



Abschlussbericht

Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen

und

Teilprojekt: Mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärsubstrat

Forschungsprojekt-Nummer: 2810HS005

Laufzeit: 01.01.2012 bis 31.05.2014

Berichtszeitraum: 01.01.2012 bis 31.05.2014

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, BLE
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, BMEL

Zuwendungsempfänger: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Zusammenarbeit mit anderen Stellen: Dr. Christian Seyboldt
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Friedrich-Loeffler-Institut
Naumburger Str. 96 a
07743 Jena

Projektkoordinatorin: Prof. Dr. med. vet. Martina Hoedemaker, Ph.D.
Arbeitsbereich Bestandstiermedizin
Klinik für Rinder
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Mai 2014

**TiHo-Projektpartner:
Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover (RiKli):**

Prof. Dr. Martina Hoedemaker, Ph.D.
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567246
Fax: 0511-856827246
Email: Martina.Hoedemaker@tiho-hannover.de

Dr. Wolfgang Kehler
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567442
Fax: 0511-8567693
Email: Wolfgang.Kehler@tiho-hannover.de

Dr. Martin Höltershinken
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567408
Fax: 0511-8567693
Email: Martin.Hoeltershinken@tiho-hannover.de

Dr. Maren Feldmann
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567338
Fax: 0511-856827338
Email: Maren.Feldmann@tiho-hannover.de

Dr. Theresa Scheu
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567418
FAX: 0511-856827418
Email: Theresa.Scheu@tiho-hannover.de

Dr. Anika Wichern
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8657418
FAX: 0511-856827418
Email: Anika.Wichern@tiho-hannover.de

TA Frieder Gundling
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567411
FAX: 0511-856827411
Email: Frieder.Gundling@tiho-hannover.de

TA Phuong Do Duc
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567411
FAX: 0511-856827411
Email: Phuong.Do.Duc@tiho-hannover.de

Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit (LMQS):

Prof. Dr. Günter Klein
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567256
Fax: 0511-8567694
Email: Guenter.Klein@tiho-hannover.de

PD Dr. Amir Abdulmawjood
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567440
Fax: 0511-8567694
Email: Amir.Abdulmawjood@tiho-hannover.de

TÄ Svenja Fohler
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567555
FAX: 0511-8577694
Email: Svenja.Fohler@tiho-hannover.de

Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung (IBEI)

Prof. Dr. Lothar Kreienbrock
Bünteweg 2
30559 Hannover
Tel.: 0511-9537950
Fax: 0511-9537974
Email: Lothar.Kreienbrock@tiho-hannover.de

Dr. Amely Campe
Bünteweg 2
30559 Hannover
Tel.: 0511-9537961
Fax: 0511-9537974
Email: Amely.Campe@tiho-hannover.de

TÄ Katharina Charlotte Jensen
Bünteweg 2
30559 Hannover
Tel.: 0511-9537953
FAX: 0511-9537974
Email: Katharina.Jensen@tiho-hannover.de

Physiologisches Institut, Physio

Prof. Dr. Gerhard Breves
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567380
Fax: 0511-8567687
Email: Gerhard.Breves@tiho-hannover.de

Dr. Susanne Riede
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel.: 0511-8567294
Email: Susanne.Riede@tiho-hannover.de

Inhaltsverzeichnis

Teil 1: Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen (RiKli, LMQS, IBEI, Physio)

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	8
1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens	9
1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Einschlusskriterien für die Studie	14
2.2 Studienregion	15
2.3 Rekrutierung der Betriebe	16
2.4 Ablauf des Betriebsbesuchs	16
2.5 Probenverarbeitung	17
2.6 Probenuntersuchung	17
2.7 Herdenindices	18
2.8. Sonstige betriebsbezogene Datenerfassung	19
2.9 Clostridien-Diagnostik im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit (LMQS) der Tierärztlichen Hochschule	19
2.9.1 Direkter BoNT-Gen-Nachweis (A-F) nach Anreicherung mittels Singleplex Real Time-PCR	19
2.9.2 Identifikation von Clostridienspezies anhand ihres 16s rDNA-Gens	20
2.9.2.1 Kultivierung der Proben	20
2.9.2.2 Erfassung der Reinkulturen	20
2.9.2.3. 16s rDNA-Polymerasekettenreaktion	21
2.9.2.4 Sequenzierung und Auswertung	21
2.9.2.5 Auswertung der Speziesidentifizierung	21
2.9.3 Untersuchung von Clostridien-Isolaten mit matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)	22
2.9.4 Qualitätssicherung beim Erregernachweis	22
2.9.4.1 Qualitätssicherung in der Diagnostik allgemein	22
2.9.4.2 Qualitätssicherung in den Laboren des LMQS	22
2.9.4.3 Qualitätssicherung für das Real Time-PCR Verfahren	22
2.9.4.4 Qualitätssicherung für die Speziesidentifizierung mittels 16S rDNA Gen-Nachweis	23
2.10 Untersuchungen zur mikrobiellen Biota der Clostridia im Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover	24
2.10.1 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft der Clostridia mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	24
2.10.2 Auswertung der mikrobiellen Biota der Clostridia	25
2.11 Datenbank und Homepage	26
2.12 Plausibilitätsprüfungen	26
2.13 Weitere Maßnahmen zur Qualitätssicherung	26
2.14 Zusammenhang zwischen chronischem Krankheitsgeschehen und dem Auftreten von <i>C. botulinum</i>	29
2.15 Hypothesenprüfender Ansatz	29

2.16 Eindruck der Studientierärzte von den Betrieben (IBEI)	31
2.17 Nachbefragung (IBEI)	31
3. Ergebnisse	31
3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	31
3.1.1 Betriebsrekrutierung und –besuche	31
3.1.2 Angaben der Landwirte zu Erkrankungen und Laborbefunden	32
3.1.3 Ergebnisse der Clostridiendiagnostik (LMQS)	35
3.1.3.1 Botulinum-Neurotoxin-Gennachweis mittels Real Time-PCR	35
3.1.3.2 Speziesdifferenzierung mittels 16s rDNA-Genanalyse	38
3.1.3.3 Untersuchungen mit MALDI-TOF-MS	40
3.1.4 Mikrobielle Gemeinschaft der Clostridia	41
3.1.5 Zusammenhang zwischen chronischem Krankheitsgeschehen und dem Auftreten von <i>C. botulinum</i>	46
3.1.6 Einteilung der Tiere in Kontroll- und Verdachtstiere	48
3.1.7 Untersuchung der Einzeltiere	49
3.1.7.1 Klinische Untersuchung	49
3.1.7.2 Klinisch-chemische Untersuchung	50
3.1.7.3 Differentialdiagnosen	51
3.1.7.4 Klauenbefunde	52
3.1.8 Kontrolle der Fütterung-Rationsberechnung	53
3.1.9 Clostridien-Risikofaktoren	55
3.1.10 Hypthesenprüfender Ansatz zur Ermittlung mögliche Risikofaktoren für chronisches Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben	56
3.1.11 Eindruck der Studientierärzte von den Betrieben (IBEI)	58
3.1.12 Nachbefragung (IBEI)	59
3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	62
4. Zusammenfassung	65
5. Gegenüberstellung der ursprünglichen zu den tatsächlichen erreichten Zielen; weiterführenden Fragestellungen	67
6. Literaturverzeichnis	69
Anhang	71

Teil 2: Mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärsubstrat (Physio)

1. Einleitung	104
2. Zielstellung	104
3. Untersuchungsmaterial	104
4. Untersuchungsmethodik	105
4.1. Anzüchtungsverfahren	105
4.2 Nachweis Neurotoxin-bildender Clostridium-botulinum-Stämme	105
4.3 Ablesen der Platten und Isolierung relevanter Keime	105
4.4 Differenzierung der isolierten Kulturen	106
4.5 Quantitative Auswertung	106

5. Untersuchungsergebnisse	106
5.1 Gesamtkeimzahlen in Rohstoff- und Gärrestproben	106
5.2 Keimspektrum und seine Nachweishäufigkeit	107
5.3 <i>Clostridium</i> spp.	110
5.4 Toxinprüfung von <i>Clostridium-perfringens</i> -Stämmen	110
5.5 Neurotoxin von <i>Clostridium botulinum</i>	111
5.6 Salmonellen	112
5.7 Sonstige Erreger von Infektionskrankheiten	112
6. Zusammenfassung/Schlussfolgerungen	112

Teil 1: Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

In den letzten Jahren wurde vermehrt über ein chronisches Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben berichtet, welches mit einem chronisch-schleichenden Verfall der betroffenen Tiere bei nicht eindeutig definiertem Krankheitsbild einhergeht. Bei befallenen Tieren wurden der Erreger *Clostridium* (*C.*) *botulinum* bzw. seine Toxine nachgewiesen, so dass ein kausaler Zusammenhang zwischen toxinogenen Clostridien (insb. *C. botulinum*) in Verbindung mit anderen prädisponierenden Faktoren (Dysbiosen, Vorhandensein anderer Clostridien) und dem chronischen Krankheitsgeschehen postuliert wurde, welches als so genannter viszeraler Botulismus (sgVB) oder chronischer Botulismus (chrB) bezeichnet wird. *Clostridium botulinum* und andere Clostridien sind ubiquitär vorkommende Keime, die auch im Gastrointestinaltrakt gesunder Tiere anzutreffen sind, so dass unter Berücksichtigung der vielfältigen beschriebenen Krankheitssymptome sowie bisher widersprüchlicher Ergebnisse wissenschaftlicher Untersuchungen die Bedeutung von *C. botulinum* für die Ätiologie des Krankheitsbildes unklar ist. Es fehlen epidemiologische Untersuchungen, in denen betroffene/verdächtige Herden mit unverdächtigen Herden bzw. verdächtige Tiere mit unverdächtigen Tieren in Hinsicht auf das Vorkommen von *C. botulinum* und anderen Krankheitsursachen verglichen werden, so dass möglichen Kausalzusammenhängen nachgegangen werden kann.

Aufgrund der unspezifischen klinischen Symptomatik sowohl auf Betriebsebene als auch auf Einzeltierebene (1), der Tatsache, dass Clostridien einschließlich *C. botulinum* sowohl in kranken als auch in gesunden Tieren nachgewiesen werden können (2) und der Berücksichtigung zahlreicher Differentialdiagnosen, die für ein chronisches Krankheitsgeschehen in einem Milchviehbetrieb in Frage kommen (3), ist eine epidemiologische Studie im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie als Studiendesign für notwendig erachtet worden, um zu überprüfen, ob Beziehungen zwischen dem Nachweis von *C. botulinum* und dem chronischen Krankheitsgeschehen bestehen. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl in einem Verdachtsfallbetrieb als auch in einem Kontrollbetrieb klinisch unauffällige und chronisch kranke Tiere vorkommen, sollten die Untersuchungen auf Betriebsebene (Verdachtsfallbetrieb vs. Kontrollbetrieb) sowie auf Einzeltierebene (chronisch krankes Tier vs. gesundes Tier) durchgeführt werden. Wegen der Komplexität der Probleme war es auch notwendig, weitergehende Untersuchungen auf Betriebs- und Einzeltierebene durchzuführen, um mögliche Differentialdiagnosen und mögliche prädisponierende Faktoren zu berücksichtigen.

Mit dem durchgeführten Forschungsprojekt wurden daher folgende Ziele verfolgt:

- Erarbeitung einer Falldefinition eines verdächtigen Betriebes bzw. eines verdächtigen Tieres, die unter Berücksichtigung epidemiologischer Gesichtspunkte eine Aussage erlaubt, ob Beziehungen zwischen *C. botulinum* und dem Krankheitsgeschehen anzunehmen sind. Dies ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Durchführung einer Fall-Kontroll-Studie.
- Für den Fall des Vorliegens von Beziehungen zwischen *C. botulinum* und dem chronischen Krankheitsgeschehen im Bestand, sollte die Relevanz der jeweiligen klinischen Symptome für die Annahme „betroffener Bestand“ bzw. „betroffenes Tier“ mit geeigneten statistischen Methoden abgeklärt werden.

- Zusätzlich und im Falle eines Fehlens von Beziehungen zu *C.-botulinum*-Nachweisen sollten andere erhobene Merkmale und festgestellte Symptome ebenfalls auf ihre Bedeutung für das chronische Krankheitsgeschehen im Bestand untersucht werden.
- Neben dem Maus-Bioassay als „Goldstandard“ des Botulinum-Neurotoxin-Nachweises (BoNT) (FLI-Teilprojekt „Clostridiendiagnostik“) erfolgten zur weiteren ätiologischen Abklärung und Aufdeckung möglicher Kausalzusammenhänge ein molekularbiologischer Nachweis sowie eine Identifizierung und Genotypisierung von Clostridien-Isolaten nach einem vierstufigen Untersuchungsprogramm:
 - Stufe 1: Die aus dem Probenmaterial kulturell isolierten Clostridien-verdächtigen Isolate wurden identifiziert und basierend auf Genomsequenzen einer Spezies zugeordnet.
 - Stufe 2: Molekularbiologische Typisierung vorhandener toxinbildungsfähiger Gene (BoNT-Genvarianten) mittels PCR (Toxingene A-F). Hier erfolgte auch ein Vergleich mit einer weiteren im FLI-Teilprojekt entwickelten PCR-Methode.
 - Stufe 3: Untersuchung der *C.-botulinum*-Isolate auf Toxingenexpression mittels Real-Time Reverse Transkriptase-PCR.
 - Stufe 4 DNA-Typisierung aus den gewonnenen Isolaten verschiedenen Ursprungs (Futter, Tier, Umwelt) zur Untersuchung und Ermittlung der genetischen Verwandtschaft.
- Mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse sollten Untersuchungen zur Clostridiendiversität in Kot- und Pansensaftproben durchgeführt werden. Möglicherweise steht diese in Zusammenhang zu *C.-botulinum*-Nachweisen und unterscheidet sich als prädisponierender Faktor im Sinne einer postulierten Dysbiose zwischen Verdachtsbetrieben und Kontrollbetrieben bzw. zwischen Verdachtstieren und Kontrolltieren.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie sollten mögliche Assoziationen zwischen *C. botulinum* und einem chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben untersucht werden. Der Arbeitsplan umfasste dabei fünf Arbeitsschritte, die während des Versuchsvorhabens zeitlich eng verknüpft waren:

Arbeitsschritt 1: Falldefinition, Rekrutierung der Betriebe (RIKli, IBEI)

Hierzu gehörten folgende Arbeitsschritte:

- Erarbeitung von Kriterien, die ein Betrieb oder ein Tier erfüllen muss, um als Fall eingestuft zu werden.
- Festsetzung der Voraussetzungen, um an der Studie teilzunehmen
- Einarbeitung der Studientierärzte in die Einzeltier- und Bestandsuntersuchung sowie bestandsbezogene Auswertungen
- Ermittlung einer statistisch begründeten Anzahl von Betrieben und Einzeltieren
- Definition der Studienregion
- Einrichtung einer Homepage an der TiHo für das Projekt mit einem „Betriebs-Meldeformular“ und weiteren Informationen
- Rekrutierung der Betriebe nach initialer Kontaktaufnahme über ein Telefon-Interview und ggf. weiterer Telefonkontakte zur Überprüfung der Einschlusskriterien und Vereinbarung eines Besuchstermins

Arbeitsschritt 2: Bestandsuntersuchungen (RiKli)

Nach Rekrutierung der Verdachts- und Kontrollbetriebe wurden diese einmal aufgesucht und Bestands- und Tierdaten erhoben sowie Probenentnahmen durchgeführt.

- Die Bestandsuntersuchungen umfassten ein ausführliches Interview mit dem Betriebsleiter zur Erfassung von Informationen zur Fütterung, Haltung, Management und zielorientiert zur Erfassung von Risikofaktoren, die eine Belastung mit Clostridien (speziell *C. botulinum*) begünstigen. Hierzu wurden nach guter epidemiologischer Praxis entwickelte Fragebögen eingesetzt.
- Erfassung von Herdenindices zur Charakterisierung der Herdengesundheit und der Haltung
- Überprüfung des Haltungssystems
- Überprüfung der Fütterung und der Futtermittel
- Probenahme auf Betriebsebene: Wasser, silierte Futtermittel, Tankmilch

Arbeitsschritt 3: Einzeltieruntersuchungen (RiKli)

Die Einteilung in Verdachts- und Kontrolltiere (jeweils n=5) erfolgte nach eindeutigen Einschlusskriterien.

Bei den selektierten Tieren erfolgte immer eine gründliche klinische Untersuchung nach dem gleichen Schema, die auch eine eingehende neurologische Untersuchung mit einschloss.

Bei lahmen Tieren wurde zur Abklärung der Lahmheitsursache eine zusätzliche Untersuchung in einem Klauenstand durchgeführt, der sich ggf. eine tierärztliche Behandlung anschloss.

Von jedem Tier werden Blut-, Kot-, Pansensaft-, Harn- und Haarproben entnommen.

Arbeitsschritt 4: Laboruntersuchungen (RiKli, LMQS, Physio)

Die aus den untersuchten Beständen und Einzeltieren gewonnenen Proben wurden, sofern erforderlich aliquotiert und den jeweiligen Institutionen zur weiteren Analyse und Bearbeitung übermittelt. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

- Blutproben:
 - Klinische Chemie, Blutbild
 - Antikörpernachweis auf Chlamydien, Coxiellen und Lungenwürmer
- Kotproben:
 - Parasitologische Untersuchung
 - Untersuchung auf Para-Tbc und Salmonellen
 - Clostridiendiagnostik
- Pansensaft:
 - Clostridiendiagnostik
- Tankmilch:
 - Antikörpernachweis auf Leberegel
- Silierte Futtermittel:
 - Sensorische, inhaltliche (Grassilagen) und mikrobiologische Untersuchung
 - Clostridiendiagnostik
- Tränkwasser:
 - Mikrobiologische und chemische Untersuchung
 - Clostridiendiagnostik
- Haare: bisher Rückstellprobe: Schwermetalle, andere Toxine z.B. Dioxin
- Harn: bisher Rückstellprobe: Glyphosat-Untersuchung (ab Betrieb 41)

- Die Clostridiendiagnostik wurde sowohl im Teilprojekt „Clostridiendiagnostik“ des Friedrich-Löffler-Institut Jena (FLI-Jena; siehe separater Abschlussbericht) als auch von der TiHo durchgeführt. Folgende Untersuchungen werden vorgenommen:
- FLI-Jena: Kotproben
 - Direkter BoNT-Nachweis im Maus-Bioassay
 - Direkte und indirekte PCR (BoNT-Gen A-F)
- TiHo: Kot, Pansensaft, Tränkwasser, Silagen
 - Anaerobe Kultur: Direktausstrich und selektive Clostridienanreicherung
 - Speziesdifferenzierung der erhaltenen Clostridienisolate mittels 16S-rDNA-Sequenzanalyse
 - Indirekte PCR (BoNT-Gen A-F)
 - Real Time RT-PCR (BoNT-mRNA A-F)
 - MALDI-TOF
 - Kot- und Pansensaft (Stichprobe): SSCP

Arbeitsschritt 5: Datendokumentation und statistisch-epidemiologische Auswertung, Berichte für die Landwirte (IBEI, RiKli, LMQS, Physio)

Für diesen Arbeitsschritt erfolgte eine enge Zusammenarbeit vom IBEI, dem die zentrale Sammlung, Prüfung und Sicherung der im Verbund erhobenen Daten oblag, mit allen anderen Projektpartnern. Folgende Tätigkeiten wurden durchgeführt:

- Erstellung von 14 Fragen- und Erfassungsbögen mit Fertigstellung Ende Mai 2012 nach einer Pilotierungsphase.
- Schulung der Studentierärzte in der Datenerfassung und –eingabe sowie der Durchführung von Interviews unter Beachtung guter epidemiologischer Praxis.
- Einrichtung einer SQL-Datenbank, basierend auf den Fragen- und Erfassungsbögen, mit einem Web-Interface unter PHP auf einem virtuellen Server der TiHo. Die Datenbank wurde ergänzt durch Importfunktionen und Tabellenformulare für die Erfassung der Probenergebnisse aus acht verschiedenen Instituten. Es wurden personalisierte Zugänge für alle Projektpartner eingerichtet, über die der Export von aktuellen Daten in Form von Excel-Tabellen ermöglicht wurde. Die Daten wurden sukzessive durch die RiKli und IBEI in die Datenbank eingepflegt und mit Unterstützung der RiKli durch das IBEI auf Plausibilität geprüft. Implausible Werte wurden in den Exporten für die Projektpartner gekennzeichnet. Durch das IBEI erfolgte eine Prüfung der Betriebseinschlusskriterien mittels Daten von HI-Tier und der vit Verden sowie die Entwicklung und Umsetzung des Konzeptes zur Validierung der Betriebseinschlusskriterien.
- Betriebsindividuelle Auswertungen als Grundlage für den Bericht für den Landwirt (Herden-Scoring, Abteil-Bewertung, MLP-Daten) (IBEI).
- Erstellung von ausführlichen Berichten für die Landwirte über die jeweiligen Befunde auf Bestands- und Einzeltierebene mit Empfehlungen (RiKli).
- Systematische, explorative Deskription sämtlicher relevanter Einfluss- und Zielgrößen (IBEI, RiKli).
- Schon während der Datenerfassung hat das IBEI damit begonnen, die weiteren Auswertungsschritte in Abstimmung mit der RiKli zu planen. Zunächst wurde die zentrale Hypothese „Zusammenhang zwischen chronischem Krankheitsgeschehen und dem Auftreten von *C. botulinum*“ konkret definiert und geprüft. Darüber hinaus wurden weitere Hypothesen definiert, da neben der zentralen Fragestellung weitere Möglichkeiten für das Auftreten eines chronischen Krankheitsgeschehens abgeklärt werden mussten. Wegen der überaus großen Zahl

möglicher Ursachen hat das IBEI basierend auf einer Expertenbefragung der Partner aus der RiKli einen sogenannten hypothesenprüfenden analytischen Ansatz entwickelt, um Risikofaktoren für das Auftreten von chronischem Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben zu identifizieren, die nicht mit *C. botulinum* in ursächlichem Zusammenhang stehen. Darüber hinaus wurden die anderen Projektpartner bei ihren Auswertungen durch das IBEI unterstützt.

1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Unter dem Krankheitsbild „Botulismus“ versteht man klassischerweise eine Intoxikation bei Mensch und Tier mit einem hochpotenten Nervengift, welches durch *C. botulinum* produziert wird. Das so genannte Botulinum-Neurotoxin (BoNT) bindet an Nervenzellrezeptoren und hemmt die Reizübertragung an die Muskulatur durch eine Blockade der Neurotransmitterfreisetzung. Hierdurch kommt es zu Lähmungserscheinungen, die oft zum Tod führen.

Es sind acht serologisch verwandte Toxinformen bekannt (A, B, C_α, C_β, D, E, F, G). Während Toxintyp G keine Krankheitssymptome hervorzurufen scheint, sind die Toxintypen A, B, E und F als Auslöser des Botulismus beim Menschen beschrieben (Domingo et al. 2008). Die Toxintypen C und D werden vor allem für Erkrankungen bei Geflügel, Nerzen und Rindern verantwortlich gemacht.

Beim Menschen werden in der Literatur fünf verschiedenen Formen des Botulismus beschrieben (EFSA 2005), wobei zu beachten ist, dass neben der Intoxikation offensichtlich auch eine Toxikoinfektion möglich ist:

- klassischer Botulismus (durch Aufnahme geringster Mengen [ca. 1 µg] präformierten BoNT)
- Säuglingsbotulismus (Toxikoinfektion nach Besiedelung des Darmes mit *C. botulinum*, welche dort Toxin produzieren)
- Intestinaler Botulismus (Toxikoinfektion nach Dysbiose im Darm bei Erwachsenen)
- Wundbotulismus
- Inhalationsbotulismus

Beim Rind ist das Krankheitsbild des klassischen Botulismus seit langem bekannt. Die Diagnose beruht im Wesentlichen auf dem Vorhandensein einer typischen klinischen Symptomatik (eine von kranial nach kaudal fortschreitende schlaffe Lähmung der quergestreiften Muskulatur [Bewegungsapparat, Zungen-, Kau-, Schling-, Interkostal-, Zwerchfells- und Bauchmuskeln]). Schlüsselsymptome sind Festliegen, Schwanzlähmung, heraushängende Zunge aufgrund von Zungenlähmung, herabhängende Augenlider und Ohren, insgesamt herabgesetzter Muskeltonus. Ein Toxinnachweis am Tier gelingt beim klassischen Botulismus meistens nicht, da das BoNT bereits resorbiert oder an den Nervenendigungen gebunden, bzw. schon abgebaut ist (Stöber 2002). Neben dieser mehr akut verlaufenden Erkrankung wird auch ein protrahierter Verlauf beschrieben. Dieser ist durch eine von hinten nach vorne fortschreitende Muskelschwäche und Abmagerung mit möglicher Erholung gekennzeichnet. Die Symptome sind vermehrtes Liegen, Ruhelosigkeit, Inkoordination, Stolpern, Überköten, Ataxie, Muskelsteife, Nachhandparesen und Festliegen. Eine Zungenlähmung oder Kaustörung kommt nicht immer vor (Graham u. Schwarze 1921, Kehler 2010). Seit den 1990iger Jahren wird vermehrt von einem chronischen Krankheitsbild berichtet, welches mit vielfältigen z.T. unspezifischen klinischen Symptomen v.a. bei frischmelkenden hochleistenden Milchkühen einhergeht, und letztlich zu chronischem Siechtum oder Tod der betroffenen Tiere führt. Zu den genannten Symptomen gehören: herabgesetzte Milchproduktion, Paralysen, Festliegen, unspezifische Verdauungsstörungen mit Durchfall oder Obstipation, Lahmheiten mit vermehrtem Auftreten von Klauenrehe und Klauengeschwüren, Abmagerung, sensorische Ausfälle, aufgekrümmter Rücken, Kreislaufstörung, vermehrt klinische Mastitiden usw. (Schwagerick u. Böhnel

2001). Für den betroffenen Betrieb bedeutet dies erhebliche wirtschaftliche Verluste durch verringerte Milchproduktion und erhöhte Remontierungskosten. Da mit den gängigen Untersuchungsprotokollen bei Vorliegen von Bestandsproblemen bei oben genannten Symptomen (d.h. chronisches Krankheitsgeschehen) keine Klärung der Ursachen erzielt werden konnte, aber bei mikrobiologischen Untersuchungen BoNT im Gastrointestinaltrakt erkrankter oder gestorbener Tiere gefunden wurde, wurde eine Toxikoinfektion mit *C. botulinum* ähnlich dem beim erwachsenen Menschen beschriebenen intestinalen Botulismus vermutet und die Krankheits symptomatik mit der Toxinwirkung in Zusammenhang gebracht. Es entstand das Krankheitsbild des sgVB.

C. botulinum ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium und findet sich zusammen mit anderen Clostridienarten im Boden und in Silagen, da bei der Silagegewinnung eine Kontamination mit Erde nicht vollständig zu vermeiden ist. Es ist also davon auszugehen, dass Milchkühe mit dem Futter Clostridien sporen aufnehmen und diese entsprechend im Verdauungstrakt vorkommen. So wurde mittels PCR im Darm von Schlachtschweinen (Stallhaltung) ohne Symptome von Botulismus zu 86 % *C. botulinum* und im Darm von Schlachtrindern zu 74 % nachgewiesen (Dahlenborg et al. 2001, Dahlenborg et al. 2003). Unter welchen Bedingungen es zu einer Auskeimung der Sporen und zu einer Toxinproduktion im hinteren Verdauungstrakt kommt, ist nicht bekannt. Die vorgebrachten potentiell ursächlichen Faktoren (Dysbiose, Vorhandensein anderer Clostridien) sind z.T. wissenschaftlich noch nicht erwiesen. Die Tatsache, dass *C. botulinum* auch bei gesunden Tieren gefunden wird, erschwert die Interpretation positiver Befunde bei kranken Tieren.

Nach den bisherigen Hypothesen kann *C. botulinum* für die beschriebene Krankheits symptomatik verantwortlich sein, zumal neben den neurotoxischen Wirkungen auf die Skelettmuskulatur auch eine toxinbedingte herabgesetzte intestinale Ca-Resorption und Beeinflussung des vegetativen Nervensystems beschrieben wurden, die die beobachteten Krankheits symptome verursachen könnten (Böhnel et al. 2001).

Die ursächlichen Zusammenhänge könnten aber auch anders interpretiert werden. Ein vermehrtes Auftreten von Lahmheiten wird z.B. als ein Symptom beim sgVB genannt. Eine lahme Kuh hat ein verändertes Fressverhalten im Vergleich zu einer gesunden Kuh. Sie frisst nicht unbedingt weniger, aber dafür weniger häufig und dann größere Mengen an Futter. Dies könnte auch mit einer Verschiebung der Pansenflora und -fauna einhergehen und unter Umständen eine Vermehrung von Clostridien begünstigen. Ein Nachweis von Erregern oder Toxin wäre dann in der Kausalkette sekundär und hätte eher eine Markerfunktion für eine gestörte Funktion des Gastrointestinaltrakts als Folge der Lahmheit. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass durch das BoNT eine zusätzliche Gesundheitsschädigung eintritt. Von anderen Untersuchergruppen wird das chronische Krankheitsgeschehen, welches auch als „Faktorenerkrankung Milchviehherde“ bezeichnet wird, mit der Verfütterung veränderter Silagen in Verbindung gebracht (Eicken 2005). Der Nachweis, ob es unter diesen Bedingungen ebenfalls zu einer durchaus denkbaren Vermehrung von toxinogenen Clostridien im Tier selbst kommt, steht noch aus. Eine Klärung der Zusammenhänge und Auslöser ist aber notwendig, um geeignete Maßnahmen in einem Bestand mit einem chronischen Krankheitsgeschehen durchführen zu können.

Um zu überprüfen, ob Beziehungen zwischen dem Nachweis von *C. botulinum* und dem chronischen Krankheitsgeschehen bestehen, ist eine epidemiologische Studie in Sinne einer Fall-Kontroll-Studie sinnvoll. Diese Studie muss sowohl auf Betriebsebene als auch auf Einzeltierebene unter Berücksichtigung von möglichen Differentialdiagnosen für chronisches Krankheitsgeschehen und von postulierten Risikofaktoren durchgeführt werden.

Mit dieser Studie können zunächst Beziehungen zwischen *C.-botulinum*-Nachweis und ebenso wie weiteren potentiellen Faktoren und dem chronischen Krankheitsgeschehen untersucht werden. Die Klärung der Kausalität dieser Faktoren als Auslöser oder Verstärker des chronischen Krankheitsgeschehens erfordert jedoch weitergehende Untersuchungen.

Folgende Hypothesen werden getestet:

1. Es besteht eine Beziehung zwischen einem chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und dem Nachweis toxinogener *C.-botulinum*-Stämme.
2. Der Nachweis toxinogener *C.-botulinum*-Stämme bei chronisch kranken Tieren steht in Zusammenhang zu seiner Herkunft aus einem Fallbetrieb (d.h. ein Betrieb mit chronischem Krankheitsgeschehen).
3. Einfluss weiterer betrieblicher Faktoren auf das chronische Krankheitsgeschehen in (a) Betrieben sowie in (b) Tieren.

2. Material und Methoden

2.1 Einschlusskriterien für die Studie

Das Design der durchgeführten Studie ist eine Fall-Kontroll-Studie. Hierbei wurde ein chronisches Krankheitsgeschehen als Fall gewertet, der positive Nachweis von *C. botulinum* wurde dabei als Expositionsfaktor angesehen. Als wesentlicher erster Schritt mussten daher zunächst die Kriterien erarbeitet werden, die ein Betrieb bzw. ein Tier erfüllen musste, um als Fall bzw. Kontrolle eingestuft zu werden. Aufgrund der vielfältigen beschriebenen Symptome war zu Beginn nur eine Kategorisierung als Verdachtsfall möglich.

Die in die Studie aufzunehmenden Betriebe sollten der Milchleistungsprüfung angeschlossen sein und mehr als 30 laktierende Tiere haben, die in Boxenlaufställen untergebracht waren. Eine Impfung gegen *C. botulinum* durfte nicht durchgeführt werden oder musste mindestens 3 Jahre zurückliegen. Da in den letzten Jahren vermehrt mit einer polyvalenten Clostridienvakzine geimpft wurde, die besonders in Schleswig-Holstein eingesetzt wurde, wurden ebenfalls Betriebe zugelassen, die diese Impfung durchführten. So ergab sich ein 2:1-Fall-Kontroll-Design mit Fall-1- (gar nicht geimpft; F1), Fall-2- (nicht gegen Botulismus, aber gegen andere Clostridien geimpft; F2) und Kontroll-Betrieben (K).

Das Vorhandensein eines chronischen Krankheitsgeschehens wurde anhand folgender fünf Kriterien überprüft:

- Milchrückgang > 15 % über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten
- Todesfälle/Euthanasien > 5 % der Herde in den letzten 12 Monaten
- Abgangsrate (ohne Zuchtviehverkauf) > 35 % der Herde oder Erhöhung der Abgangsrate um 10 % oder mehr (z.B. von 28 % auf 39 %) in den letzten 12 Monaten
- Milchfieberartiges Festliegen > 10 % in den letzten 12 Monaten
- Erhöhte Krankheitsrate (subjektiv durch Landwirt und Hoftierarzt eingeschätzt)

Die im Rahmen der oben verwendeten Kriterien angegebenen Grenzen ergaben sich anhand einer Auswertung der entsprechenden Referenzdaten aus HI-Tier der vit Verden für die Populationen von Milchviehbetrieben aus Schleswig-Holstein und Niedersachsen. Hierzu wurden für das Jahr 2011 der mittlere Anteil Todesfälle (inkl. Euthanasien) sowie die mittlere Abgangsrate (ohne Exporte) durch die Mitarbeiter bei HI-Tier berechnet und an IBEI weitergeleitet. Für die durchschnittliche

Schwankung der Milchleistung wurden Lage- und Streuungsmaße über die verschiedenen Probemelktermine eines Prüfungsjahrs (2011) durch das vit berechnet. Um Aufschluss über eine mittlere, deutlich erniedrigte Milchleistung zu erhalten und natürliche Schwankungen zwischen den Probemelkterminen unberücksichtigt zu lassen, wurde die Verteilung des doppelten Variationskoeffizienten für die durchschnittliche Milchleistung berechnet. Die Ergebnisse dieser Auswertung legten die zuvor genannten Werte für die Einschlusskriterien nahe. Sämtliche Kriterien sind somit in der Population der Milchviehbetriebe objektiv definiert, so dass sich hieraus eine epidemiologisch abgesicherte Definition eines chronischen Krankheitsgeschehens ableiten lässt. Lediglich die Angaben zum erhöhten Krankheitsaufkommen entsprachen der subjektiven Einschätzung des Landwirtes, da aufgrund häufiger fehlender innerbetrieblicher Dokumentation keine verlässlichen Angaben zu bestimmten Erkrankungen vorlagen. Ein Verdachtsbetrieb musste drei von fünf der genannten Kriterien erfüllen, ein Kontrollbetrieb durfte keines der Kriterien erfüllen. Geplant war eine Stichprobengröße von jeweils $n=50$.

In jeder Betriebskategorie wurden Verdachts- und Kontrolltiere untersucht. Für den Einschluss als Verdachtstier galten die Hauptkriterien Abmagerung und Habitus eines chronisch kranken Tieres (Dirksen et al. 2012). Zusätzlich musste noch mindestens eines der beim chronisch-viszeralen Botulismus (Schwagerick u. Böhnel 2001) beschriebenen Symptome laut folgender Aufstellung vorhanden sein:

- Herabgesetzte Milchleistung im Vergleich zum Herdendurchschnitt um 20 %
- Bewegungsscore (nach Sprecher et al. 1997) ≥ 3
- Parese, Paralyse, Ataxie
- Diarrhoe, Obstipation
- Verhaltensänderung (träge), Gehschwäche
- Sensorische Störung (Lid, Ohr-, Hautreflexe herabgesetzt oder fehlend)
- Dyspnoe
- Kreislaufstörung (positiver Venenpuls)
- Bulbärparalyse
- Klauenrehe
- Aufgezogener Bauch

Ein Kontrolltier durfte keines der genannten Symptome aufweisen und nicht an einer akuten Erkrankung leiden. Der Bewegungsscore musste 1 betragen (d.h. keinerlei Abweichungen im Gangbild). Pro Betrieb wurden fünf Verdachts- und fünf Kontrolltiere untersucht. Diese Tiere wurden beim Herdenscreening (s.u.) vorselektiert. Gab es mehr als fünf Verdachts- oder Kontrolltiere erfolgte eine randomisierte Auswahl. In allen besuchten Betrieben konnte immer die erforderliche Anzahl an Einzeltieren identifiziert werden.

2.2 Studienregion

Als Studienregion wurde das Norddeutsche Tiefland ausgewählt, da nach Böhnel und Gessler (2012) hier die meisten Fälle von Botulismus (klassisch oder chronisch) aufgetreten sind. Außerdem war hier eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Betriebe hinsichtlich Management, Haltung und Fütterung zu erwarten, da die Milchvieh-haltenden Betriebe in dieser Region sich strukturell ähneln (Merle et al. 2012). Die Region umfasste die Bundesländer Schleswig-Holstein, Hamburg, Bremen, Niedersachsen und das nordwestliche Nordrhein-Westfalen begrenzt durch den Verlauf der BAB 2. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass die meisten Betriebe in den Bundesländern Niedersachsen (NI) und

Schleswig-Holstein (SH) lagen. Jeweils mehr als 10 Betriebe kamen in den Landkreisen NI-Cuxhaven, SH-Eckernförde, SH-Flensburg und SH-Steinburg vor.

Tab. 1 Verteilung der Betriebe (n [%])nach Bundesländern und Betriebskategorie (F1=Betrieb ohne Impfung, F2=Betrieb mit Clostridienimpfung, K=Kontrolle).

	Niedersachsen	Nordrhein- Westfalen	Schleswig- Holstein	Gesamt
K-Betriebe	24 (51,1)	2 (4,3)	21 (44,7)	47 (100,1)*
F1-Betriebe	23 (51,1)	3 (6,7)	19 (42,2)	45 (100,0)
F2-Betriebe	18 (38,3)	2 (4,3)	27 (57,4)	47 (100,0)
Gesamt	65	7	67	139

*aufgrund von Rundungsfehler

2.3 Rekrutierung der Betriebe

An der Studie interessierte Betriebsleiter konnten sich auf der Homepage (www.rinderbotulismus.de), telefonisch, per E-Mail, FAX oder per Post anmelden. Oft erfolgte eine Nennung durch Hoftierärzte und Berater. Weiterhin wurde von Herrn Dr. M. Heilemann (ehemals Referatsleiter Veterinärwesen, Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein) eine Liste von 82 vorselektierten potentiellen Verdachts- (n=53) und Kontrollbetrieben (n=29), deren Betriebsleiter eine Bereitschaft an der Studie teilzunehmen signalisiert haben, zur Verfügung gestellt, die kontinuierlich abgearbeitet wurde. Nach dem ersten telefonischen Kontakt mit dem Landwirt wurde ein Termin für ein ausführliches Telefoninterview vereinbart, in dem die Einschlusskriterien abgeprüft wurden. Eine Validierung der Angaben des Betriebsleiters basierte auf den Milchleistungs-Prüfungs-Daten (MLP-Daten) und den Angaben des Landwirtes bzw. betreuenden Tierarztes bezogen auf die durchschnittliche Herdengröße des letzten Jahres. Die Validierung erforderte weiterhin mit Hilfe der zur Verfügung gestellten MLP-Daten des letzten Jahres. Anhand derer konnten der Milchleistungsrückgang überprüft und die Tierzahl zur Ermittlung der Abgangsrate, % Todesfälle und % Festlieger ermittelt werden. In der Regel waren mehrere Kontaktaufnahmen notwendig, um die Eignung eines Betriebes für die Studie zu verifizieren. Im positiven Falle einer Eignung wurde ein Termin für den Betriebsbesuch vereinbart.

2.4 Ablauf des Betriebsbesuchs

Die Bestandsuntersuchungen wurden von vier erfahrenen Studententierärzten der RiKli durchgeführt, die sowohl in der Einzeltier- als auch in der Bestandsuntersuchung sowie in bestandsbezogenen Auswertungen (z.B. Rationskontrolle, Auswertung MLP-Daten) eine spezielle Schulung durchlaufen hatten. Zunächst erfolgte ein Rundgang durch den Betrieb zur Erfassung von Standorten, Ställen und Abteilen. Hier erfolgte die Erfassung von Kuh-Komfort- und Wiederkauindex, da zu diesem Zeitpunkt viele Tiere lagen und in den Boxen beurteilt werden konnten. Danach wurden die anderen Herdenindices wie Body Condition Scoring (BCS), Bewegungsscore, Hygienescore, Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte bei allen Tieren einer Herde ermittelt. In diesem Rahmen wurden potentielle Kontroll- und Verdachtstiere für die Einzeltieruntersuchung ausgewählt und markiert. Zeitgleich wurde durch einen Studententierarzt in einem Interview mit dem Landwirt ein Fragebogen zur Erfassung von Betriebscharakteristika, Haltung, Fütterung, Gesundheitsstatus der Herde, Management und Risikofaktoren für Clostridieninfektionen ausgefüllt.

Danach erfolgte eine Begehung mit dem Landwirt, in deren Verlauf alle relevanten Proben auf Betriebsebene gewonnen wurden. Die Silagen, die aktuell offen lagen und an die laktierenden Kühe und Trockensteher verfüttert wurden, wurden am Silo makroskopisch beurteilt und Silageproben gezogen. Weiterhin wurden die übrigen Futtermittel-Komponenten der Ration vor Ort sowie das vorgelegte Futter grobsinnlich beurteilt. Wasserproben wurden i.d.R. an der Zuleitung zum Stall entnommen. Außerdem wurde eine Milchprobe aus dem Milchtank entnommen.

In den einzelnen Stallabteilen wurden das Haltungssystem (Anzahl Liegeboxen und Fressplätze inklusive einer Vermessung von jeweils 4 Boxen bzw. von Liegeflächen) sowie die Stallhygiene und Stallluft beurteilt. Von in den Boxen liegenden wiederkauenden Kühen (n=5) wurde die Anzahl an Wiederkauschlägen pro Minute notiert.

Von den vorselektierten Verdachts- und Kontrolltieren wurden jeweils fünf Tiere pro Gruppe ausgewählt. Jedes Tier wurde einer standardisierten gründlichen klinischen Untersuchung inklusive einer neurologischen Untersuchung unterzogen (Dirksen et al. 2012) und die Befunde in einem dafür entwickelten Untersuchungsbogen notiert. Nach Beendigung der Untersuchung wurden Kotproben, Blutproben aus der V. jugularis (EDTA-Vollblut und zur Gewinnung von Serum) und Pansensaftproben mittels Pansensaftentnahmegesäß nach Geishauser gezogen. Des Weiteren wurden Harnproben (Spontan-Harn) gewonnen. Aus dem Schopfhaar wurden Haarproben entnommen. Verdachtstiere mit einem Bewegungsscore ≥ 3 wurden noch einer eingehenden Lahmheitsuntersuchung unterzogen. Hierzu gehörte auch das Verbringen in einen Klauenstand und systematische Untersuchung der Klauen mit Nachschneiden und ggf. tierärztlicher Behandlung. Nach Vorliegen sämtlicher primär relevanter Probenergebnisse, erhielten die teilnehmenden Landwirte etwa 6 bis 8 Wochen später ausführliche Berichte über die erhobenen Befunde mit Interpretation und Empfehlungen, die von den Studientierärzten angefertigt worden waren.

2.5 Probenverarbeitung

Die Weiterverarbeitung der Proben und Versand erfolgte durch die vier Studientierärzte. Nach der Entnahme der Proben wurden diese zunächst in Kühlbehältnisse verbracht. Nach der Rückkehr von der Bestandsausfahrt wurden die Blutproben zentrifugiert, das Serum abpipettiert und zusammen mit den Vollblutproben im Kühlschrank bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert und an das klinisch-chemische Labor der RiKli, das Institut für Parasitologie der TiHo und die IVD GmbH, Hannover weitergeleitet. Kot-, Pansensaft-, Tankmilch-, Silage- und Tränkwasserproben wurden über Nacht gekühlt gelagert und am darauffolgenden Tag zu den Untersuchungslaboren gebracht. Ein Kotprobenaliquot wurde tiefgefroren und en bloc mit anderen tiefgefrorenen Proben aus vorherigen Betriebsbesuchen an das FLI in Jena geschickt (1x pro Woche). Weitere Probenaliquote von Kot und Pansensaft wurden tiefgefroren und zur Physio weitergeleitet. Die Haarproben wurden bei Zimmertemperatur gelagert.

Bis auf die Silagen wurden von allen Probentypen Aliquots sowie die Harnproben bei -18 °C asserviert. Die Silageproben-Reste wurden gefriergetrocknet und dann bei -18 °C gelagert.

2.6 Probenuntersuchung

Die Untersuchung der Kot-, Pansensaft-, Silage- und Tränkwasserproben auf BoNT bzw. Clostridien im LMQS und dem Institut für Mikrobiologie ist unter Punkt 2.9 dieses Berichtes bzw. im Abschlussbericht des FLI-Jena (nur Kotproben) dargestellt.

Im klinisch-chemischen Labor der RiKli erfolgte die Untersuchung der Serumproben mittels validierter Routineverfahren auf folgende Parameter:

- Blutbild: Erythrozytengehalt, Hämatokrit, Hämoglobingehalt, MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin), Leukozytengehalt, Thrombozytengehalt
- Gehalt an Bilirubin, Gesamteiweiß, freien Fettsäuren, β -Hydroxybuttersäure, Cholesterin, Vitamin A, Vitamin E, Kupfer (Cu), Zink (Zn), Selen (Se)
- Aktivität der AST (Aspartataminotransferase), γ -GT (Glutamyltranspeptidase), GLDH (Glutamatdehydrogenase) → Enzyme zur Beurteilung des Leberstoffwechsels
- Glutaraldehydprobe (GAP)
- Kotproben: Untersuchung auf Magen-Darm-Würmer, Leberegel, Kokzidien, Lungenwürmer mittels Sedimentationsverfahren

Im Institut für Mikrobiologie der TiHo wurden Einzelkotproben kulturell auf Salmonellen und Poolproben jeweils von den fünf Kontroll- und Verdachtstieren kulturell auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) untersucht.

Im Institut für Parasitologie wurden Serumproben auf Lungenwurm-Antikörper (AK) und die Tankmilchprobe auf Leberegel-AK mittels ELISA untersucht.

In der IVD GmbH, Hannover wurden Serumproben auf AK gegen Chlamydien (KBR) und gegen Coxiellen (KBR) analysiert.

Im Institut für Tierernährung der TiHo wurden die Silageproben grobsinnlich und der pH-Wert sowie der Trockensubstanzgehalt bestimmt. Nur bei den Grassilagen wurden der Rohproteingehalt, der Reineiweißgehalt und der Aschegehalt bestimmt. Ein Aliquot der Silagen wurde an das Institut für Mikrobiologie weitergeleitet zur Bestimmung des aeroben Gesamtkeimgehalts mit Leitkeimbestimmung sowie des Gehalts an Schimmelpilzen und Hefen.

Im Institut für Futtermittel der LUFA Nord-West, Oldenburg wurden die Tränkwasserproben chemisch-physikalisch und mikrobiologisch untersucht. Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Mikrobiologie: Aerobe Gesamtkeimzahl bei 22 °C und 36 °C (ISO 6222), Coliforme Keime und *Escherichia (E.) coli* (Methode gem. TrinkwV. 2001; LUFA Nord-West AA 1/3 534)
- Grobsinnliche Beurteilung
- Chemie: Gesamt-Eisengehalt (Fe), elektr. Leitfähigkeit und daraus berechneter Salzgehalt, Nitrat, Nitrit, Ammonium, Oxidierbarkeit ($KMnO_4$), Chlorid, Sulfat, Phosphat

2.7 Herdenindices

Die Körperkondition wurde anhand der Abschätzung des subkutanen Fetts am hinteren Körperteil der Kuh adspektorisch und palpatorisch nach dem Score von Edmonson et al. (1989) bestimmt (BCS). Die Beurteilungsskala umfasste Scores von 1 (sehr mager) bis 5 (sehr fett) mit 0,25 Zwischenschritten. Mit Hilfe von akzeptierten Normbereichen für unterschiedliche Laktationsstadien erfolgte eine Einteilung der Tiere in unter-, normal- und überkonditioniert (DeKruif et al. 2007).

Der Bewegungsscore wurde nach Sprecher et al. (1997) auf einer Skala von 1 (nicht lahm) bis 5 (hochgradig lahm) anhand der Rückenlinie und des Gangbilds erhoben. Zur Beurteilung einer Herde werden folgende Werte angegeben: 1 > 70 %; 2 < 20 %; 3 < 10 %; 4 = 0 %; 5 = 0 %.

Der Hygienescore wurde anhand einer Beurteilung des Verschmutzungsgrades von Euter, Beine und der Flanke auf einer Skala von 1 (sauber) bis 4 (sehr schmutzig) nach Cook (2007) festgestellt. Die Richtwerte für eine Kombination von Score 3+4 lagen bei < 5 % für das Euter, < 25 % für die Beine und < 6,5 % für die Flanke.

Die Bewertung hervorstehender Knochenpunkte erfolgte nach Reubold (2003) unter Beurteilung von Hautveränderungen und entzündlichen Prozessen am Sprung-, Knie- und Karpalgelenk (Beurteilung

der Liegeflächenbeschaffenheit) und von Hautveränderungen am Hüfthöcker, Rücken, Nacken und seitlicher Bauchwand (Beurteilung der Steuerungselemente z.B. Boxenbegrenzung) auf einer Skala von 1 bis 5. Für beide Bereiche galten folgende Richtwerte: 1 (unauffällig), 2 (haarlose Stelle) und 3 (Verhornung, Schleimbeutelanschwellung ohne Entzündung) > 90 %; 4 (Hautverletzung, Entzündung, Schwellung) und 5 (wie 4 mit zusätzlicher Gelenkbeteiligung) < 10 %.

Der Kuh-Komfort-Index nach Nelson (1996) ist definiert als der Anteil der korrekt in einer Liegebox liegenden Tiere an der Anzahl der Tiere, die in irgendeiner Weise mit der Liegebox Kontakt haben (z.B. stehen, zur Hälfte in einer Box liegen etc.). Als Richtwert gilt ein Kuh-Komfort-Index von > 85 % der beurteilten Kühe.

Der Wiederkauindex nach Nelson (1996) ist definiert als der Anteil der Kühe in den Liegeboxen, die wiederkauen, an der Anzahl an Kühen, die Kontakt mit der Liegebox haben. Als Richtwert gilt ein Wiederkauindex von > 50 %.

2.8 Sonstige betriebsbezogene Datenerfassung

Zur Überprüfung der Fütterung wurden zum einen Informationen aus dem Betriebsfragebogen verwertet. Zum anderen erfolgte eine Rationsberechnung. Hierzu wurden vom Betriebsleiter die zurzeit gefütterten Rationen für die unterschiedlichen Tiergruppen (Laktierende, Trockensteher) abgefragt. Den Rationsberechnungen lagen, soweit vorhanden, Grundfuttermittelanalysen und Inhaltsstoffe von Kraftfuttermitteln, Ausgleichsfuttermitteln und Mineralfuttermitteln nach Herstellerinformation zugrunde. Anhand der vorhandenen Informationen wurden die Rationen mit dem Programm Futter-R der Fa. DSP-Agrosoft, Paretz, berechnet und Rationskennzahlen ermittelt. Die Berechnungen wurden jeweils für die Grobfuttermischung, die Grundration (Totale Mischration [TMR] bzw. aufgewertete Mischration [AMR] plus Kraftfutter bei durchschnittlicher Milchleistung pro Laktationsstadium) sowie Grundration bei maximaler Kraftfuttermenge vorgenommen (für Betriebe mit AMR). Für die Grundration waren die beiden letzteren Berechnungen notwendig, um Betriebe mit TMR und AMR zu vergleichen.

Die Milchhaltsstoffe (Fett %, Eiweiß %, Harnstoff, Fett/Eiweiß-Quotient [F/E]) aus den Daten der monatlichen Milchleistungsprüfung (MLP) wurden ebenfalls zur Auswertung im Rahmen der Fütterungskontrolle herangezogen.

2.9 Clostridien-Diagnostik im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit (LMQS) der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Im LMQS wurden die im Rahmen des Projektes gesammelten Proben mit zwei verschiedenen molekularbiologischen Verfahren untersucht. Das erste stellte der Toxingennachweis mittels Real Time-PCR und das zweite die Speziesidentifizierung anhand des 16S rDNA-Genabschnittes dar.

Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung eines Teils der Isolate mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie.

2.9.1 Direkter BoNT-Gen -Nachweis (A-F) nach Anreicherung mittels Singleplex Real Time-PCR

Die durch die Studientierärzte der RiKli gesammelten Kot- und Pansensaftproben von jeweils zehn Tieren pro Betrieb, sowie Futtermittel- und Wasserproben, wurden mit einem Real Time-PCR Verfahren mit Anreicherungsschritt auf das Vorhandensein von *Clostridium botulinum* mittels Toxingennachweis untersucht. Die Futtermittelproben setzten sich zusammen aus Silageproben, sonstigen Futtermitteln (Biertreber). Außerdem wurden zusätzlich Biogasanlagen-Gärresten (n = 5) untersucht.

Zunächst erfolgte eine Anreicherung, dann die Isolierung der DNA und zuletzt eine Real Time-PCR. Mit Hilfe der Singleplex Real Time-PCR sollten in den Proben vorkommende *C. botulinum*-Isolate anhand ihres Toxingens nachgewiesen werden (Kirchner et al. 2010). Da *C. botulinum* eine sehr heterogene Gruppe darstellt, musste für jede Probe und jedes der sechs möglichen Toxingene (A, B, C, D, E, und F) jeweils eine eigene Singleplex Real Time-PCR durchgeführt werden. Ebenso wurde für jede Probe eine Amplifikationskontrolle mitgeführt, welche die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren und damit potentiell falsch negative Ergebnisse ausschließen sollte.

2.9.2 Identifikation von Clostridienspezies anhand ihres 16S rDNA Gens

Die Untersuchung der verschiedenen vorkommenden Clostridienspezies erfolgte mittels 16S rDNA-Gennachweis. Dies ist ein seit Jahren anerkanntes molekularbiologisches Standardverfahren zur Identifizierung von Bakterienspezies. In etlichen Publikationen wird dieses Verfahren als Goldstandard zur Identifizierung von unbekanntem Bakterienspezies genannt (CLSI).

Es wurden zunächst im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Clostridien-Reinkulturen erstellt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten im LMQS. Zunächst erfolgte hier die Isolation der DNA. Der gesuchte Genabschnitt wurde folgend mittels PCR amplifiziert und die Proben sequenziert (Eurofins MWG Operon). Die resultierenden Sequenzdaten wurden be- und ausgewertet und im letzten Schritt die Spezies mittels Sequenzvergleich in zwei Gendatenbanken identifiziert.

2.9.2.1 Kultivierung der Proben

Kot und Pansensaft wurden im Institut für Mikrobiologie direkt auf einem Schaedler-Agar ausgestrichen und für 48 h bei 37°C anaerob bebrütet. Des Weiteren wurde ein Teil der Probe in eine Leberbouillon überführt und für zehn Minuten einer Temperatur von 80°C im Wasserbad ausgesetzt. Diese Sporenselktion wurde durch Abkühlen der Bouillon im Eisbad beendet. Die beimpfte Leberbouillon wurde ebenfalls 48 Stunden bei 37°C anaerob bebrütet und danach auf feste Nährböden (Clostridium-Selektivagar und Schaedler-Agar) ausgestrichen, die wiederum für 48 Stunden bei 37°C anaerob bebrütet wurden.

Alle Kulturen wurden hinsichtlich des Wachstums von *Clostridium*-verdächtigen Bakterien beurteilt. Solche Kolonien wurden in Reinkultur überführt. Gleichzeitig wurde überprüft, ob die überführten Bakterien bei normaler Atmosphäre wachsen konnten (aerobe Kontrolle). Außerdem wurde von einzelnen Clostridiumspezies-verdächtigen Isolaten eine Färbung nach Gram durchgeführt und diese beurteilt.

Alle grampositiven/gramlabilen z.T auch gramnegativen Stäbchen, die aerob nicht wuchsen, wurden zur weiteren Differenzierung an LMQS weitergeleitet.

2.9.2.2 Erfassung der Reinkulturen

Die weitere Untersuchung der durch das Institut für Mikrobiologie hergestellten Reinkulturen erfolgte im LMQS. Zunächst wurde allen Agarplatten eine fortlaufende laborinterne Nummer zugeteilt und diese inklusive der Projektnummer und des Lieferdatums elektronisch erfasst. Zur Qualitätssicherung und besseren Rückverfolgbarkeit wurden von allen Agarplatten Videoaufnahmen gemacht, auf denen die Projektnummer, die laborinterne Nummer des Institutes für Mikrobiologie und die interne Nummer des LMQS erkennbar waren. Diese Videoaufnahmen wurden im Rahmen der Labordokumentation archiviert.

2.9.2.3 16S rDNA- Polymerasekettenreaktion

Die Speziesidentifizierung erfolgte durch Amplifizierung des 16S rDNA-Genabschnittes und anschließende Sequenzierung. Die hierfür ausgewählten Primer waren universell für alle bekannten Bakterienarten nutzbar, so dass sichergestellt war, dass auch „nicht-Clostridienspezies“ identifiziert worden wären.

2.9.2.4 Sequenzierung und Auswertung

Die Amplifikate der 16S PCR wurden sequenziert (Eurofins MWG Operon). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte durch Abgleich der Proben-Sequenz mit zwei Gendatenbanken.

Die erste Datenbank, die ausgewählt wurde, war NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA). Diese ist eine seit Jahren international anerkannte Gendatenbank, in der weltweit die meisten 16S rDNA-Sequenzen hinterlegt sind.

Als zweite Datenbank wurde SepsiTTMBlast ausgewählt. Diese beinhaltet 7.042 qualitätsgeprüfte, vollständige 16S rDNA-Gensequenzen von kultivierten Referenzstämmen der beiden Domänen Bacteria und Archaea.

Jede Sequenz wurde aus einer in Bionumerics (Version 7.2) erstellten Access-Datenbank exportiert und auf den Onlineplattformen der beiden Datenbanken abgeglichen.

Als sichere Identifizierung galten alle Ergebnisse mit einer Sequenzidentität über 97 Prozent. Da SepsiTTMBlast nur Ergebnisse bis zu einer Sequenzidentität von mindestens 97 Prozent liefert und eine eindeutige Identifizierung unterhalb dieser Grenze nicht mehr möglich ist, wurden diese Ergebnisse als nicht identifizierbar auf Grund nicht vorliegender Referenzsequenzen gewertet. Das von der NCBI-Datenbank herausgegebene wahrscheinlichste Ergebnis wurde dennoch für jedes Isolat dokumentiert.

Aus der Kombination beider Datenbanken ergab sich bei übereinstimmenden Datenbankergebnissen eine sehr sichere richtige Speziesidentifizierung. Entsprachen sich die Ergebnisse nicht, so wurde die Identifizierung mit der höheren Sequenzidentität herangezogen.

Da einige Clostridienspezies sehr eng miteinander verwandt sind und sich in ihrer 16S rDNA-Gensequenz nur geringfügig unterscheiden, wurden alle relevanten Ergebnisse durch zusätzliche Untersuchung mittels Real Time-PCR überprüft.

Hierzu gehörte eine Testung aller *C.-sporogenes*-verdächtigen Isolate auf das Vorliegen der BoNT-Gene Typ A und B sowie Testung aller *C.-novyi*-verdächtigen Isolate auf das Vorhandensein der BoNT-Toxingene Typ C oder D. Ebenso wurden alle *C.-baratii*-verdächtigen Isolate mittels Real Time-PCR auf das Vorliegen des BoNT-Gens F und alle *C.-butyricum*-verdächtigen Isolate auf das Vorhandensein des BoNT-Typ E-Gens untersucht.

2.9.2.5 Auswertung der Speziesidentifizierung

Die Ergebnisse des Datenbankabgleiches wurden in Excel-Tabellen dokumentiert. Diese Tabellen wurden in das Statistik-Programm SAS importiert. Alle Ergebnisse, welche hier eine geringere Identität als 97 % in beiden Datenbanken hatten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Ebenso erfolgte ein Ausschluss von Ergebnissen, bei denen Sequenzen von weniger als 1.000 Basenpaaren abgeglichen wurden.

Mit Hilfe des SAS Programms wurde eine Deskription geschichtet nach Fall-1-, Fall-2- und Kontroll-Betrieben angefertigt. Dieses erfolgte auch innerhalb der jeweiligen Betriebsform nach Fall- und Kontroll-Tieren. Ebenso wurden die pro Betrieb erhaltenen Isolate betrachtet.

2.9.3 Untersuchung von Clostridien-Isolaten mit matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Ein Teil der innerhalb des Projektes erhaltenen Isolate wurde mittels MALDI-TOF-MS identifiziert, um die Eignung dieser Technologie für die Identifizierung von veterinärmedizinisch relevanten Clostridienspezies zu untersuchen. Die Identifizierung von Bakterienspezies mittels MALDI-Technologie beruht auf unterschiedlichen ribosomalen Proteinzusammensetzungen verschiedener bakterieller Spezies. Diese stellen sich als speziesspezifische Massenspektren dar und erlauben somit eine Identifizierung auf Speziesebene.

2.9.4 Qualitätssicherung beim Erregernachweis

2.9.4.1 Qualitätssicherung in der Diagnostik allgemein

Im Rahmen des Projektes sind mehrere Stufen der Kontrolle und Qualitätssicherung der Untersuchungen eingeplant und durchgeführt worden.

Im Bereich der Botulinum-Diagnostik ist die wohl wichtigste Qualitätssicherungsmaßnahme die Untersuchung der Proben in drei verschiedenen Instituten (LMQS und Institut für Mikrobiologie der TiHo sowie das FLI-Jena) und mit drei verschiedenen Nachweisverfahren (Toxinnachweis mittels Maus-Bioassay, Real Time-PCR zum Nachweis der verschiedenen BoNT-Gene und Speziesidentifizierung mittels 16S rDNA-Genanalyse sowie einer zusätzlich durchgeführten konventionellen PCR im FLI Jena).

Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung eines Teils der Isolate mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie.

2.9.4.2 Qualitätssicherung in den Laboren des LMQS

Sämtliche Arbeitsabläufe im LMQS wurden gemäß Empfehlungen des Clinical and Laboratory Standards Institute entsprechend durchgeführt. So gab es zum Beispiel eine strikte räumliche Trennung von Arbeitsschritten vor und nach den durchgeführten PCRs. Auch das Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen während der PCR-Läufe gehörte zu den geforderten Qualitätssicherungsmaßnahmen.

Für alle Arbeitsschritte sind detaillierte Arbeitsanweisungen und für die Herstellung von Lösungen Protokolle angefertigt worden. Jeder am Projekt beteiligte Mitarbeiter wurde vor einem selbständigen Arbeiten in den Laboren ausführlich in die Arbeitsabläufe eingewiesen.

Jede Probe wurde bei Eingang elektronisch erfasst. Die gesamte isolierte DNA wurde archiviert. Alle Resultate sind sowohl in elektronischer Form als auch als Ausdrucke vorhanden. Eine regelmäßige Datensicherung aller Dokumente und Dateien ist durchgeführt worden.

2.9.4.3 Qualitätssicherung für das Real Time-PCR Verfahren

Die Anreicherung der Proben erfolgte in einem standardisiert hergestellten Medium (Reinforced Clostridial Medium). Die genutzte Anaerobierwerkbank wurde den Empfehlungen entsprechend gewartet, so dass eine ideale Wachstumsatmosphäre für die Keime über die gesamte Projektdauer gesichert war.

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Stoolkit der Firma Quiagen. Dieses Kit stellt den Standard für die Isolierung von DNA aus Kotproben tierischen Ursprungs dar (Diridi et al. 2009) und wird ebenso vom Nationalen Referenzlabor (FLI) empfohlen. Dieses Kit zeichnet sich besonders durch die sichere Handhabung zur Isolierung von DNA von grampositiven Bakterien aus. Der vorrangige Grund für die

Wahl dieses Kits war die Fähigkeit, sehr zuverlässig PCR-Inhibitoren zu binden, welche in den untersuchten Umweltproben bei PCR-Reaktionen große Probleme machen können.

Die DNA jeder Probe ist archiviert worden, so dass sie auch für zukünftige Untersuchungen zur Verfügung steht.

Bei jedem Real Time-PCR-Lauf sind Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt worden und die Ergebnisse wurden nur gewertet, wenn beide Kontrollen einen erfolgreichen Lauf bestätigten. Zusätzlich ist eine Amplifikationskontrolle für jede Probe durchgeführt worden. So sollte sichergestellt werden, dass durch den Ausschluss der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren keine falsch negativen Ergebnisse erzeugt wurden. Alle Proben, die sich hier auffällig zeigten, wurden wiederholt und erneut auf alle sechs Neurotoxin-Genvarianten getestet.

Bei Proben aus den Betrieben, die sich in der Real Time-PCR als BoNT-Gen-positiv herausstellten, wurde zusätzlich die DNA aus den im Institut für Mikrobiologie hergestellten Leberbouillon-Kulturen isoliert und anschließend auf die sechs *C.-botulinum*-Toxingenvarianten getestet.

Für die ersten 30 Betriebe sind immer sowohl die DNA aus der Anreicherung im Reinforced Clostridial Medium als auch die DNA aus der Leberbouillon getestet worden. Dabei zeigte sich, dass die Untersuchung beider Kulturmedien nicht sensitiver war als eine alleinige Testung des angereicherten RCM-Mediums.

2.9.4.4 Qualitätssicherung für die Speziesidentifizierung mittels 16S rDNA-Gen-Nachweis

Eine wichtige Maßnahme war hier das Erstellen von Videos aller erhaltenen Reinkulturen. Da die Proben durch die Hände mehrerer Institute gingen und mehrfach interne Labornummern vergeben werden mussten, trug dies dazu bei, jede einzelne Probe eindeutig und einfach nachträglich rückverfolgen zu können.

Alle Reinkulturen wurden aufbewahrt bis ein qualitativ hochwertiges Sequenzierungsergebnis des Isolates vorlag. Ebenso ist die gesamte isolierte DNA aller 8.728 Isolate archiviert worden, so dass die Möglichkeit besteht, weitere Untersuchungen anzuschließen.

Bei einem Teil der Proben musste bis zu sechsmal eine PCR durchgeführt werden, um Sequenzdaten guter Qualität zu erzielen.

Die Sequenzierungstechnik wurde unter anderem ausgewählt, weil die Arbeitsschritte hier nahezu vollautomatisiert ablaufen und somit die Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Probenbearbeitung deutlich verringert wird.

Diese Sequenzen wurden in das Programm Bionumerics importiert. Alle Sequenzen, die die geforderten Güteparameter nicht erfüllten, wurden nicht für die weitere Auswertung genutzt. Die Sequenzierung wurde bis zu sechsmal wiederholt, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

Die Ergebnisse der Abgleiche der Sequenzen mit den beiden Datenbanken sind nach den Standards des Clinical and Laboratory Standards Institute ausgewertet worden. Hierzu gehörte, dass nur Identifikationen mit einer Wahrscheinlichkeit von über 97 % in die Auswertung mit einbezogen wurden. Mit dem Grenzwert von einer Mindestlänge der Sequenz von 1.000 Basenpaaren wurden die Standards sogar deutlich höher als die geforderten mindestens 300 Basenpaare angesetzt.

Da die 16S PCR zwar den Goldstandard für die molekularbiologische Identifizierung unbekannter Bakterienspezies darstellt, aber auch hier keine 100-prozentige Unterscheidung besonders nah verwandter Spezies gemacht werden kann, erfolgte bei relevanten Ergebnissen eine zusätzliche Untersuchung mittels Real Time-PCR. Hierzu zählte die Testung aller *C.-sporogenes*-, *-baratii*-, *-butyricum*- und *-novyi*-verdächtigen Isolate auf das Vorliegen der BoNT-Gene der jeweils besonders eng verwandten Spezies.

Die Verwendung von sowohl Forward- als auch Reverseprimer für die 16S rDNA-Genanalyse wird vom Clinical and Laboratory Standards Institute empfohlen, um die Differenzierung nah verwandter Spezies zu erleichtern.

Die anschließende statistische Analyse der Ergebnisse der Speziesidentifizierung erfolgte mit SAS (Version 9.3).

2.10 Untersuchungen zur mikrobiellen Biota der Clostridia im Physio

In diesem Teilprojekt erfolgte die qualitative Untersuchung von Kot- und Pansensaftproben aus drei verschiedenen Gruppen von Milchviehbetrieben (fünf Kontrollbetriebe, fünf Fall-1-Betriebe, fünf Fall-2-Betriebe) mit je zehn Tieren pro Betrieb (fünf Verdachtstiere, fünf Kontrolltiere) hinsichtlich der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia*. Das Ziel war es, zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem beschriebenen chronischen Krankheitsgeschehen und der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* besteht.

2.10.1 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft der Clostridia mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Die Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* wurde für 15 Betriebe mit Pansensaft- und Kotproben von je zehn Tieren/Betrieb durchgeführt. Die Pansensaftproben wurden mit Hilfe einer Schlundsonde direkt entnommen, die Kotproben wurden aus dem Dickdarm entnommen. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Zur Anreicherung der Mikroorganismen wurde eine Differentialzentrifugation der Proben durchgeführt (Brandt u. Rohr 1981). Dafür wurden 5 g Kot mit 30 ml 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Von den Pansensaftproben wurden 50 ml für die Zentrifugation eingesetzt. Zunächst wurden die Proben 5 min bei $600 \times g$ zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Es folgten vier Schritte für 20 min bei $27.500 \times g$. Das resultierende Pellet wurde jedes Mal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet aus den Pansensaftproben in 2 ml und aus den Kotproben in 4 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde in flüssigen Stickstoff portionsweise eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die genomische DNA wurde aus 500 μl der Mikroorganismen-Suspension isoliert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei $13.000 \times g$ und 4°C wurde das Pellet in 600 μl 1x TEN (Tris-EDTA-NaCl) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in zwei Schritten (40 s bei $6,0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, 40 s bei $4,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) mechanisch mittels *bead beating* im FastPrep Instrument (MP Biomedicals, D-Heidelberg). Nach dem Abzentrifugieren der *beads* bei $13.000 \times g$ und 4°C für 15 min, wurden zum Überstand 50 μl Lysozym-Lösung ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) und 10 μl RNase A gegeben. Die Proben wurden 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 15 μl 50°C warmer SDS-Lösung (20 %) und 10 μl Proteinase K-Lösung ($20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), folgte im Anschluss ein weiterer Inkubationsschritt im Wasserbad bei gleicher Temperatur für 1 h. 125 μl NaCl-Lösung (4 M) und 50 μl CTAB (Cetyltrimethylammonium-bromid; 50°C warm) wurden hinzugefügt, die Proben gemischt und 10 min bei 65°C im Wasserbad erhitzt. Zur Fällung der denaturierten Proteine wurden die Proben mit 780 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, durch Invertieren vorsichtig vermischt und bei $13.000 \times g$ und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einem weiteren Reinigungsschritt mit 780 μl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) unterzogen. Nach wiederholter Zentrifugation ($13.000 \times g$, 4°C , 10 min) wurde erneut die obere Phase abgenommen. Die DNA wurde dann aufgereinigt mit dem peqGOLD Tissue DNA Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH) und in 20 μl

eluiert. Die genomische DNA wurde auf 25 ng/ μ l verdünnt. Es wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, welche spezifisch für die Gruppe „Clostridia Cluster I“ waren: forward primer P930 (GTG AAA TGC GTA GAG ATT AGG AA) und reverse primer P932-Ph (GAT (C/T)(C/T)G CGA TTA CTA G(C/T)A ACT) (Le Bourhis et al. 2005). Der reverse primer war phosphoryliert am 5' Ende für den nachfolgenden Einzelstrangverdau. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 50 μ l mit einer finalen Konzentration von 1x PCR Puffer; forward und reverse Primer 50 μ M; HotStar HiFidelity DNA Polymerase 2.5 U/ μ l (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Die PCR-Bedingungen waren: Initiale Denaturierung (5 min bei 95°C), gefolgt von 25 Zyklen der Denaturierung bei 94°C für 60 s, Annealing bei 58°C für 50 s und Elongation bei 72°C für 70 s, finale Elongation bei 72°C für 10 min. Die Produktgröße betrug 665 bp. Für den Einzelstrangverdau wurde das PCR-Produkt auf eine Konzentration von 400 ng in 35,5 μ l verdünnt. Für den Reaktionsansatz wurden 4,0 μ l 10x λ -Exonuclease-Puffer und 0,5 μ l λ -Exonuclease (5000 U·ml⁻¹) zu 35,5 μ l dsDNA gegeben. Die Proben wurden gut vermischt und dann 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung mit dem Kit MinElute nach Angaben des Herstellers (Qiagen, D-Hilden). Die einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde mit Loading Dye versetzt. Es wurden 7 μ l der Proben auf das 0,625 %-ige Polyacrylamid-Gel (7,813 ml MDE-Gel, 2,5 ml 10x TBE, 14,69 ml Aq. dest., 10 μ l TEMED, 25 μ l APS (40 %)) aufgetragen. Die Gelelektrophorese der ssDNA erfolgte bei 20 °C und 300 V für 30 h. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Silbernitrat angefärbt. Dazu wurde das Gel 30 min in 10 %-iger Essigsäure auf einem Schüttler bei 52 rpm (Typ 3017, GFL GmbH, D-30938 Burgwedel) inkubiert. Nach dem dreimaligen Auswaschen der Essigsäure mit Aq. bidest. für jeweils 5 min, wurde das Gel 30 min mit 500 ml Silbernitrat-Lösung (0,5 g Silbernitrat, 750 μ l Formaldehyd (37%), Aq. dest. ad 500 ml) im Dunkeln auf dem Schüttler gefärbt. Vor der Zugabe von 600 ml Entwicklerlösung (33,75 g Natriumcarbonat-Decahydrat, 1,2 ml Formaldehyd (37 %), 600 μ l Natriumthiosulfat (0,2%), Aq. dest. ad 600 ml) wurde das Gel ca. 1 min mit Aq. bidest. gespült. Der Entwicklungsschritt bestand anschließend aus zwei Phasen. Bei Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde das Gel 5 min in 10 %-iger Essigsäure fixiert und anschließend mit Aq. bidest. gespült. Über Nacht wurden die SSCP-Gele unter dem Abzug getrocknet. Zur Auswertung wurden sie mit Hilfe eines Durchlichtscanners (ScanMaker i800, Mikrotek, D-47877 Willich) digitalisiert.

2.10.2 Auswertung der mikrobiellen Biota der *Clostridia*

Unter Verwendung der Software GelComparII (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) konnten die Bandenmuster verglichen und auf Homologien untersucht werden. Zunächst wurde mit dem „rolling disk“-Mechanismus eine Subtraktion des Hintergrundes vorgenommen. Anschließend wurde eine Clusteranalyse der densitometrischen Kurven der Spuren durchgeführt. Das Ergebnis wurde in Form eines Dendrogramms dargestellt, indem die *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA) unter Verwendung des Pearson *product-moment* Korrelations-Koeffizienten angewendet wurde. Die Bandenmuster der Spuren werden dabei aufgrund des Grads ihrer Ähnlichkeiten [%] verglichen und gruppiert (Clusterbildung). Die Daten der Ähnlichkeitsmatrizes wurden in die gesamte Datenbank eingefügt.

Die statistische Auswertung der SSCP-Profile wurde basierend auf der Ähnlichkeitsmatrix der Clusteranalyse vorgenommen. Es wurde der Permutationstest zur Identifizierung von Effekten zwischen Verdachts- und Kontrolltieren innerhalb eines Betriebes angewendet (n = 5 Tiere). Verwendet wurde dafür das Programm Permanova (Anderson 2001, Anderson u. Robinson 2003). Das Signifikanzniveau wurde auf p < 0,05 festgesetzt.

2.11 Datenbank und Homepage

Zur Dokumentation aller im Verbund erhobenen Daten wurde durch das IBEI eine gemeinsam genutzte, relationale SQL-Datenbank erstellt. Insgesamt wurden in der Datenbank, die auf einem virtuellen Server der TiHo betrieben wird, über 1.500 Variablen in mehr als 39 Tabellen zentral gesichert. Über ein Web-Interface konnten die Daten aller Frage- und Erfassungsbögen wie auch die Ergebnisse der Wasserproben-Untersuchungen mit Hilfe von Formularen eingegeben werden. Durch die Nutzung von Formularen und den darin integrierten Plausibilitätsprüfungen wurden Fehler in der Dateneingabe reduziert. Durch weitere Formulare, wie etwa für die Dokumentation von Telefonaten, konnte die tägliche Arbeit der Studentierärzte erleichtert werden. Alle anderen Probenergebnisse wurden über zehn verschiedene Importstellen in die Datenbank aufgenommen.

Die durch das IBEI erstellte und gewartete Projekt-Homepage www.rinder-botulismus.de informiert die Öffentlichkeit über das Projekt und dessen Hintergründe. Über ein Anmeldeformular konnten Betriebe, die an einer Teilnahme an der Studie interessiert waren, gemeldet werden. Nach Abschluss der Betriebsbesuche wurde ein Anmeldeformular für das geplante Abschluss-Symposium erstellt.

Für alle Projektpartner wurden personalisierte Zugänge für den internen Bereich der Homepage eingerichtet. Dort konnten bei entsprechender Freigabe stets aktuelle Daten in Form von Exceltabellen aus der Datenbank exportiert werden. Insgesamt standen 27 verschiedene Exporte zur Verfügung. Der interne Bereich der Homepage verfügt zudem über eine Mediathek, in der zentral relevante Medienbeiträge abgelegt werden können und ein „Living Document“, in dem sich die Projektpartner gegenseitig über geplante Auswertungen informieren können.

2.12 Plausibilitätsprüfungen

Schon während der Datenerfassung hat das IBEI damit begonnen, die eingepflegten Daten auf Plausibilität zu prüfen. Dies umfasste eine Prüfung auf fehlende Werte (außer bei Probenergebnissen), Werte außerhalb von logisch definierten Wertebereichen und eine Prüfung auf logische Beziehungen. Fehlerhafte oder fehlende Werte wurden mit Hilfe der RiKli kontrolliert und - wenn sich kein korrekter Wert ermitteln ließ - als implausibel gekennzeichnet. Insgesamt wurden nur 38 implausible Einzelwerte identifiziert, was für eine exzellente Datenqualität spricht. Darüber hinaus wurden 20 Datensätze identifiziert, die die im Verbund definierten Einschlusskriterien nicht erfüllt haben: zwei Betriebe lagen außerhalb der Studienregion, acht Wasserproben wurden zusätzlich von der Weide genommen, ein Einzeltier hatte noch kein Kalb, drei Silagen wurden nicht an relevante Gruppen verfüttert und sechs Bonitur-Datensätze hatten die gleiche Ohrmarkennummer wie andere Datensätze. Die Ergebnisse der Plausibilitätsprüfungen wurden allen Projektpartnern ab dem 17. April 2014 zur Verfügung gestellt, indem während des Exportes die entsprechenden Werte korrigiert ausgelesen bzw. nicht ausgelesen wurden. Die Daten in der Datenbank wurden nicht verändert.

2.13 Weitere Maßnahmen zur Qualitätssicherung der elektronisch erfassten Daten

Um den Observer-Bias zu minimieren wurden die Studentierärzte vorab hinsichtlich der klinischen Untersuchungen, des Scorings und der Befundung der Klauen durch Mitarbeiter der RiKli geschult. Darüber hinaus fand durch das IBEI eine Interviewer-Schulung und eine Einweisung der Personen, die Daten eingegeben haben, statt. Des Weiteren wurden die teilnehmenden Betriebe untersucht im Hinblick darauf, durch welche Einschlusskriterien sie jeweils als Fallbetrieb eingestuft worden waren. Dazu wurde ein sogenanntes Response Pattern (Tab. 2) erstellt. Es zeigte sich, dass keine eindeutige Einteilung in unterschiedliche Fallklassen vorgenommen werden konnte. Auch bestanden zwischen

Fall-1- und Fall-2-Betrieben nur geringfügige Unterschiede, was die Häufigkeit der Erfüllung der einzelnen Kriterien betrifft.

Tab. 2: Erfüllung der Einschlusskriterien durch Fall-1- (F1=Betrieb ohne Impfung) und Fall-2-Betriebe (F2=Betrieb mit Clostridienimpfung), dargestellt als Mehrfachnennung.

Einschlusskriterien	Anzahl Betriebe	Anteil (%)
Todesfälle, Abgänge, Festlieger, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	22	23,91
Todesfälle, Festlieger, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	21	22,83
Todesfälle, Abgänge, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	11	11,96
Abgänge, Festlieger, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	7	7,61
Milchrückgang, Todesfälle, Festlieger, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	7	7,61
Milchrückgang, Todesfälle, Abgänge, Festlieger, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	7	7,61
Milchrückgang, Todesfälle, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	5	5,43
Milchrückgang, Todesfälle, Abgänge, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	5	5,43
Milchrückgang, Festlieger, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	3	3,26
Milchrückgang, Abgänge, Festlieger, Eindruck einer erhöhten Krankheitsrate	2	2,17
Todesfälle, Abgänge, Festlieger	1	1,09
Milchrückgang, Todesfälle, Abgänge, Festlieger	1	1,09
Gesamt	92	100,00

Weiterhin wurde durch das IBEI ein Vergleich der Verdachts- und Kontrolltiere hinsichtlich ihres Laktationsstadiums und der Laktationsnummer durchgeführt. Es zeigte sich, dass Verdachtstiere durchschnittlich vor 117 Tagen (unteres Quartil: 59, oberes Quartil: 196) gekalbt haben, während Kontrolltiere vor durchschnittlich 179 Tagen (unteres Quartil: 81, oberes Quartil: 286) kalbten (Abb. 1). Auch bei der Anzahl der bisherigen Laktationen zeigten sich Unterschiede: Verdachtstiere waren im Mittel in der 3. Laktation (unteres Quartil: 2, oberes Quartil: 5), während Kontrolltiere sich im Mittel in der 2. Laktation befanden (unteres Quartil: 1, oberes Quartil: 3). Diese beiden Faktoren sollten demnach für die weitere Auswertung hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen chronischem Krankheitsgeschehen und dem Nachweis von *C. botulinum* als Confounder berücksichtigt werden, ebenso wie für die Analyse weiterer Faktoren, die Einfluss auf den Zustand der Tiere haben.

Darüber hinaus hat das IBEI Fall- und Kontrollbetriebe hinsichtlich des durchschnittlichen BCS von Verdachts- und Kontrolltieren verglichen, um zu prüfen, ob die beiden Tiergruppen (Verdachts- und Kontrolltiere) über den Status der Betriebe hinweg vergleichbar waren. Es zeigte sich, dass der durchschnittliche BCS der Verdachtstiere ebenso wie der durchschnittliche BCS der Kontrolltiere sich nicht zwischen verschiedenen Betriebstypen (Fall-1-, Fall-2- und Kontrollbetriebe) unterschied, während sich Verdachts- und Kontrolltiere dagegen deutlich unterschieden (Abb. 2). Dies deutete auf

eine gute (visuelle) Diskriminierung zwischen den Tiergruppen hin, was eine wichtige Grundlage für die anschließenden eingehenden Untersuchungen an den einzelnen Tieren war.

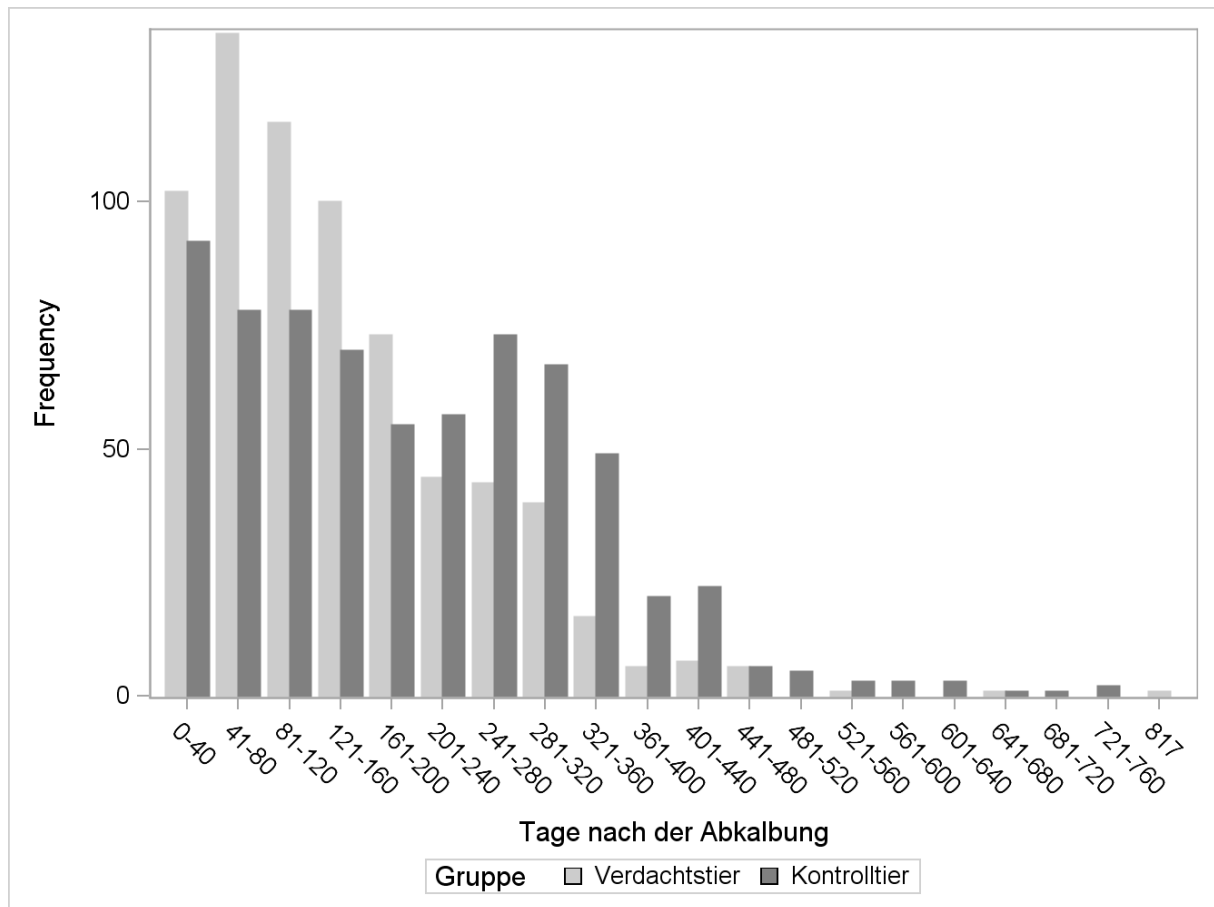


Abb. 1: Vergleich von Verdachts- und Kontrolltieren hinsichtlich ihres Laktationsstadiums (Frequency = Anzahl der Tiere)

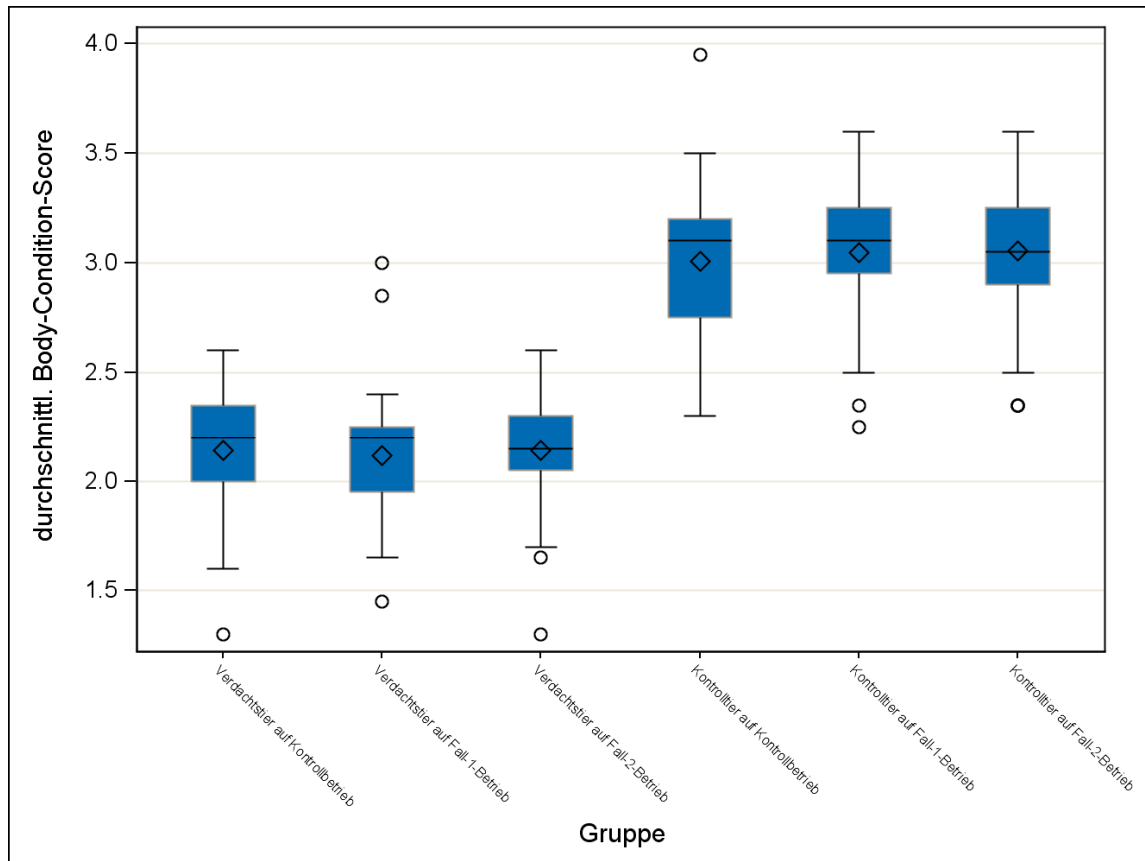


Abb. 2: Vergleich des durchschnittlichen Body-Condition-Scores (BCS) von Verdachts- und Kontrolltieren auf Fall-1-, Fall-2- und Kontrollbetrieben (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb); dargestellt ist der durchschnittliche BCS pro Betrieb berechnet für jeweils alle Verdachts- und Kontrolltiere, für die Werte vorhanden waren

2.14 Zusammenhang zwischen chronischem Krankheitsgeschehen und dem Auftreten von *C. botulinum*

Zur Prüfung des Zusammenhangs zwischen chronischen Krankheitsgeschehen auf Milchviehbetrieben und dem Auftreten von *C. botulinum* wurde zunächst gemeinsam im Verbund eine Definition für einen *C. botulinum*-positiven Betrieb festgelegt. Ein Betrieb wurde dann als *C. botulinum*-positiv betrachtet, wenn in mindestens einer Probe, die von einem Einzeltier stammt, in mindestens einem der in LMQS oder FLI durchgeführten Verfahren der Nachweis von *C. botulinum*, seinem Toxin oder dessen Gen gelang. Der Zusammenhang zwischen dem Fall-/ Kontrollstatus eines Betriebes und dem Nachweis von *C. botulinum* wurde durch das IBEI deskriptiv beschrieben. Darüber hinaus wurde explorativ der direkte Zusammenhang auch induktiv mittels einer logistischen Regression analysiert. Diese Analysen wurden zudem auch auf Einzeltierebene durchgeführt, um zu prüfen, ob bei klinisch auffälligen Tieren häufiger *C. botulinum* nachgewiesen werden konnte.

2.15 Hypothesenprüfender Ansatz

Für die Fragestellung, welche Faktoren zu einem chronischen Krankheitsgeschehen auf Milchviehbetrieben führen, wurde durch das IBEI ein hypothesenprüfender Ansatz gewählt (siehe z.B. Krienbrock et al. 2012). Aus der großen Anzahl von Variablen wurden Risikofaktoren hypothesenbasiert ausgewählt. Dieses hypothesenbasierte Herangehen entspricht den Erfordernissen der guten wissenschaftlichen Praxis und senkt bei solch umfangreichen Datensätzen

die Wahrscheinlichkeit, falsch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Daher wurde mit fachlicher Unterstützung der RiKli ein relationales ätiologisches Diagramm erstellt (Abb. 3). Es wurden verschiedenste Themenbereiche wie Haltung, Fütterung, Tiergesundheit, Management und Hygiene berücksichtigt. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, einen Eindruck über diejenigen Faktoren zu gewinnen, die einen direkten Einfluss auf die Herdengesundheit haben.

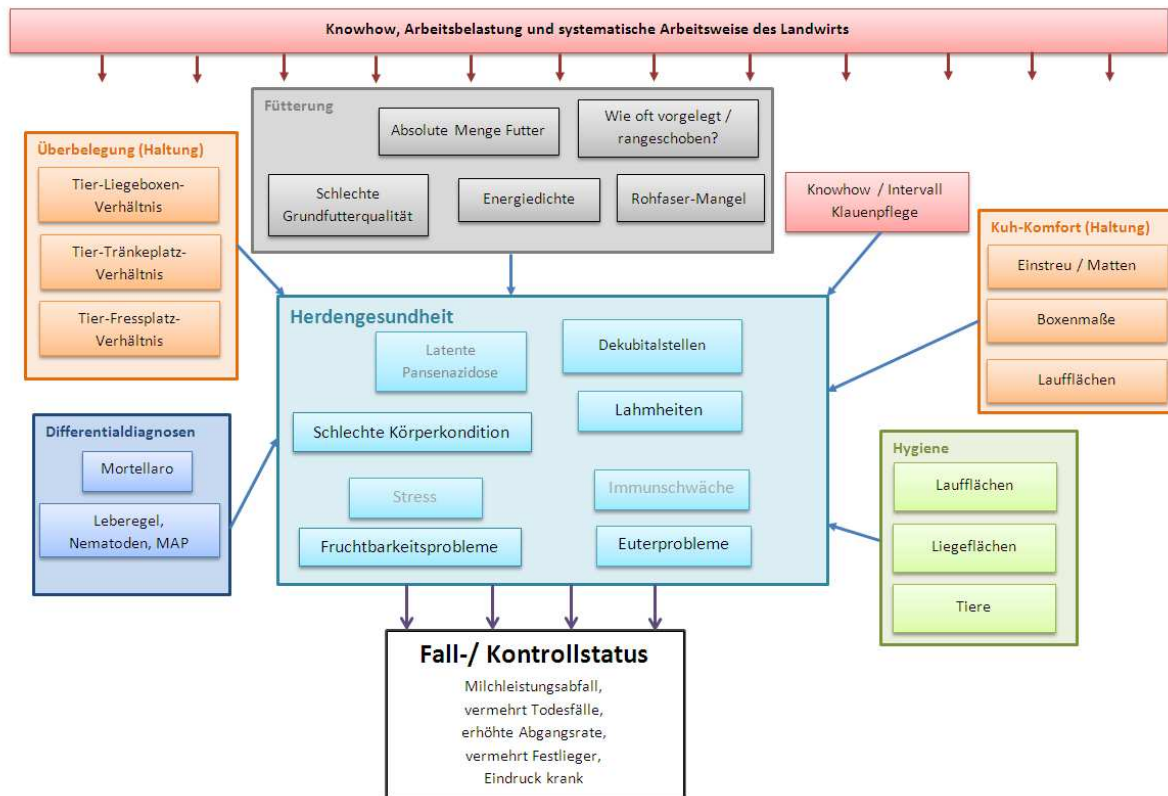


Abb. 3: Relationales ätiologisches Diagramm des hypothesenprüfenden Ansatzes

Da es sich bei dem hier betrachteten Problemfeld um ein mehrstufiges Wirkungsmodell handelt, wurden zusätzlich alle Einflussgrößen nach inhaltlichen Gesichtspunkten gestaffelt und entlang der Wirkungsrichtung schrittweise untersucht. Dieses Modell gibt daher sowohl einen Überblick, welche Faktoren aus dem Bereich der Herdengesundheit direkt auf den Fall-/ Kontrollstatus wirken als auch welche Faktoren auf die Herdengesundheit wirken (Differentialdiagnosen, Haltung, Hygiene, Fütterung). Nach der Aggregation der Daten der Einflussfaktoren auf Betriebsebene wurde eine grundlegende Deskription durchgeführt, bei der die Verteilung der Einflussfaktoren in den Fall-1-, Fall-2- und Kontrollbetrieben untersucht wurde. Für die hier vorgestellten Analysen wurde dabei auf eine Trennung von ungeimpften und geimpften Betrieben verzichtet. In weiteren Auswertungen wird dies als Stratifizierungsmerkmal mit berücksichtigt. Auf Grundlage der deskriptiven Analyse wurden fehlende Werte, zu gering besetzte Kategorien und leere Zellen identifiziert, geprüft und gegebenenfalls nacherhoben. Bei Variablen, bei denen mehr als 10 % fehlende Werte auftraten, wurde eine zusätzliche Kategorie „keine Angabe“ gebildet. Dies war bei den Variablen Paratuberkulose und der mikrobiologischen Beurteilung der Silagen notwendig, da die Analysen zum Zeitpunkt der Fertigstellung des Berichtes noch nicht abgeschlossen waren. Bei weniger als 10 % fehlenden Werten je Variable wurden Werte imputiert (Kreienbrock et al. 2012, Little et al. 1987); dies war nur bei 19 Einzelwerten (0,25 % aller Daten) notwendig. Es wurde bei quantitativen Daten

der Mittelwert der jeweiligen Betriebsgruppe eingesetzt. Bei qualitativen Variablen wurde der Betrieb der in seiner Gruppe am häufigsten besetzten Kategorie zugeordnet. Bei qualitativen Variablen mit einer Zellbesetzung ≤ 5 Betrieben wurden Kategorien zusammengefasst. In der anschließenden univariaten, einfaktoriellen logistischen Regression wurden solche Variablen mit einem p-Wert $< 0,2$ für die weitere Auswertung ausgewählt. Es konnte aufgrund ausreichend großer Fallzahlen auf eine exakte logistische Regression verzichtet werden. Zwischen den so ausgewählten Faktoren wurden paarweise Beziehungen bestimmt, indem für zwei quantitative Größen der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet wurde. Bei einem Korrelationskoeffizienten $> 0,8$ wurde von einem starken Zusammenhang ausgegangen. Für zwei qualitative Einflussgrößen wurde ein Assoziationsmaß Cramers' V von $> 0,7$ als ein starker Zusammenhang gewertet. Für Assoziationen zwischen qualitativen und quantitativen Einflussgrößen wurde ab einem Bestimmtheitsmaß in der Varianzanalyse von $> 0,64$ von einem starken Zusammenhang ausgegangen (Fahrmeir et al. 2012).

2.16 Eindruck der Studientierärzte von den Betrieben (IBEI)

Die Studientierärzte dokumentierten ihren Eindruck vom Management der Betriebe mittels eines standardisierten Fragebogens. Das Ziel dieser Erhebung war nicht die Beurteilung des Managements, sondern die Frage, wie verlässlich und valide eine solche Methode ist, um zugrundeliegende Faktoren zu erfassen. Die Antