumanagements in der Ökologischen Milchviehhaltung..... | 14 |
| 3.1.2 | Beziehung zwischen Einstreumanagement und Eutergesundheitsstatus der Herden..... | 15 |
| 3.1.3 | Einflüsse des Einstreumanagements auf die Eutergesundheit der Erstkalbinnen..... | 18 |
| 3.1.4 | Beziehung zwischen Keimgehalt der Einstreu und Euterinfektionen..... | 19 |
| 3.1.4.1 | Keimgehalt der Einstreu..... | 19 |
| 3.1.4.2 | Euterinfektionen..... | 20 |
| 3.1.4.3 | Erregernachweis im Zitzenkanal, auf der Euterhaut und in der Einstreu..... | 23 |
| 3.1.5 | Beziehung zwischen Infektionen und Melkbarkeit..... | 25 |
| 3.2 | Nutzen und Verwertbarkeit..... | 26 |
| 4 | Zusammenfassung..... | 26 |
| 5 | Gegenüberstellung der geplanten mit den tatsächlich erreichten Zielen..... | 27 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 27 |
| 7 | Bisherige Veröffentlichungen zum Projekt..... | 29 |

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Die Richtlinien des Ökologischen Landbaus fordern den Einsatz trockener Einstreu, die aus Stroh oder einem anderen geeigneten Naturmaterial besteht. Organische Einstreumaterialien können umweltassoziierten Mastitiserregern jedoch optimale Wachstumsbedingungen bieten und somit die Entstehung von Euterentzündungen begünstigen, die durch diese Mikroorganismen verursacht werden. Ziel des Projektes war es, - der potentiellen Infektionskette Einstreu – Euterhaut – Zitzenkanal – Euterlumen folgend, die relevanten kritischen Punkte zu identifizieren und Handlungsempfehlungen für das Einstreumanagement abzuleiten, die das Mastitisrisiko reduzieren. Neben der Senkung der mastitisbedingten Kosten wäre dies ein aktiver Beitrag zur Reduzierung des Medikamenteneinsatzes und zur Verbesserung der Tiergesundheit in der Ökologischen Milchviehhaltung.

Mit den im Projekt durchgeführten Untersuchungen sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Welche Beziehungen bestehen zwischen den in der Praxis eingesetzten Einstreumaterialien, dem Einstreumanagement ökologisch wirtschaftender Betriebe und dem Infektionsstatus der Herden?
2. Lassen sich betriebliche (haltungs-) und tierspezifische Risikofaktoren für Euterinfektionen vor der ersten Kalbung und in der Trockenstehphase identifizieren?
3. Verursachen die in der Einstreu dominierenden Erregerspezies tatsächlich die nachweisbaren Infektionen der Milchdrüse?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen Euterinfektionen, dem Erregerbesatz der Einstreu, der Zitzenhaut- und Zitzenkanalbesiedlung und der Melkbarkeit der Kühe?

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

1.1.1 Gegenüberstellung der geplanten und durchgeführten Arbeiten

Die Gegenüberstellung der geplanten und durchgeführten Arbeiten ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

1.1.2 Abweichungen im Arbeits- und Zeitplan

Das Projekt wurde planmäßig am 01.09.2009 begonnen. Bedingt durch den Zeitbedarf der Verwaltungsvorgänge konnte die finanzierte Projektmitarbeiterin erst zum 15.10.2009 eingestellt werden. Sie war bis zum 31.08.2011 im Projekt tätig. Um den Erstkontakt der neuen Mitarbeiterin zu den am Projekt beteiligten LandwirtInnen zu erleichtern, und um die Mitarbeiterin bei der Etablierung der Erhebungsroutine zu unterstützen, sollte der erste Betriebsbesuch im Beisein eines Mitarbeiters des AP1 des o. g. interdisziplinären Projektes durchgeführt werden. Aufgrund von Verzögerungen dieses Projektes konnte mit der Wintererhebung in unserem Projekt erst mit zweimonatiger Verspätung begonnen werden. Diese Verschiebung führte dazu, dass auf einigen Betrieben bereits der Weideantrieb erfolgte und somit die Stallhaltungsperiode nicht bei allen Betrieben abgebildet werden konnte. Da jahreszeitliche Unterschiede hinsichtlich der Quantität und des Erregerspektrums erwartet wurden, wurden die in der Weideperiode erfassten Betriebe bei der Sommererhebung ausgeschlossen und erst im Herbst nach Aufstallung der Tiere einbezogen.

Tab. 1: Gegenüberstellung der geplanten und durchgeführten Arbeiten

| Soll Zeitraum | Geplante Arbeiten | Ist Zeitraum | Durchgeführte Arbeiten |
|----------------------|--|---------------------|---|
| 09/09 - 10/09 | Abschluss Betriebsauswahl (vTI, FH) | 09/09 – 10/09 | Erledigt (vTI in Abstimmung mit AP1 des o. g. interdisziplinären Projektes) |
| 09/09 - 12/09 | Einarbeitung in die Methodik der Probenahme und der Milchflusskurvenaufzeichnung, Erarbeitung der Datenaufnahmebögen (vTI, FH) | 10/09 – 02/10 | Einarbeitung in die Methodik der Probennahme (FH, vTI) Erstellung der Datenaufnahmebögen zum Einstreumanagement (vTI, FH) in Zusammenarbeit mit AP1 des o. g. interdisziplinären Projektes |
| 01/10 – 10/10 | Betriebsbesuche (Sommer und Wintererhebung mit Probengewinnung) (vTI) | 03/10 – 11/10 | Betriebsbesuche und Probenerhebung durchgeführt |
| 02/10 – 02/11 | Abschluss aller Laboranalysen (FH, vTI), alle Daten der Praxiserhebung liegen in einer Datenbank vor | 03/10 – 09/11 | Laboranalysen (FH) abgeschlossen, Aufbereitung der Proben für die Erregerdifferenzierung (FH) erfolgt, Erregerdifferenzierung durchgeführt (vTI) Auswertung der Fragebögen |
| 05/10 – 04/11 | Datenauswertung (FH, vTI) | 05/10 - 10/11 | Datenauswertung durchgeführt |
| 01/11 – 08/11 | Publikation der Ergebnisse | 01/11 -10/11 | Publikation der Ergebnisse (1 Publikation erschienen) |
| 06/11 – 08/11 | Erstellung Projektbericht | 11/11 | Erstellung Projektbericht (eingereicht) |

Bei der Laboranalyse (Erregerdifferenzierung mittels PCR) ergaben sich nicht vorhersehbare Schwierigkeiten. Die an der FH Hannover angezüchteten und in Trenthorst zu analysierenden Proben zeigten starke qualitative Unterschiede, wodurch die Gewinnung von DNA aus den Proben deutlich erschwert war und zusätzliche Anstrengungen unternommen werden mussten (siehe 2.3.4), um mit der zum Teil sehr geringen DNA-Menge erfolgreiche PCR Reaktionen durchzuführen. Der Zeitaufwand für die Analysen wurde dadurch deutlich erhöht und der ursprüngliche Zeitplan war nicht mehr einzuhalten. Die Abgabe des Abschlussberichts musste deshalb auf den 15.11.2011 verschoben werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Mastitiden sind auch in der ökologischen Milchviehhaltung am häufigsten für den Einsatz von Antibiotika verantwortlich und dominieren nach wie vor die Liste der Abgangsursachen (Krömker & Pfannenschmidt, 2004). Mit zunehmender Verbreitung der strategischen Bekämpfung von euterassoziierten Mastitiserregern durch wirksame Prophylaxekonzepte (z.B. im Rahmen der Melkhygiene) und geeignete Therapieformen und -zeitpunkte treten Mastitiden, die durch umweltassoziierte Mikroorganismen hervorgerufen werden, zunehmend in den Vordergrund. *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, aber auch Klebsiellen, *Enterobacter ssp.* und Enterokokken sind als Verursacher von Mastitiden in den letzten Jahren immer häufiger registriert worden (Smith et al., 1985; Hughes, 1999). Als Hauptreservoir von umweltassoziierten Mastitiserregern gelten Bodenschmutz, Einstreu und Fäkalien (Zdanowicz et al., 2004). Ihre Übertragung findet v. a. im Stallbereich statt (Peeler et al., 2000). Die Verbreitung von Umwelterregern ist also von hygienischen Faktoren abhängig (hoher Keimdruck) (Smith & Hogan, 1993). Sie sind in der Lage, die Milchdrüse und vermutlich den Zitzenkanal zu besiedeln und subklinische bzw. klinische Mastitiden hervorzurufen. Bei belasteter Gesamtabwehrsituation des Tieres kann sowohl eine Neuinfektion als auch die klinische Exazerbation bislang subklinischer Infektionen begünstigt werden (Hamann & Krömker, 1999). Dabei kann es zu milden bis schweren klinischen Erkrankungen kommen.

Aus diesem Grund treten Infektionen mit umweltassoziierten Erregern gehäuft zu Beginn und zum Ende der Trockenphase auf, da während dieser Phasen meistens sowohl ungünstige hygienische Bedingungen als auch besondere immunologische Belastungen bestehen (Smith et al., 1985). Häufig erfolgt die klinische Exazerbation erst in den ersten Wochen der Laktation in Folge von Stoffwechselstörungen und den ihnen vorausgehenden Haltungs- und Fütterungsmängeln (Krömker & Grabowski, 2002; Bradley & Green, 2006).

Laktierende Kühe liegen zwölf bis vierzehn Stunden pro Tag (u. a. Fregonesi & Leaver, 2000). Der Risikozeitraum, in dem Mastitiserreger in die Nähe des Zitzenkanals gelangen können, ist somit ziemlich ausgedehnt: Mikroorganismen können von der Liegefläche über am Euter anhaftenden Schmutz oder Einstreupartikel in den Zitzenbereich gelangen und verkotete Schwanzquasten das Euter verschmutzen; stark verschmutzte Laufflächen begünstigen das Bespritzen des Euters zusätzlich. Das Ziel muss deshalb darin bestehen, den Erregerdruck auf Euter- und Zitzenepithelien abzusenken. Der Schwerpunkt der Maßnahmen liegt dabei bei der Gestaltung des Liegebereichs.

Weiche und trockene Liegenflächen werden hier von den Tieren bevorzugt. So präferierten Kühe, die mit Stroh als Einstreu vertraut waren, auch dann noch die mit Stroh eingestreuten Flächen, als ihnen auch Sand zum Liegen angeboten wurde (Norrington et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigte die an Sand gewöhnte Gruppe keine Präferenz für dieses Material, sondern lag beim anschließenden Wahlversuch auf beiden Einstreuvarianten gleich häufig. Demgegenüber wurden in der Studie von Manninen et al. (2002) die Strohmattatze bzw. die mit Einstreu versehene Gummimatte deutlich der Sandbox vorgezogen. Mit Matratzen versehene Liegeflächen gewinnen durch das Aufbringen von Einstreu an Attraktivität (Tucker & Weary, 2004). Die Richtlinien des Ökologischen Landbaus fordern die Verwendung von Einstreumaterialien organischer Herkunft und entsprechen damit auch den Ansprüchen der Tiere.

Nach Bey et al. (2002) liefert jedoch organisches Einstreumaterial die für das Mikroorganismenwachstum notwendigen Nährstoffe, auch ohne dass Kot, Urin oder Milch vorhanden sein müssen. Nach Hughes (1999) erhöhen Stroh und Sägemehl das Mastitisrisiko, da sie das Wachstum von umweltassoziierten Erregern begünstigen. Dies stützen auch Hogan & Smith (1997), die zur Reduktion des Keimwachstums ein intensives Stall- und Einstreumanagement einfordern. Hogan et al. (1989) zeigten eine signifikante Erhöhung des Besatzes mit coliformen Keimen, Klebsiellen und Streptokokken in organischen verglichen mit anorganischen Einstreumaterialien bei der Haltung laktierender Milchkühe. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Einbringen getrockneter organischer Materialien in Liegeboxen steigt die Keimbelastung sprunghaft an (Kögler, 2005). Im Gegensatz zu Strohprodukten fördern Einstreumaterialien aus Holz das Bakterienwachstum weniger stark (Bey et al., 2002) – jedoch wird in den warmen Sommermonaten, kombiniert mit einer hohen Luftfeuchtigkeit, die Vermehrung von Klebsiellen durch Sägemehl bzw. –späne begünstigt (Hogan & Smith, 1997). Als Ursache wird feuchtes, aus Harthölzern gewonnenes Sägemehl vermutet, das die Entwicklung coliformer Keime infolge einer pH-Wert-Absenkung fördert.

Bey et al. (2002) definierten Keimzahlen $< 10^6$ KbE/ ml als Zielgröße für den Anteil der Einstreu, der mit der Zitze in Berührung kommt. Auch Kristula et al. (2005) sehen Einstreu mit einem Gehalt an coliformen Keimen von mehr als 10^6 KbE/ g als risikoreich an. Krömker & Grabowski (2002) setzten die Grenze mit 10^5 KbE/ g für coliforme Keime sogar niedriger an, und auch dieser Grenzwert wurde noch einmal, auf 10^4 KbE/ g, nach unten korrigiert (Krömker et al., 2010)

Mikroorganismen im Umfeld des Euters verursachen jedoch nicht zwangsläufig Mastitiden. Die Mastitis ist eine Faktorenkrankheit, somit muss hinsichtlich der Prophylaxe ein „ganzheitlicher Ansatz“ verfolgt werden. Grundsätzlich gilt, dass infektiös bedingte Mastitiden die Anwesenheit eines pathogenen Erregers in der Milchdrüse erfordern. Bevor dieser in das Euter gelangen kann, hat er einige Barrieren zu überwinden. Die wichtigste ist der Zitzenkanal, der durch seinen Verschluss, das nach außen orientierte Wachstum des Epithels, den nach außen gerichteten Sekretstrom, die Verhornung und die bakterizide Wirkung des Laktosebiums sowie die Fürstenberg'sche Rosette das Eindringen von Keimen be- bzw. verhindert (Mielke, 1994). Erst nach Überwindung des Zitzenkanals kann der Erreger tiefer in das Euterlumen vordringen, sich anheften und vermehren, falls nicht die weiteren Abwehrmechanismen, wie z. B. die zelluläre Abwehr, dies verhindern. Der Erhaltung der Barrierefunktion des Zitzenkanals kommt in der Mastitisprophylaxe somit eine, wenn nicht sogar die zentrale, Be-

deutung zu. Fehlerhafte Melkarbeit und technische Mängel können beim maschinellen Melken die Abwehrfunktion des Zitzenkanals nachhaltig beeinträchtigen (u. a. Capuco et al., 1994); genetisch bedingt senkt die Zucht auf sehr leicht und schnell melkbare Tiere die Abwehrfähigkeit der Milchdrüsen genetisch ab (u. a. Seykora & McDaniel, 1985). Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Mikroorganismendichte in der Einstreu und Euterinfektionen müssen deshalb die Zitzenkondition und die genetische Prädisposition der untersuchten Tiere bzw. Milchviehherden hinsichtlich der Melkbarkeit unbedingt berücksichtigen.

2 Material und Methoden

2.1 Vertiefende Erhebung auf allen Projektbetrieben

Im Rahmen des interdisziplinären Forschungsprojektes „Gesundheit und Leistungsfähigkeit von Milchkühen im ökologischen Landbau“ (BLE-FörderKz: 07OE012 -07OE022) wurden in 106 ökologisch wirtschaftenden Milchviehbetrieben Deutschlands seit 2007 umfassende Erhebungen zur Stoffwechsel- und Eutergesundheitssituation durchgeführt. Dabei wurden Faktoren von der Grobfuttererzeugung bis zum Herdenmanagement berücksichtigt. Dies betraf auch einige Fragen zum Einstreumanagement. Um weitergehende Informationen zu erhalten und eine Einschätzung der Situation des Einstreumanagements sowie der Einstreuqualität vornehmen zu können, wurde im Rahmen des vierten Betriebsbesuches des o. g. Projekts eine ergänzende Erhebung durchgeführt. Diese bestand aus einer Befragung der Landwirte sowie der grobsinnlichen Beurteilung des zum Einstreuen verwendeten Stroh durch die Mitarbeiter des Praxiserhebungsteams (Erhebungsbogen: siehe Anlage).

2.2 Erhebungen auf ausgewählten Projektbetrieben

Die generierten Daten stellten eine geeignete Ausgangsbasis für tiefer gehende Untersuchungen der mit dem Einstreuen organischer Materialien verbundenen Risiken für Euterinfektionen dar. Aus der Gesamtzahl der Betriebe wurde eine Teilmenge ausgewählt, bei der zusätzliche Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Betriebsauswahl sollte in ihrer Zusammensetzung die bestehende Stichprobe von 106 Betrieben annähernd widerspiegeln. Die Erhebung hatte gezeigt, dass Stroh das vorherrschende Einstreumaterial und Tiefliege- bzw. als Tiefliegeboxen umgestaltete Hochboxen sowie Tiefstreuliegeflächen die am weitesten verbreiteten Aufstellungsverfahren sind. Die Untersuchung konnte somit auf diese Verfahren begrenzt werden, was die Erhöhung der Aussagefähigkeit und Übertragbarkeit der statistischen Analysen erwarten ließ. Es wurden 30 Betriebe gewählt, die dem regionalen Verteilungsschlüssel des interdisziplinären Projekts entsprachen sowie zur Mitarbeit bereit waren (Abb. 1). Da jahreszeitliche Unterschiede zu erwarten waren, sollten die Daten einmal sowohl im Sommer- als auch im Winterhalbjahr erhoben werden.

Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden alle Erhebungen von einer Mitarbeiterin durchgeführt. Sie begleitete beim Erstbesuch die für die betreffenden Betriebe zuständigen Mitarbeiter des Praxiserhebungsteams bei deren vierter Erhebung im Rahmen des interdisziplinären Projekts. Aufgrund einer zeitlichen Verschiebung dieses vierten Betriebsbesuches gelang es nicht, alle Betriebe bei der Ersterhebung unter den Bedingungen der Stallhaltungsperiode zu erfassen. Betriebe, deren Ersterhebungszeitpunkt sich in die Weideperiode ver-

schoben hatte, wurden deshalb im zweiten Halbjahr 2010 während der Stallhaltungsperiode gesondert aufgenommen.



Abb. 1: Lage der 30 ausgewählten Projektbetriebe

Auf den Betrieben wurden folgende Proben bzw. Angaben erhoben:

- Einstreumaterial vor Einbringung in den Liegebereich zur Untersuchung auf den Anfangskeimgehalt,
- Untersuchung von zehn zufällig ausgewählten Kühen:
 - Nass-Trockentupfer nach DIN 10113-1 (1997) der Euterhaut (Euterviertel: vorn links, hinten rechts)
 - Viertelanfangsgemelksproben zur zytobakteriologischen Untersuchung (BU) der getupferten Euterviertel
 - Nass-Trockentupfer nach DIN 10113-1 (1997) des Zitzenkanals
 - Milchflusskurve

2.3 Laboranalysen

Die bakteriologische Untersuchung der Einstreumaterialien und die der Tupferproben sowie die zytobakteriologische Untersuchung der Viertelanfangsgemelksproben wurden im Labor der FH Hannover vorgenommen. Die Untersuchung der Einstreumaterialien erfolgte gemäß der von Krömker et al. (2010) und die der Zitzentupfer gemäß der von Paduch und Krömker (2011) vorgeschlagenen Methoden.

Die Differenzierung koagulase-negativer Staphylokokken und Streptokokken erfolgte im Labor des Institutes für Ökologischen Landbau gemäß der unter Punkt 2.3.4 beschriebenen Methoden.

2.3.1 Bakteriologische Untersuchung der Einstreu- und Tupferproben

2.3.1.1 Probenvorbereitung Einstreuproben

Zur Beurteilung des mikrobiologischen Mikroorganismenbesatzes der frischen Einstreu wurden 11 g des zu untersuchenden Materials mit 99 ml ein Viertel starker steriler Ringerlösung

aseptisch in einen sterilen Stomacher-Beutel eingewogen und anschließend im Stomacher-Homogenisator (AES Chemunex) für 180 s homogenisiert, um einen Übergang der am Probenmaterial anhaftenden Mikroorganismen in die Verdünnungsflüssigkeit zu erzielen. Für die Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe wurde anschließend die so hergestellte Erstverdünnung verwendet.

2.3.1.2 Vorbereitung der Tupferproben

Zur Vorbereitung der mikrobiologischen Untersuchung der Tupferproben von der Zitzenhaut und des Zitzenkanals wurden die Wattetupfer zunächst für 20 s in dem Transportmedium ausgeschüttelt, um einen Übergang der an den Tupfern anhaftenden Mikroorganismen in das Transportmedium zu erzielen. Anschließend wurden mittels einer sterilisierten Pinzette die Tupfer aus den Probenröhrchen entfernt. Das Transportmedium diente der Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe.

2.3.1.3 Keimzahlbestimmung

Die bakteriologische Untersuchung der Einstreumaterialien sowie der Tupferproben erfolgte quantitativ zum Nachweis von präsumtiven *Staphylococcus (S.) aureus*, äskulin-positiven Streptokokken sowie *Escherichia (E.) coli* und sonstigen coliformen Mikroorganismen unter Anwendung von Selektivnährmedien. Der Nachweis präsumtiver *S. aureus* erfolgte mittels Baird-Parker-Agar (Merck) mit Zusatz von Eigelb-Tellurit-Emulsion (Oxoid). Für die quantitative Bestimmung äskulinpositiver Streptokokken in den Proben wurde Kanamycin-Äskulin-Azid-Agar (Merck) verwendet. Zur Bestimmung des Gehaltes von *E. coli* und sonstigen coliformen Mikroorganismen wurde Chromocult-Coliformen-Agar (Merck) genutzt. Dieser Nährboden ermöglicht die Unterscheidung von *E. coli* von anderen coliformen Mikroorganismen. Die Nährmedien wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. 20 ml der jeweiligen Nährmedien wurden bei einer Medientemperatur von 50°C in sterile Petrischalen (Greiner Bio One) überführt. Die Probenansätze erfolgten im Oberflächenverfahren entsprechend § 64 LFBG L 01.00-57. Dafür wurden 0,1 ml Probenvolumen der jeweiligen Verdünnungsstufe auf den vorbereiteten gelierten Agarplatten aufgetragen und mit einem sterilen Spatel verteilt. Eine dezimale Verdünnung der vorbereiteten Proben (1.1.1) erfolgte nach § 64 LFBG L 00.00-54 mit ein Viertel starker steriler Ringerlösung (Merck).

Die beimpften Kanamycin-Äskulin-Azid-Agarplatten und Chromocult-Coliformen-Agarplatten wurden bei 37°C für 24 h aerob inkubiert. Die Bebrütung der Baird-Parker-Agarplatten erfolgte ebenfalls bei 37°C aerob für 48 h.

Entsprechend der vorgeschriebenen Bebrütungszeit erfolgte für die zu untersuchenden Mikroorganismen eine Beurteilung der bebrüteten Nährmedien. Als präsumtive *S. aureus* wurden dabei grauschwarze, glänzende, gewölbte Kolonien (Ø bis 3 mm) mit einem schmalen weißen, vollständigen Rand (Präzipitatring) sowie mit einer klaren Zone eingestuft. Äskulinpositive Streptokokken bilden auf Kanamycin-Äskulin-Azid-Agar kleine schwarzgrüne Kolonien, umgeben von einem schwarzen Hof. *E. coli* ist auf Chromocult-Coliformen-Agar als blauviolette Kolonie nachweisbar, während andere coliforme Mikroorganismen rosa-rote Kolonien auf dem Nährboden ausbilden. Die Keimzahlen pro Probe wurden mit Hilfe des gewichteten arithmetischen Mittels errechnet und als koloniebildende Einheit (KbE) pro Gramm (g) für

Einstreumaterialien bzw. pro Milliliter (ml) für die Tupferproben angegeben. Für die Auswertung wurden ausschließlich Platten herangezogen, die zwischen zehn und 300 Kolonien aufwiesen.

2.3.2 Zytobakteriologische Untersuchung der Viertelanfangsgemelksproben

2.3.2.1 Kulturelle Untersuchung der Viertelanfangsgemelksproben

Die bakteriologische Untersuchung der Viertelanfangsgemelksproben erfolgte in Anlehnung an die Methode der DVG (2009). Dabei handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren zum Nachweis von aerob wachsenden mastitisrelevanten Infektionserregern in Rohmilch. Die Nachweisgrenze liegt bei diesem Verfahren bei ≥ 100 Mikroorganismen/ml. 0,01 ml einer Milchprobe wurden dafür mit einer sterilen Einmalimpföse auf Äskulin-Blutagar (Oxoid) ausgestrichen und bei 37°C aerob für 48 h bebrütet.

2.3.2.2 Differenzierung von Infektionserregern in Milchproben

Die erste Beurteilung der Platten erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 24 h. Eine abschließende Beurteilung wurde nach 48 h vorgenommen. Zunächst wurden die gewachsenen Mikroorganismen anhand der Koloniemorphologie, der Hämolyseform und des Gramverhaltens differenziert. Zur weiteren Differenzierung der Erreger erfolgte ein Nachweis der Katalaseaktivität mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (Merck), der Cytochromoxidase C Aktivität mit Bactident Oxidase (Merck), der Äskulinspaltung unter UV-Licht sowie der Verstoffwechslung von Glucose unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit Hilfe des OF-Tests (Merck). Als Staphylokokken wurden gram-positive, katalase-positive Kokken gewertet. Zur Differenzierung von *S. aureus* und koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) wurde der Clumpingfaktor-Test (DiaMondial Staph Plus Kit, Sekisui Virotech) durchgeführt. Clumpingfaktor-positive Kolonien wurden als *S. aureus* ausgewiesen. Als Streptokokken wurden gram-positive, katalase-negative Kokken gewertet. Der Nachweis der Äskulinspaltung ermöglichte eine Unterteilung in äskulinpositive und äskulinnegative Streptokokken. Zur Differenzierung äskulinpositiver Streptokokken wurde nach Watts et al. (1993) modifizierter ein Rambachagar verwendet. Dafür wurde etwas Koloniematerial von der Blutagarplatte entnommen, auf einer vorgegossenen Agarplatte subkultiviert. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C aerob. *Streptococcus (Sc.) uberis* bildet durch die Spaltung von zugesetztem X-Gal (Sigma-Aldrich) blaue Kolonien. *Enterococcus* spp. erscheinen als rosa oder farblose Kolonien bzw. weisen kein Wachstum auf. Äskulinnegative Streptokokken wurden anhand serologischer Nachweisverfahren für die Lancefield-Gruppe B und C weiter differenziert (DiaMondial Streptococcal Extraction Kit Sekisui Virotech). Äskulinnegative Streptokokken der Serogruppe B wurden als *Sc. agalactiae* ausgewiesen. Äskulinnegative Streptokokken, welche keiner der beiden Serogruppen zuzuordnen waren, wurden als sonstige Streptokokken aufgeführt. Zur Differenzierung gram-negativer Stäbchen wurden der Nachweis der Cytochromoxidase sowie Untersuchungen zur Glucoseverstoffwechslung durchgeführt. Gram-negative, oxidase-positive Stäbchen, welche einen oxidativen Glucoseabbau aufwiesen, wurden als *Pseudomonas* spp. identifiziert. Gram-negative, oxidase-negative Stäbchen, welche einen fermentativen Glucoseabbau aufwiesen, wurden als coliforme Mikroorganismen differenziert. Zur weiteren Unterscheidung zwischen *E. coli* und sonstigen coliformen Mikroorganismen wurde

etwas Koloniematerial von der Blutagarplatte entnommen und auf einer vorgegossenen Chromocult-Coliformen-Agarplatte (Merck) für 24 h bei 37°C aerob subkultiviert. Kolonien, welche ein blaues Wachstum aufweisen, weisen dabei auf *E. coli* hin. Rosa-rote Kolonien wurden als sonstige coliforme Mikroorganismen ausgewiesen. Rosa-rote Kolonien, welche nach der Bebrütung des OF-Tests nur ein Wachstum entlang der Beimpfungsstelle des Nährbodens aufwiesen, wurden als *Klebsiella* spp. ausgewiesen. Der Nachweis von coryneformen Mikroorganismen, *Arcanobacterium (A.) pyogenes*, Hefen, Prototheken sowie *Bacillus* spp. in einer Milchprobe erfolgte anhand der Koloniemorphologie und des Gramverhaltens bzw. für *Bacillus* spp. zusätzlich anhand des Nachweises von Sporen und bei *A. pyogenes* durch die Ausbildung einer schmalen Hämolysezone um die Kolonien.

2.3.2.3 Beurteilung der Ergebnisse

Die Beurteilung nachgewiesener Erreger in einer Milchprobe wurde wie in Tab. 2 aufgeführt vorgenommen.

2.3.3 Isolierung der Stämme

Für die Erregerdifferenzierung von KNS und Streptokokken mittels PCR wurden die nachgewiesenen Stämme von den jeweiligen Nährmedien isoliert, in mit 1,5 ml Hirn-Herz-Bouillon (Merck) beschickte 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 24 h bei 37°C aerob inkubiert. Anschließend wurden die Stämme an das Labor des Institutes für Ökologischen Landbau (vTI) geschickt.

Tab. 2: Interpretation der Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung der Viertelanfängsgemelksproben

| Befund | Interpretation | Keimdicke [KbE/ 0,01 ml] | Bakteriologisches Ergebnis |
|-----------------------|--|-----------------------------|--|
| Kein Wachstum | Keine Mastitiserreger nachweisbar | kein Wachstum | ohne besonderen Befund (o.b.B) |
| 1 Kolonietyp | Mastitisursache | | |
| | Kuhassozierte Erreger (<i>S. aureus</i> , <i>Sc. agalactiae</i> , C-Streptokokken, <i>A. pyogenes</i>) | ≥ 1 | positiv |
| | Umweltassozierte Erreger und opportunistische Hautbesiedler (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., sonstige coliforme Mikroorganismen, , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., Hefen, Prototheken, <i>Sc. uberis</i> , KNS) | ≥ 5 | positiv |
| 2 Kolonietypen | Beide werden in den bakteriologischen Befund aufgenommen | | |
| | Kuhassozierte Erreger (<i>S. aureus</i> , <i>Sc. agalactiae</i> , C-Streptokokken, <i>A. pyogenes</i>) | ≥ 1 | positiv |
| | Umweltassozierte Erreger und opportunistische Hautbesiedler (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., sonstige coliforme Mikroorganismen, , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., Hefen, Prototheken, <i>Sc. uberis</i> , KNS) | ≥ 5 | positiv |
| ≥ 3 Kolonietypen | Kontaminiert | | |
| | Kuhassozierte Erreger (<i>S. aureus</i> , <i>Sc. agalactiae</i> , C-Streptokokken, <i>A. pyogenes</i>) | ≥ 1 | positiv |
| | Umweltassozierte Erreger und opportunistische Hautbesiedler (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., sonstige coliforme Mikroorganismen, , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., Hefen, Prototheken, <i>Sc. uberis</i> , KNS) | | Proben werden als kontaminiert ausgewiesen |

2.3.3.1 Bestimmung des Gehaltes somatischer Zellen

Die Bestimmung des Gehaltes somatischer Zellen in den Viertelanfängsgemelksproben erfolgte unmittelbar nach dem bakteriologischen Ansatz der Proben fluoreszenzoptisch mit dem SomaScope Smart (Delta Instruments). Dafür wurden die Proben für 15-20 min auf 38°C bis 41°C erwärmt und unmittelbar vor der Analyse geschwenkt, um eine ausreichende Durchmischung zu erzielen.

2.3.4 Identifizierung koagulase-negativer Staphylokokken, *S. aureus* und Streptokokken mittels PCR-Verfahren

Die im mikrobiologischen Labor der FH Hannover isolierten und in Herz-Hirn-Bouillon inkubierten Erreger von KNS, *S. aureus* und Streptokokken wurden im Weiteren mittels PCR-Verfahren im molekularbiologischen Labor des Institutes für Ökologischen Landbau, Trenthorst auf Speziesebene identifiziert.

Voraussetzung für die Durchführung von PCR-Reaktionen ist das Vorliegen von DNA in ausreichender Menge und Reinheit. Die DNA-Extraktionen erfolgten nach der modifizierten Me-

thode von Tilsala-Timisjärvi et al. (2000), beschrieben in Aulrich und Barth (2008). Nach Lyse der Bakterienzellwände mit Mutanolysin und Lysostaphin und nachfolgender Hydrolyse von Proteinen durch Proteinase K wurde die DNA mittels des kommerziell erhältlichen „Tissue-Kits“ (Macherey-Nagel, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben weiter gereinigt. Anschließend wurde die Menge und Reinheit der isolierten DNA in einem Nano-Spektrophotometer (NanoDrop ND 2000, Thermo Scientific, USA) im UV-Bereich bei 260 und 280 nm bestimmt.

In allen PCR-Verfahren zur Identifizierung der Staphylokokken wurden folgende Referenzstämme der DSMZ mitgeführt: *S. aureus subsp. aureus* DSM 20231, *S. capitis subsp. capitis* DSM 20326, *S. caprae* DSM 20608, *S. chromogenes* (*S. hyicus subsp. chrom.*) DSM 20454, *S. cohnii subsp. cohnii* DSM 20260, *S. epidermidis* DSM 20044, *S. haemolyticus* DSM 20263, *S. hominis subsp. hominis* DSM 20328, *S. hyicus* DSM 20459, *S. lugdunensis* DSM 20345, *S. sciuri subsp. sciuri* DSM 20322, *S. simulans* 20316, *S. warneri* DSM 20266, *S. xylosus* DSM 20229, *S. saprophyticus subsp. saprophyticus* DSM 18669, *S. saprophyticus subsp. bovis* DSM 4804.

Zur Identifizierung der *Staphylococcus* Spezies kam anfangs die ITS-PCR (internal transcribed spacer PCR) nach Couto et al. (2001) zum Einsatz, die auf der polymorphen Natur von Spacer-Sequenzen des 16S-23S Genes beruht. Nach ITS-PCR und Auftrennung der PCR-Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden charakteristische Bandenmuster für die einzelnen Spezies erhalten, die jeweils mit den Mustern der Referenzstämme verglichen wurden. Weiterhin wurde zur Differenzierung zwischen *S. xylosus*, *S. cohnii* und *S. saprophyticus*, die mit dieser Methode nicht möglich ist, die PCR-RFLP Analyse (PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse) des *dnaJ* Genes (Hitzeschock-protein Hsp 40) angewandt (Hauschild & Stepanovic, 2008). Hier wurde ein 920 Basenpaare großer Abschnitt des *dnaJ*-Genes vervielfältigt, der anschließend jeweils einem Restriktionsverdau mit XapI und Bsp1431 unterworfen wurde. Die erhaltenen Fragmente aus dem Restriktionsverdau ergaben in der Gelelektrophorese charakteristische Bandenmuster für die einzelnen *Staphylococcus* Spezies. Es stellte sich im Verlauf der Untersuchungen heraus, dass die zuletzt genannte Methode für die in diesem Projekt vorliegenden Proben bessere Identifizierungsergebnisse erbrachte als die ursprünglich geplante Methode nach Couto (2001). Daraus folgend wurden dann alle Proben mit dieser Methode untersucht. Zur Absicherung der Ergebnisse und zur Speziesbestimmung in Proben, die auch mit dieser Methode nicht sicher vorzunehmen war, kam die PCR-RFLP Analyse des *gap*-Genes zur Anwendung, die bei Yugueros et al. (2001) beschrieben ist. Hier wurde ein 933 bp großer Abschnitt des *gap*-Genes vervielfältigt, der im Anschluss einem Verdau mit dem Restriktionsenzym AluI unterworfen wurde. Auch hier erfolgte die Zuordnung zu den Spezies entsprechend der charakteristischen Bandenmuster aus der Gelelektrophorese nach Abgleich mit den Bandenmustern der Referenzstämme.

Zeigten Proben in der PCR-RFLP Analyse des *dnaJ*-Genes und/oder der des *gap*-Genes Bandenmuster, die dem Referenzstamm von *S. aureus* (DSM 20231) entsprachen, wurden diese Proben in weiteren PCR Verfahren, die auf dem Nachweis des Koagulase-Genes (*coa*) beruhen, geprüft. Zum einen wurde die von Hookey et al. (1998) beschriebene Methode in der Modifikation von Akineden et al. (2008) genutzt, bei der bei Vorliegen des *coa*-Gens ein PCR-Produkt der variablen Größe um 600 bp (abhängig vom Genotyp) gebildet wird. Das

zweite Verfahren war eine PCR-RFLP (Schlegelova et al., 2003) eines 650-1050 bp großen PCR-Produktes (abhängig vom Genotyp) des *coa*-Gens, das mit dem Restriktionsenzym *AluI* geschnitten wurde. Wurden positive Nachweise in diesen beiden PCR-Verfahren erhalten, so wurden die Proben als *S. aureus* positiv bewertet.

Für die Identifizierung von Streptokokken wurde die PCR-RFLP Analyse ribosomaler DNA des 16S-23S-Genes angewendet, die bei McDonald et al. (2005) beschrieben ist. Nach Vervielfältigung eines ca. 1500 Basenpaare (bp) großen DNA-Abschnittes des 16S-23- Genes wurde dieses durch Zugabe von Restriktionsenzymen (*AluI*, *HaeIII*, *RsaI*) in unterschiedlich große Fragmente gespalten. Die erhaltenen Fragmente wurden in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Das damit erhaltene Bandenmuster ist charakteristisch für die einzelnen *Streptococcus* Spezies, von denen auch Referenzstämme über den gesamten Prozess von der DNA-Extraktion, die PCR-RFLP und die Elektrophorese mitgeführt wurden. Folgende Referenzstämme, die in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) hinterlegt sind, kamen in den Untersuchungen zum Einsatz: *Sc. uberis* DSM-Nummer 20569, *Sc. parauberis* DSM 6631, *Sc. dysgalactiae subsp dysgalactiae* DSM 20662, *Sc. agalactiae* DSM 2134.

2.4 Statistische Auswertungen

Die Auswertung der Erhebung zum Einstreumanagement auf den 106 Projektbetrieben erfolgte entsprechend des Ansatzes rein deskriptiv, jedoch gingen die für die 30 ausgewählten Betriebe erfassten Informationen auch in die weiteren Auswertungen ein. Zusätzlich standen aus dem interdisziplinären Projekt Angaben zu den allgemeinen Haltungsbedingungen, der Eutersauberkeit und der Zitzenkondition zur Verfügung und wurden in den Analysen genutzt. Alle Auswertungen erfolgten mit dem Programmpaket PASW 18.0 (IBM, 2009).

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Status quo des Einstreumanagements in der Ökologischen Milchviehhaltung

Eine umfangreiche Darstellung der Fragebogenauswertung findet sich in

Barth K, Murk K, Brinkmann J, March S, Volling O, Weiler M, Weiß M, Drerup C, Krömker V (2011) Einstreumanagement in der Ökologischen Milchviehhaltung. Landbauforsch SH 346:41-48

(siehe Anhang). An dieser Stelle erfolgt deshalb nur eine zusammenfassende Ergebnisdarstellung:

- Stroh ist das am meisten verwendete Einstreumaterial. In Strohangelregionen, wie reinen Grünlandregionen, werden auch Streuwiesenaufwüchse, Futterreste sowie Heu zum Einstreuen verwendet.
- 78 der 106 Betriebe beschränkten sich auf eine Einstreuart. Zur Strohgewinnung wurden überwiegend die Getreidearten Weizen, Triticale, Gerste und Roggen genutzt. Leguminosen, wie Erbse und Ackerbohne wurden nur marginal verwendet.

- Kalk und Gesteinsmehl sowie Heu wurden nur in Verbindung mit anderen Einstreuarten verwendet.
- 83 % der Projektbetriebe nutzten das Stroh für den Eigenbedarf und 59 % der Betriebe kauften zusätzlich Stroh zu. Lediglich 20 der 63 Strohkaufbetriebe setzten nur ökologisch erzeugtes Stroh ein.
- Stroh wurde überwiegend gepresst gelagert – nur acht Betriebe lagerten und verwendeten loses Stroh. Die Strohlagerung erfolgte in der Regel in einer Lagerhalle. 41 Betriebe lagerten das Stroh noch einmal zwischen, davon 22 im Kopfraum der Liegeboxen. Das Einbringen der Einstreu auf die Liegebereiche der Kühe erfolgte überwiegend manuell.
- 80 % der Betriebe hielten ihre Kühe in Liegeboxenlaufställen. Dabei dominierte die Tief-
liegebox (inkl. hochgelegter Tiefbox und Hochbox mit Streuschwelle). Erwartungsgemäß betrug die täglich eingebrachte Einstreumenge je Kuh bei freien Liegeflächen deutlich mehr als bei Liegeboxenaufstallung.
- Die Strohqualität vor dem Einbringen in den Liegebereich konnte als gut bis sehr gut eingestuft werden. Nur wenige Proben wiesen offensichtliche Mängel bezüglich des Geruchs, der Farbe bzw. der Verschmutzung auf.

3.1.2 Beziehung zwischen Einstreumanagement und Eutergesundheitsstatus der Herden

Für die Beurteilung des Eutergesundheitsstatus der Herden wurden die Ergebnisse des Jahres 2010 aus dem interdisziplinären Forschungsprojekt 07OE012...22 herangezogen. Insbesondere wurden die Kennzahlen Neuinfektionsrate, Heilungsrate, Anteil therapieunwürdiger Kühe, mittlerer Zellgehalt in der MLP (kalkuliert auf Basis der logarithmierten Grunddaten) für die Charakterisierung des Einzelherdenniveaus genutzt. Mittels grafischer Datenexploration, Korrelationsanalysen sowie parameterfreier Testverfahren wurde geprüft, welche Variablen des Einstreumanagements in Beziehung zum Eutergesundheitsstatus der Herden stehen.

Betriebe, die das Einstreuen mechanisiert haben, wiesen signifikant niedrigere Neuinfektionsraten (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$) und tendenziell höhere Heilungsraten (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,08$) auf als die manuell einstreuenden Betriebe. Hinsichtlich des Zellzahl-niveaus ergaben sich keine Unterschiede.

Hinsichtlich der Strohlagerung ergaben sich keine Unterschiede bei der Eutergesundheit der Herden, jedoch zeigte sich ein Effekt der Zwischenlagerung: Betriebe, die ihr Einstreumaterial im Kopfraum zwischenlagern, wiesen signifikant höhere Zellzahlen in der Milchleistungsprüfung auf als Betriebe die nicht oder an anderen Orten zwischenlagerten (Kruskall-Wallis-Test, $p < 0,05$, Abb. 2). Dies spiegelte sich auch beim Anteil der Tiere mit mehr als 100.000 Zellen je ml in der MLP wieder (Kruskall-Wallis-Test, $p < 0,01$).

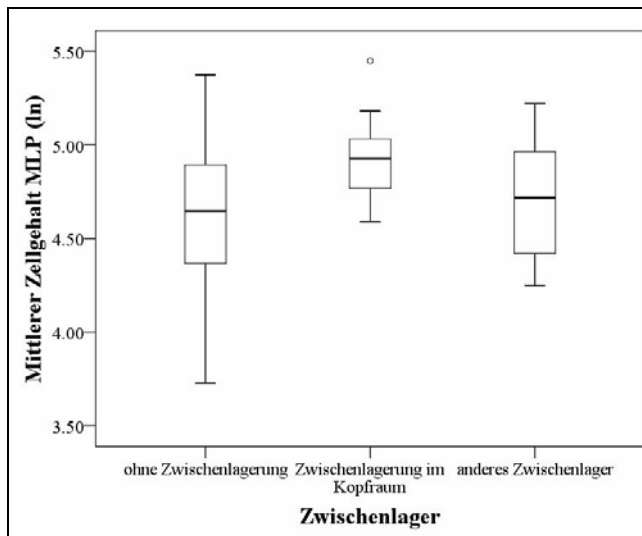


Abb. 2: Mittlere Zellzahlwerte in der Milchleistungsprüfung in Abhängigkeit von der Form der Zwischenlagerung des Einstreumaterials auf dem Betrieb (n=72/17/14)

Zwischen der Länge des Strohs sowie der durch die Berater mittels Scoring eingeschätzten Qualität des Strohs und dem Eutergesundheitsniveau der Herden konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Gleiches galt für die Beziehung zum Anteil verschmutzter Euter in der Herde, der im Rahmen des 4. Betriebsbesuches im interdisziplinären Projekt ermittelt wurde. Hier zeigte sich jedoch wieder ein tendenzieller Unterschied zwischen den Betrieben, die das Einstreuen mechanisiert haben und denjenigen, die manuell einbringen (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,06$, Abb. 3). Nicht ganz so deutlich, aber immer noch erkennbar, zeigte sich der Unterschied bei der Gestaltung des Liegebereichs (Abb. 4). Herden mit Liegeboxenaufstallung wiesen geringere Anteile an Tieren mit verschmutzten Eutern auf als Betriebe, die freie Liegeflächen nutzten.

Hinsichtlich der anderen untersuchten Variablen zur Charakterisierung der Eutergesundheits-situation unterschieden sich Liegeboxenbetriebe nicht von Betrieben mit freien Liegeflächen, wobei die mittlere Milchleistung in den Liegeboxenbetrieben signifikant höher war (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0.01$).

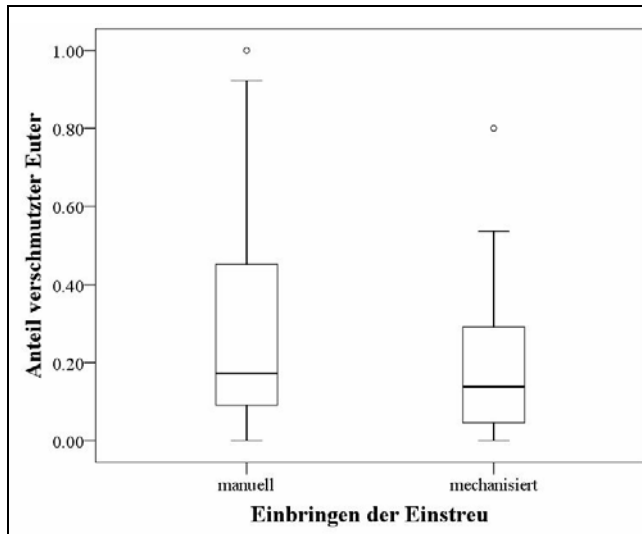


Abb. 3: Anteil verschmutzter Euter in der Herde in Abhängigkeit von der Art des Einbringens der Einstreu in die Liegebereiche (n=73/24)

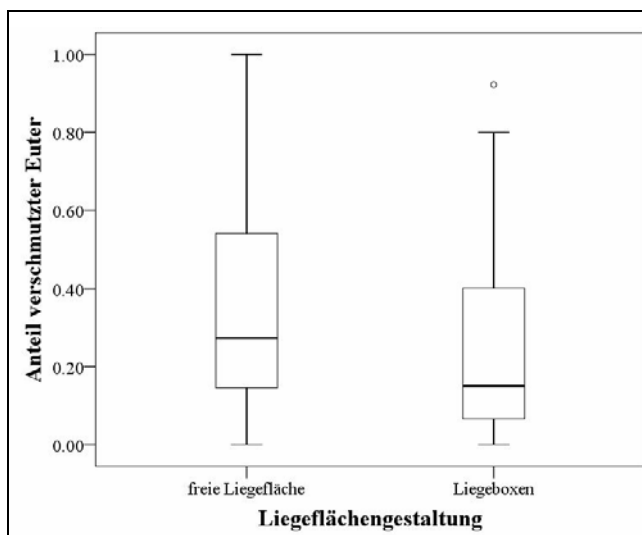


Abb. 4: Anteil verschmutzter Euter in der Herde in Abhängigkeit von der Gestaltung der Liegebereiche (n=19/82)

Leistungsstärkere Betriebe verwendeten auch eher einen Kalkzusatz, wobei sich zwischen Kalk einsetzenden und Kalk nicht nutzenden Betrieben keine Unterschiede in der Eutergesundheitssituation zeigten.

Auch die Häufigkeit des Einstreuens sowie die Menge der eingebrachten Einstreu je Tier und Tag zeigten keinen Bezug zu den geprüften Gesundheitskriterien.

Fazit: Hinweise auf einen Bezug zwischen dem Einstreumanagement und der Eutergesundheitssituation in den untersuchten Herden ergaben sich nur sehr begrenzt. Lediglich die Form der Zwischenlagerung und Art des Einbringens der Einstreu auf die Liegeflächen ließen einen Zusammenhang erkennen.

3.1.3 Einflüsse des Einstreumanagements auf die Eutergesundheit der Erstkalbinnen

Auch diese Analyse stützte sich auf die im Projekt 07OE012...22 erhobenen Daten, ergänzt um die Ergebnisse der gezielten Befragung zum Einstreumanagement. Jedoch standen dabei die Variablen mittleres Zellzahlniveau der Erstlaktierenden (MLP, logarithmiert) und Anteil der Erstlaktierenden mit >100.000 Zellen je ml Milch (MLP) im Zentrum der Auswertungen. Beide Variablen liefern einen Hinweis auf das Eutergesundheitsniveau der Erstlaktierenden und damit auch indirekt auf die Haltung der Färsen bis zum ersten Abkalben.

Von allen geprüften Einflussgrößen zeigten lediglich die Form der Zwischenlagerung sowie der Einsatz von Kalk tendenzielle Effekte auf die beiden o. g. Variablen. Betriebe, die ihre Einstreu im Kopfraum zwischenlagerten, wiesen höhere mittlere Zellzahlen bei den Erstkalbinnen auf als die anderen Betriebe (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,053$, Abb. 5).

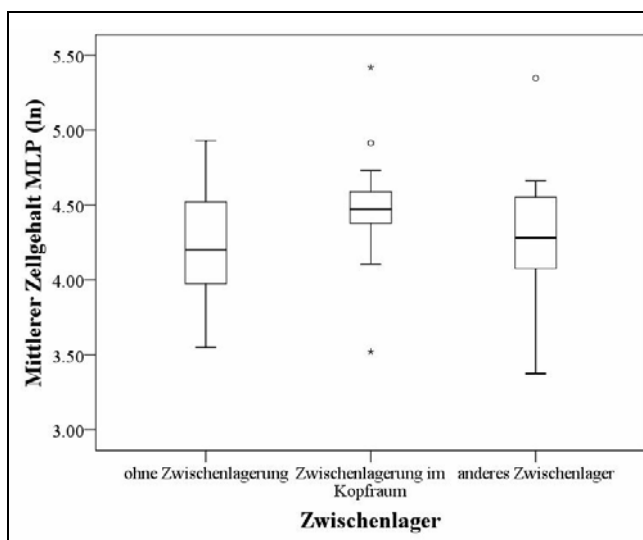


Abb. 5: Mittlere Zellzahlwerte in der Milchleistungsprüfung der Erstkalbinnen in Abhängigkeit von der Form der Zwischenlagerung des Einstreumaterials auf dem Betrieb (n=72/17/14)

Der Anteil von Erstkalbinnen, die den Zellzahlgrenzwert von 100.000 Zellen je ml überschritten, war in Betrieben, die ihrer Einstreu Kalk zusetzten, tendenziell höher (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,052$, Abb. 6). Dies ist jedoch nicht als Hinweis zu werten, dass ein Kalkzusatz das Risiko für höhere Zellgehalte in der Milch der Erstkalbinnen erhöht. Vielmehr ist zu vermuten, dass Betriebe, die bereits Mastitisprobleme haben bzw. ein erhöhtes Mastitisrisiko erwarten, Kalk als Mittel zur Verbesserung der Einstreuhygiene einsetzen.

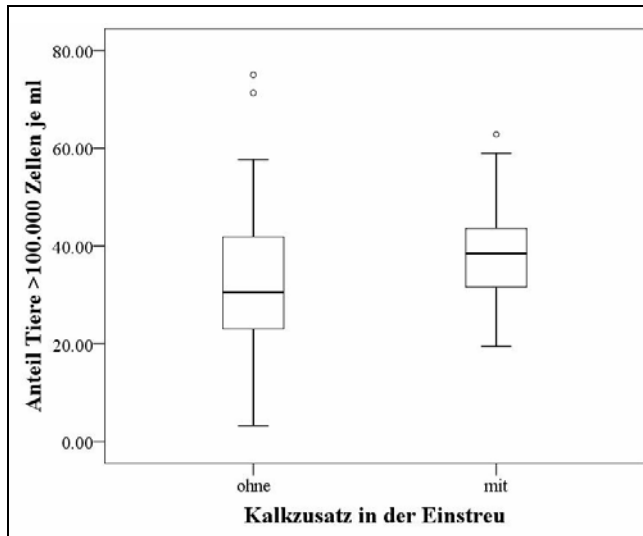


Abb. 6: Anteil der Erstkalbinnen mit Zellzahlgrenzwertüberschreitung in der MLP in Abhängigkeit von der Nutzung eines Kalkzusatzes in der Einstreu (n=75/31)

Fazit: Eindeutige Hinweise auf bestehende Beziehungen zwischen dem Einstreumangement und der Eutergesundheit der Erstkalbinnen haben sich aus der vorliegenden Datenanalyse nicht ergeben. Es ist zu erwarten, dass vertiefende Untersuchungen des Managements im Bereich der Kälber- und Jungrinderaufzucht deutlichere Aussagen liefern.

3.1.4 Beziehung zwischen Keimgehalt der Einstreu und Euterinfektionen

3.1.4.1 Keimgehalt der Einstreu

Auf den 30 vertieft untersuchten Betrieben wurden bei beiden Betriebsbesuchen Proben der noch nicht verwendeten Einstreu gezogen und analysiert. Für die Bewertung wurde der von Krömker et al. (2010) ausgewiesene Grenzwert von 10^4 KbE/g genutzt. Während die Betriebe die Grenzwerte für den Besatz mit äskulinpositiven Streptokokken und *E. coli* selten überschritten, wies die Einstreu keines Betriebes weniger als 10^4 KbE/g an coliformen Keimen auf (Tab. 3). Selbst bei Erhöhung des Grenzwerts auf 10^6 KbE/g überschritten noch 22 der 30 Betriebe mindestens einmal diesen Wert. Diese Grenzwertüberschreitungen konnten jedoch nicht mit speziellen Managementmaßnahmen in Verbindung gebracht werden.

Jahreszeitliche Einflüsse konnten bei den Keimgehalten der Einstreu nicht hergestellt werden: Grenzwertüberschreitungen traten gleichermaßen in der Stallhaltungs- wie in der Weidesaison auf.

Tab. 3: Häufigkeit der Grenzwertüberschreitung für den Mikroorganismenbesatz in der unbenutzten Einstreu (n=30 Betriebe, 2 Probenahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten)

| Mikroorganismen | Grenzwertüberschreitung (>10 ⁴ kbE/g) | | |
|-------------------------------|--|----------|-----------|
| | keine | einmalig | zweimalig |
| Äskulinpositive Streptokokken | 22 | 6 | 2 |
| Coliforme | 0 | 9 | 21 |
| E. coli | 26 | 4 | 0 |

3.1.4.2 Euterinfektionen

Auf den Betrieben wurden 1198 Viertelanfangsgemelksproben zur zytobakteriologischen Untersuchung gewonnen (Tab. 4).

Tab. 4: Verteilung der Befunde der zytobakteriologischen Untersuchung auf die Klassen entsprechend DVG (1994)

| | Zellzahl/ml | Bakteriologischer Befund | Anzahl Viertel | % | % Valide* |
|------------------------|-------------|--------------------------|----------------|------|-----------|
| Normale Sekretion | ≤ 100.000 | o. b. B. | 526 | 43,9 | 49,4 |
| Latente Infektion | ≤ 100.000 | positiv | 278 | 23,2 | 26,1 |
| Unspezifische Mastitis | > 100.000 | o. b. B. | 71 | 5,9 | 6,7 |
| Mastitis | > 100.000 | positiv | 189 | 15,8 | 17,8 |
| Kontaminierte Probe | | | 134 | 11,2 | |
| Gesamt | | | 1198 | 100 | 100 |

*nach Ausschluss der kontaminierten Proben

In den 467 Viertelanfangsgemelksproben mit bakteriologisch positivem Befund wurden am häufigsten coryneforme Keime (215 Proben, 46 %) nachgewiesen, gefolgt von koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) und *Staphylococcus aureus* (Tab. 5).

Die Hinterviertel eines Euters unterliegen einem höheren Infektionsrisiko als die Vorderviertel. Um dies zu berücksichtigen, wurden die Proben jeweils von einem Vorder- und einem Hinterviertel der zufällig ausgewählten Kühe gewonnen. Mit 243 vs. 224 infizierten Eutervierteln zeigte sich eine leicht höhere Infektionsrate auf den Hintervierteln, wobei die Erregerverteilung auf den beiden Positionen (vorn-hinten) annähernd gleich war (Tab. 6).

Tab. 5: Häufigkeitsverteilung der nachgewiesenen Erreger in den Viertelanzfangsgemelkproben unter Berücksichtigung des Gehaltes somatischer Zellen

| Bakteriologischer Befund | Anzahl | % | Anteil mit Zellzahl | |
|-----------------------------------|--------|------|---------------------|---------------|
| | | | ≤ 100.000 /ml | > 100.000 /ml |
| Coryneforme Keime | 215 | 46,0 | 154 | 61 |
| Koagulase-negative Staphylokokken | 94 | 20,1 | 50 | 44 |
| Staphylococcus aureus | 50 | 10,7 | 30 | 20 |
| Streptococcus uberis | 17 | 3,6 | 3 | 14 |
| Hefen | 13 | 2,8 | 8 | 5 |
| Enterokokken | 12 | 2,6 | 5 | 7 |
| Coliforme | 4 | 0,9 | 1 | 3 |
| E. coli | 1 | 0,2 | 0 | 1 |
| Klebsiellen | 2 | 0,4 | 0 | 2 |
| Mischinfektionen | 49 | 10,5 | 23 | 26 |
| Sonstige | 10 | 2,2 | 4 | 6 |
| Gesamt | 467 | 100 | 278 | 189 |

Tab. 6: Häufigkeitsverteilung der nachgewiesenen Erreger in den Viertelanzfangsgemelkproben unter Berücksichtigung der Viertelposition und des Zellgehaltes

| Bakteriologischer Befund | Vorderviertel | | Hinterviertel | |
|-----------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|------------------------------|
| | Anzahl | davon mit >100.000 Zellen/ml | Anzahl | davon mit >100.000 Zellen/ml |
| Coryneforme Keime | 107 | 24 | 108 | 37 |
| Koagulase-negative Staphylokokken | 40 | 15 | 54 | 29 |
| Staphylococcus aureus | 28 | 10 | 22 | 10 |
| Streptococcus uberis | 11 | 9 | 6 | 5 |
| Hefen | 3 | 1 | 10 | 4 |
| Enterokokken | 6 | 3 | 6 | 4 |
| Coliforme | 3 | 2 | 1 | 1 |
| E. coli | 1 | 1 | | |
| Klebsiellen | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mischinfektionen | 20 | 13 | 29 | 13 |
| Sonstige | 4 | 3 | 6 | 3 |
| Gesamt | 224 | 82 (36,6%) | 243 | 107 (44,0%) |

Nach der Differenzierung der Erreger mittels PCR stellten *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus* und *Staphylococcus haemolyticus* den größten Anteil innerhalb der Gruppe der KNS (Tab. 7). Beim Abgleich mit dem Zellgehalt im Viertelanfangsgemelk zeigte sich, dass *S. chromogenes* auch häufiger mit einer Zellzahl >100.000 Zellen/ml einherging.

Tab. 7: Häufigkeitsverteilung der Erregerspezies in den Viertelanfangsgemelksproben nach der Differenzierung mittels PCR

| Befund der Differenzierung | Anzahl | % | Anteil mit Zellzahl | |
|-----------------------------------|--------|------|---------------------|---------------|
| | | | ≤ 100.000 /ml | > 100.000 /ml |
| KNS gesamt (n=145), davon | | | | |
| <i>S. chromogenes</i> | 43 | 23,5 | 15 | 26 |
| <i>S. xylosus</i> | 39 | 21,3 | 21 | 16 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 28 | 15,3 | 19 | 7 |
| <i>S. warneri</i> | 10 | 5,5 | 7 | 3 |
| <i>S. epidermidis</i> | 6 | 3,3 | 3 | 3 |
| Sonstige KNS | 9 | 5,0 | 8 | 1 |
| KNS-Mischnachweis | 7 | 3,8 | 4 | 3 |
| KNS + <i>S. aureus</i> | 2 | 1,1 | 0 | 2 |
| KNS + <i>S. uberis</i> | 1 | 0,5 | 0 | 1 |
| | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 | 10,9 | 7 | 13 |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 16 | 8,8 | 2 | 12 |
| <i>Streptococcus parauberis</i> | 1 | 0,5 | 1 | 0 |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 1 | 0,5 | 1 | 0 |
| | | | | |
| Gesamt | 183 | 100 | | |

Bei der Gegenüberstellung der Qualität der verwendeten Einstreu (charakterisiert durch den Keimbesatz) mit den Indikatoren des Herdeneutergesundheitsstatus (Zellzahlen in der MLP, Neuinfektionsrate, Heilungsrate, Anteil therapieunwürdiger Tiere) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Herden, welche die Grenzwerte über- bzw. unterschritten. Dies galt auch dann noch, wenn die mehrere Grenzwerte (keiner der Grenzwerte, der Grenzwert für äskulinpositive Streptokokken oder coliforme Keime oder *E. coli*, etc.) gleichzeitig überschritten wurden (Abb. 7).

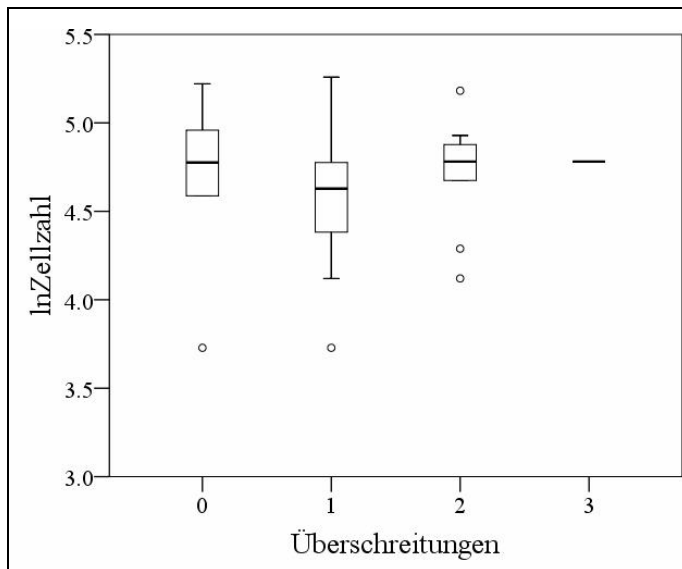


Abb. 7: Boxplot für den mittleren Zellgehalt in der Milchleistungsprüfung (logarithmiert) in Abhängigkeit von der Anzahl der gleichzeitig überschrittenen Grenzwerte für den Besatz der ungenutzten Einstreu mit äskulinpositiven Streptokokken, *E. coli* bzw. coliformen Keimen (n=6/44/9/1)

3.1.4.3 Erregernachweis im Zitzenkanal, auf der Euterhaut und in der Einstreu

Die in den Viertelanfängsgemelksproben nachgewiesenen Spezies fanden sich auch in den Tupferproben des Strichkanals. Auch die anteilmäßige Verteilung folgt der der Gemelksproben (Tab. 8). Es ist aber zu beachten, dass bei den Probenahmen der Viertelanfängsmelksprobe durchaus Zitzenkanalbesiedler in die Probe gelangen können, ohne dass eine tatsächliche Infektion der Milchdrüse vorliegt. Dies gilt nicht für die Hauttupfer, die insbesondere für die am stärksten vertretenen KNS-Spezies (*S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*) ebenfalls das gleiche Verteilungsmuster aufweisen (Tab. 8).

Jedoch treten bei den Hauttupferproben andere KNS-Spezies stärker in Erscheinung (z. B. *S. cohnii urealyticus* oder *S. equorum*), die in den Milch- bzw. Zitzenkanaltupferproben nur selten auftraten. Diese Spezies wurden auch in den Einstreuproben nachgewiesen (Tab. 9).

Im Gegensatz zu den am Tier gewonnenen Proben, wiesen die Einstreuproben ein anderes Verteilungsmuster der KNS-Spezies auf: *S. xylosus* war die mit Abstand am häufigsten nachgewiesene KNS-Spezies (Tab. 9).

Tab. 8: Häufigkeitsverteilung der Erregerspezies in den Tupferproben von Zitzenkanal und Euterhaut nach der Differenzierung mittels PCR

| Befund der Differenzierung | Strichkanal | | Haut | |
|---|-------------|------|--------|------|
| | Anzahl | % | Anzahl | % |
| Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) | | | | |
| <i>S. chromogenes</i> | 40 | 27,2 | 30 | 22,7 |
| <i>S. xylosus</i> | 42 | 28,5 | 40 | 30,3 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 21 | 14,3 | 20 | 15,2 |
| <i>S. warneri</i> | 8 | 5,4 | 3 | 2,3 |
| <i>S. epidermidis</i> | 5 | 3,4 | 3 | 2,3 |
| <i>S. cohnii urealyticus</i> | | | 8 | 6,1 |
| <i>S. equorum</i> | | | 7 | 5,3 |
| <i>S. sciuri</i> | | | 6 | 4,5 |
| Sonstige KNS | 10 | 6,8 | 2 | 1,5 |
| KNS-Mischnachweis | 4 | 2,7 | 6 | 4,5 |
| KNS + <i>S. aureus</i> | 1 | 0,7 | | |
| KNS + <i>Sc. uberis</i> | | | | |
| KNS + <i>Sc. dysgalactiae</i> | 1 | 0,7 | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 12 | 8,2 | 4 | 3,1 |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 1 | 0,7 | 1 | 0,7 |
| <i>Streptococcus parauberis</i> | | | 1 | 0,7 |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2 | 1,4 | 1 | 0,7 |
| Gesamt | 147 | 100 | 132 | 100 |

Tab. 9: Häufigkeitsverteilung der Erregerspezies in den Einstreuproben nach der Differenzierung mittels PCR

| Befund der Differenzierung | Anzahl | % |
|-----------------------------------|--------|------|
| Koagulase-negative Staphylokokken | | |
| <i>S. chromogenes</i> | 5 | 9,3 |
| <i>S. xylosus</i> | 24 | 44,4 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 5 | 9,3 |
| <i>S. epidermidis</i> | 1 | 1,8 |
| <i>S. equorum</i> | 7 | 13,0 |
| <i>S. sciuri</i> | 1 | 1,8 |
| <i>S. huicus</i> | 1 | 1,8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2 | 3,7 |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2 | 3,7 |
| Nicht identifizierbar | 6 | 11,2 |
| Gesamt | 54 | 100 |

Fazit: In der untersuchten Stichprobe konnten keine eindeutigen Beziehungen zwischen dem Eutergesundheitszustand der Herden und dem Erregerbesatz der Einstreu hergestellt werden. Bezogen auf die koagulase-negativen Staphylokokken variierte das Speziesspektrum von der Einstreu über die Euterhaut zum Zitzenkanal und den Viertelanfangsgemelksproben, wobei die beiden letztgenannten deutliche Beziehungen zueinander erkennen lassen.

3.1.5 Beziehung zwischen Infektionen und Melkbarkeit

Für die Bewertung der Melkbarkeit wurden die Milchflusskurven der zufällig ausgewählten und beprobten Kühe herangezogen. Die Milchflusskurven wurden entweder direkt bei der Probengewinnung mit ermittelt oder durch den entsprechenden Landeskontrollverband zur Verfügung gestellt. Letzteres galt für die Betriebe in Bayern, da dort die MLP überwiegend mit LactoCorden® (WMB AG, Balgach, Schweiz) durchgeführt wird.

Bei der Betrachtung der Milchflusscharakteristika (Tab. 10) wird deutlich, dass der maximale Milchfluss als Indikator für die Leichtmelkigkeit und damit für einen Mastitis-Risikofaktor im Normbereich liegt. Dagegen deutet die mittlere Abstiegsdauer von 2,48 bzw. 2,07 min auf einen reduzierten Anteil an den gewünschten Rechteckkurven und einen vermehrten Anteil an stufigen Kurven (und somit ungleichmäßige Entleerungsgeschwindigkeiten der Euterviertel) hin. Relevante Korrelationen zwischen den Melkbarkeitsparametern und dem logarithmierten Zellgehalt der Viertelanfangsgemelksproben bestanden jedoch nicht.

Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichung ausgewählter Parameter der Milchflusskurven in Abhängigkeit von der Melkzeit

| | | Morgenmelkzeit | | Abendmelkzeit | |
|---------------------------------------|---------|----------------|------|---------------|------|
| | | MW | SD | MW | SD |
| Maschinengesamtgemelk | [kg] | 11,58 | 4,45 | 9,75 | 4,00 |
| Zeit Maschinengesamtgemelk | [min] | 5,57 | 2,17 | 5,58 | 2,03 |
| Durchschnittliches Minutenhauptgemelk | [kg] | 2,27 | 0,72 | 2,16 | 0,72 |
| Dauer Maschinenhauptgemelk | [min] | 5,22 | 2,43 | 4,49 | 1,82 |
| Maximaler Milchfluss | [g/min] | 3,42 | 1,05 | 3,26 | 1,13 |
| Dauer der Plateauphase | [min] | 2,07 | 1,57 | 1,82 | 1,28 |
| Anstiegsdauer | [min] | 0,62 | 0,29 | 0,57 | 0,30 |
| Abstiegsdauer | [min] | 2,48 | 1,54 | 2,07 | 1,14 |

Um die Bedeutung der Melkbarkeit für das Infektionsgeschehen auf den Betrieben zu ermitteln, wurde der Datensatz auf statistisch zu sichernde Beziehungen zwischen den mittleren Milchflusskurvencharakteristika, dem Anteil verschmutzter Euter, der chronischen sowie akuten Zitzenkondition und den Infektionsraten, bezogen auf die in den Viertelanfangsgemelken nachgewiesenen Erreger, untersucht. Folgende Beziehungen wurden gefunden:

- Der Anteil von Tieren mit chronischen Zitzenkonditionsstörungen ging mit dem Anteil verschmutzter Euter im Betrieb einher (Spearman; $r=0,37$; $p<0,01$) und korrelierte umgekehrt proportional mit dem Anteil von Viertelanfangsgemelken mit positivem KNS-Befund (Spearman; $r=-0,31$; $p<0,05$).
- Der Anteil verschmutzter Euter im Betrieb korrelierte negativ mit der mittleren Zellzahl in der MLP (Spearman; $r=-0,51$; $p<0,001$).
- Der mittlere höchste Milchfluss in den Herden korrelierte positiv mit dem Anteil von Tieren mit chronischen Zitzenkonditionsstörungen in der Herde (Spearman; $r=0,31$; $p<0,05$). Gleiches galt für die Dauer der Abstiegsphase (Spearman; $r=0,28$; $p<0,05$).
- Der Anteil an Viertelanfangsgemelken mit positivem KNS-Befund korrelierte umgekehrt proportional mit der mittleren Gesamtgemelkmenge (Spearman; $r=-0,33$; $p=0,01$), der mittleren Dauer des Maschinenhauptgemelks (Spearman; $r=-0,41$; $p=0,001$) und der mittleren Dauer der Plateauphase (Spearman; $r=-0,37$; $p<0,01$) der Herden.
- Der Anteil an Viertelanfangsgemelken mit positivem *S. aureus*-Befund korrelierte umgekehrt proportional mit der mittleren Dauer (Spearman; $r=-0,32$; $p<0,05$) und Menge des Maschinennachgemelks (Spearman; $r=-0,35$; $p<0,01$) der Herden.

Die schwache Ausprägung und zum Teil bestehende logische Widersprüchlichkeit der Beziehungen erschweren zwar die Interpretation, verdeutlichen aber gleichzeitig die Komplexität des Ursache-Wirkungs-Gefüges.

Fazit: Eindeutige Beziehungen zwischen dem maximalen Milchfluss als Indikator für die Leichtmelkigkeit und damit ein erhöhtes Mastitisrisiko konnten nicht gefunden werden.

3.2 Nutzen und Verwertbarkeit

Die vorliegende Studie beschreibt das Einstreumanagement und die Qualität der verwendeten Einstreu in der ökologischen Milchviehhaltung. Aufgrund der Stichprobenauswahl (siehe auch Projekt 07OE012...22) ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse gesichert.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist die Erstellung eines speziellen, für Betriebe der ökologischen Milchviehhaltung zugeschnittenen Empfehlungskatalogs nicht notwendig. Die einzelbetrieblichen Bedingungen sind zwar zu berücksichtigen, jedoch bleiben die grundsätzlichen Empfehlungen zum Einstreumanagement, die auf der konventionellen Milchviehhaltung basierend entwickelt wurden, uneingeschränkt gültig.

Die Untersuchungen zur Speziesdifferenzierung der koagulase-negativen Staphylokokken deuten auf eine von der Einstreu abweichende Infektionsquelle hin. Jedoch bedarf diese Vermutung einer Abklärung in weiterführenden Untersuchungen.

4 Zusammenfassung

Der in der ökologischen Tierhaltung geforderte Einsatz natürlicher Einstreumaterialien kann das Risiko für umweltbedingte Eutererkrankungen erhöhen. Im Rahmen des Projektes sollten - der potentiellen Infektionskette Einstreu – Euterhaut – Zitzenkanal – Euterlumen folgend - die kritischen Punkte identifiziert und mögliche Handlungsempfehlungen abgeleitet werden. Es

wurden auf 106 Projektbetrieben eines anderen Vorhabens (FöKZ 07OE012...22) Daten zum Einstreumanagement erhoben und das zum Einstreuen verwendete Material subjektiv beurteilt. Zusätzlich wurden auf 30 der Betriebe einmalig in der Stall- und in der Weideperiode Proben der Einstreu, Tupferproben der Zitzenhaut und des -kanals sowie Viertelanfangsmelksproben für die zytobakteriologische Untersuchung von jeweils zehn zufällig ausgewählten Kühen gewonnen. Die Milchflusskurven der beprobten Tiere wurden aufgezeichnet, um deren Prädisposition für einen Zitzenschließmuskel mit einem geringen Tonus zu erfassen. Die Auswertung der Daten zeigte, dass überwiegend Stroh als Einstreumaterial eingesetzt wurde, das – subjektiv mittels Scoring beurteilt – eine gute bis sehr gute Qualität aufwies. Grundsätzlich im Ökolandbau vorhandene Risikofaktoren konnten nicht identifiziert werden, vielmehr waren nur einzelbetriebliche Schwachpunkte auszumachen. Die Untersuchung auf den 30 Betrieben zeigte, dass nur wenige Betriebe die empfohlenen Grenzwerte für den Besatz der Einstreu mit äskulinpositiven Streptokokken und *E. coli* überschritten. Dafür wurden in Großteil der Proben coliforme Erreger in kritischer Anzahl gefunden. Diese Grenzwertüberschreitungen konnten jedoch nicht mit speziellen Managementmaßnahmen in Verbindung gebracht werden. Es wurde gezeigt, dass Infektionserreger entlang der untersuchten Kette gefunden werden können und dass sich das Spektrum der koagulase-negativen-Staphylokokkenspezies dabei verschiebt. Der erwartete Einfluss der Melkbarkeit der Kühe auf das Infektionsgeschehen war nicht eindeutig nachzuweisen.

5 Gegenüberstellung der geplanten mit den tatsächlich erreichten Zielen

Das Projektziel, das derzeitig vorherrschende Einstreumanagement und die eingesetzten Einstreumaterialien in der ökologischen Milchviehhaltung zu beschreiben, wurde mit der Erhebung auf den 106 Projektbetrieben erreicht.

Die Identifikation relevanter kritischer Punkte entlang der potentiellen Infektionskette Einstreu – Euterhaut – Zitzenkanal - Euterlumen gelang nur sehr eingeschränkt, da die Vielfalt der Managementverfahren und die komplexen Zusammenhänge einfache Ursache-Wirkungs-Gefüge nicht erkennen ließen. Die aus Praktikabilitäts- und Kostengründen auf 30 Betriebe und 10 Kühe je Betrieb begrenzte Stichprobe hat dazu sicher nicht unwesentlich beigetragen. Somit konnten auch die aufgeworfenen Fragestellungen nur begrenzt beantwortet werden. Es ist deshalb zu vermuten, dass eine praktische Probengewinnung auf allen 106 Projektbetrieben einige Beziehungen hätte klarer hervortreten lassen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die augenblickliche Eutergesundheitssituation in ökologischen Milchviehherden noch erheblich durch Infektionen mit kuhassozierten Mikroorganismen und opportunistischen Hautbesiedlern bestimmt wird. Erst nach Überwindung dieses Status werden Beziehungen entlang der Kette Einstreu-Zitze-Milchdrüse sichtbarer hervortreten und auch die Eutergesundheitsentwicklung in ökologischen Milchviehbetrieben deutlicher bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

- Akineden O, Hassan AA, Schneider E, Usleber E (2008) Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *International J Food Microbiol* 124:211-216
- Aulrich K, Barth K (2008) Intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci and the effect on somatic cell counts in dairy goats. *Landbauforsch* 58:59-64

- Bey RF, Reneau JK, Farnsworth RJ (2002) The role of bedding management in udder health. Proc. NMC Annual Meeting, Orlando, 03.-06.02.2002, 45 – 55
- Bradley A, Green M (2006) An approach to the analysis and monitoring of clinical and subclinical mastitis data. Proc. XXIV World Buiatrics Congress, Nice, France, 15.-19.10.2006, id 505
- Capuco AV, Mein GA, Nickerson SC, Jack LJW, Wood DL, Bright SA, Aschenbrenner RA, Miller RH, Bitman J (1994) Influence of Pulsationless Milking on Teat Canal Keratin and Mastitis. *J Dairy Sci* 77:64-74
- Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches I.S, de Lencastre H (2001) Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol* 39:3099-3103
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) (2009): Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. 2. Auflage, Gießen
- Fregonesi JA, Leaver JD (2000) Behaviour, performance and health indicators of welfare for dairy cows housed in strawyard or cubicle systems. *Livestock Production Sci* 68:205-216
- Hamann J, Krömker V (1999) Haltungsbedingungen und Milchmengenleistung als mastitisprädisponierende Faktoren. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Tagung der Fachgruppe Milchhygiene, Hannover 27.-28.05.1999, Gießen DVG.
- Hauschild T, Stepanovic S (2008) Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *dnaJ* Gene. *J Clin Microbiol* 46:3875-3879
- Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Todhunter DA, Schoenberger PS, Hueston WD, Pritchard DE, Bowman GL, Heider LE, Brockett BL, Conrad HR (1989) Bacterial Counts in Bedding Materials Used on Nine Commercial Dairies. *J Dairy Sci* 72:250-258
- Hogan JS, Smith KL (1997) Bacteria counts in sawdust bedding. *J Dairy Sci* 80:1600-1605
- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD (1998) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol* 36:1083-1089
- Hughes J (1999) Bedding systems and mastitis. Proc. of the British Mastitis Conf., 73-78
- Kögler H (2005) Einfluss der Liegeboxengestaltung auf die Gelenk- und Eutergesundheit von Milchkühen. Gumpensteiner Bautagung HBLFA, 37-41
- Kristula MA, Rogers W, Hogan JS, Sabo M (2005) Comparison of Bacteria Populations in Clean and Recycled Sand used for Bedding in Dairy Facilities. *J Dairy Sci* 88:4317-4325
- Krömker V, Grabowski NT (2002) Risk factor analysis for mastitis caused by environmental pathogens in the environment of dairy herds. XXII WBC, Hannover, 18.-23.08.2002
- Krömker V, Pfannenschmidt F (2004) Zur Prävalenz und Inzidenz von Mastitiden in ökologisch wirtschaftenden Milchviehbetrieben in Niedersachsen. In: DVG (Hrsg.): 44. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Gießen, 311-315
- Krömker V, Paduch JH, Bormann A, Friedrich J, Zinke C (2010) Microbiological procedures for the assessment of bedding materials and the environmental mastitis risk. In: *Tierärztl. Praxis (G)* 38:73-78
- Manninen E, de Passillé AM, Rushen J, Norrington M, Saloniemi H (2002) Preferences of dairy cows kept in unheated buildings for different kind of cubicle flooring. *Appl Anim Behav Sci* 75:281-292
- McDonald WL, Fry BN, Deighton MA (2005) Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Vet Microbiol* 111:241-246

- Mielke H (1994) Physiologie der Laktation. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW (eds.) Euter- und Gesäugekrankheiten. Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart
- Norring M, Manninen E, de Passillé AM, Rushen J, Munksgaard L, Saloniemi H (2008) Effects of sand and straw bedding on the lying behavior, cleanliness, and hoof and hock injuries of dairy cows. *J Dairy Sci* 91:570-576
- Paduch JH, Krömker V (2011) Colonization of the teat skin and the teat canal by mastitis pathogens in dairy cattle. In: *Tierärztl. Praxis* 39 (G):71-76
- Peeler EJ, Green MJ, Fitzpatrick JL, Morgan KL, Green LE, (2000) Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. *J Dairy Sci* 83:2464-2472
- Schlegelova J, Dendis M, Benedik J, Babak V, Rysanek D (2003) *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. *Vet Microbiol* 4:327-334
- Seykora AJ, McDaniel BT (1985) Heritabilities of Teat Traits and their Relationships with Milk Yield, Somatic Cell Count, and Percent Two-Minute Milk. *J Dairy Sci* 68:2670-2683
- Smith KL, Hogan JS (1993) Environmental mastitis. *Vet Clin of North America: Food Animal Pract.* 9:489-498
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS (1985) Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention. *J Dairy Sci* 68:1531-1553
- Tilsala-Timisjarvi A, Forsman P, Alatosava T (2000) Bovine mastitis diagnosis from milk by a polymerase chain reaction-based method. *Milchwissenschaft* 55:488-492
- Tucker CB, Weary DM (2004) Bedding on geotextile mattresses: How much is needed to improve cow comfort? *J Dairy Sci* 87:2889-2895
- Watts JL, Salmon SA, Yancey RJ (1993) Use of modified Rambach agar to differentiate *Streptococcus uberis* from other mastitis streptococci. *J Dairy Sci* 76:1740-1743
- Yugueros J, Temprano A, Sanchez M, Luengo JM, Naharro G (2001) Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-Restriction fragment length polymorphism of gap gene. *J Clin Microbiol* 39:3693-3695
- Zdanowicz M, Shelford JA, Tucker CB, Weary DM, von Keyserlingk MAG (2004): Bacterial Populations on Teat Ends of Dairy Cows Housed in Free Stalls and Bedded with Either Sand or Sawdust. *J Dairy Sci* 87:1694-1701

7 Bisherige Veröffentlichungen zum Projekt

- Barth K, Murk K, Brinkmann J, March S, Volling O, Weiler M, Weiß M, Drerup C, Krömker V (2011) Einstreumangement in der Ökologischen Milchviehhaltung. *Landbauforsch SH* 346:41-48

Anhang

Datenaufnahmebogen, der beim 4. Betriebsbesuch auf den Projektbetrieben (BÖL FöKz 07OE012...22) verwendet wurde

EINSTREUMATERIALIEN UND –MANAGEMENT – ihre Bedeutung für die Entwicklung von Mastitiserregern und das Infektionsgeschehen

Betrieb: ID:

*Bitte hier **noch einmal ausfüllen**, da die Seiten 3 +4 + 15 **extra** nach Trenthorst gesendet werden müssen!*

*-> **Mehrfachnennungen möglich!** -> alle Fragen beziehen sich auf Einstreu der **MILCHKÜHE***

I. A) Einstreuart Milchkühe:

- Langstroh Geschnittenes Stroh gehäckseltes Stroh Strohmehl
 Kalk Streuwiesenaufwuchs Futterreste Heu
 Sägespane (standardisierte Ware) **oder** Sagespane (Mischware/ Sagewerksware)
 Sägemehl (standardisierte Ware) **oder** Sägemehl (Mischware/ Sagewerksware)
 sonstiges:.....
.....

I. B) Stroh

·Welche Getreidearten werden zur Strohgewinnung genutzt?

- Weizen Gerste Roggen Hafer Dinkel Triticale Sonstiges:

Ist das Stroh nur für den Eigenbedarf?

ja nein geschätzter Anteil (Verkauf in %):

Wird Stroh dazu gekauft? ja nein Anteil (in %):

davon : ökologisch:(%) konventionell:(%)

Welche Art von Stroh wird dazu gekauft? Getreideart:

*-> **Folgende Fragen und (II.) beziehen sich auf die Hauptherkunftsart des Strohs!**
Bitte auch - soweit bekannt – für Zukauf ausfüllen, wenn der größte Anteil Einstreu zugekauft wird!*

Wie waren die Witterungsbedingungen bei der Strohbergung 2009?

Nass Trocken Sonstiges:

Wie wurden Sie den Besatz des Strohs mit Zwiewuchs und/oder Fremdbesatz beurteilen
(Beurteilung durch den Landwirt)?

1 2 3 4 5

(1= gering, 3= mittel, 5= hoch)

Wie erfolgt die Ernte? Eigenleistung (%) Lohnarbeit
.....(%)

II. Strohbergung / Erntetechnik und Lagerung

In welcher Länge wird das Stroh gehäckselt bzw. gepresst (oder Schnittlänge angeben)?

ohne Häckseln (Langstroh) mit 5 Messern geschnitten (ca. 20-30cm)

mit 25 Messern (ca. 10-20 cm) mit 45 Messern (ca. 5-10 cm)

mit 56 Messern (unter 5 cm) unbekannt (geschätzte Länge):(cm)

Bemerkung

Wie wird das Stroh gepresst?

HD Ballen Quaderballen Rundballen lose sonstiges:
.....

Wie wird das Stroh gelagert?

Lagerhalle per Folie abgedeckt per Vlies abgedeckt

draußen (ohne Abdeckung) sonstiges:
.....

Gibt es eine zusätzliche Zwischenlagerung des Strohs, wenn ja wie sieht diese aus?

Lagerhalle per Folie abgedeckt per Vlies abgedeckt

draußen (ohne Abdeckung) sonstiges:
.....

Kopfraum der Liegeboxen

Wie lange wird das Stroh (oder Stroh-Kalk-Gemisch) zwischengelagert?
Tage

Wie wird das Stroh in den Stall eingebracht?

per Hand Strohverteilwagen mit Schneidwerk
 Strohverteilwagen ohne Schneidwerk sonstiges:

Häufigkeit des Einstreuens: pro Tag **oder**
 pro Woche

An welchen Wochentagen wird eingestreut?

Mo Di Mi Do Fr Sa So unregelmäßig

Tag des letzten Einstreuens: vor Tagen

Wie viel Stroh wird am Einstreutag eingestreut (geschätzte Menge)?

..... kg Einstreu je Kuh (am Einstreutag) **oder** kg gesamte Einstreumenge

Gibt es zusätzlich zum Einstreuen eine häufigere Boxenpflege (Kot entfernen)

ja, pro Tag oder pro Woche nein

Gibt es zusätzlich zum eigentlichen Einstreuen ein häufigeres Einbringen einer „hygienischen Deckschicht“, wenn ja, wie häufig?

ja, pro Tag oder pro Woche nein

Woraus besteht diese Schicht/ was wird bei der Boxenpflege „nachgestreut“?

Langstroh gehäckseltes Stroh Strohmehl

Kalk Kalk-/ Strohgemisch Sonstiges:

In welchen Abständen wird die Liegefläche gemistet?

nie halbjährlich monatlich wöchentlich täglich

sonstiges:

III.Kalk

Falls Kalk verwendet wird, wie ist das Stroh/ Kalkverhältnis?

nur Kalk Anteil Stroh / Kalk: : sonstiges:
.....

Kalkart:

Weißkalk (Löschkalk, Calciumhydroxid) Branntkalk (CaO) Gips (Calciumsulfat)

Düngekalk (konventioneller Kalk, Ackerkalk, Calciumcarbonat, Kohlensäurer Kalk)

Algenkalk sonstiges:

oder Produkt (z.B. „Desical“):

Wie ist der Vermahlungsgrad:

stark klumpig grob/ klumpig sandartig staubig/ pudrig

Bereitung der Kalk-/ Stroh Mischung:

(im Futtermischwagen) gemischt als Einzelkomponenten, getrennte Einstreu

IV. Streuwiesenaufwuchs

Woraus besteht die botanische Zusammensetzung des Streuwiesenaufwuchses?

Gräser % Kräuter %

sonstiges:

Einstreumanagement

(Beurteilung der jeweiligen Einstreumaterialien (auch der als hygienische Deckschicht eingebrachten Materialien) vor Einbringung in den Stall, Beurteilung durch Erheber vorzunehmen)

(a) Beurteilung der Strohfarbe:

gold-gelb beige fahl-grau sonstiges:.....

(b) Bewertung des Stroh Geruchs:

1 2 3 4 5

(Bewertung Geruch: von 1= frisch-strohig, 3= neutral bis 5= muffig-staubig)

(c) Verschmutzungsgrad des Strohs vor Einbringung in den Stall:

1 2 3 4 5

(1= gering, 3= mittel, 5= stark)

(d) Verschmutzungen des Strohs:

Steine Erde Tierkot (Ratten) Kadaver

andere Fremdpartikel:

(e) Beurteilung des Feuchtigkeitsgehaltes des Strohs vor Einbringung in den Stall:

nass feucht trocken sonstiges:

(f) Beurteilung des Feuchtigkeitsgehaltes bei **Holzeinstreu** oder des **Einstreukalks** vor Einbringung in den Stall (*Konsistenz durch Zusammenpressen*):

nass feucht (Klumpen) trocken (ohne Klumpen / lose)

sonstiges: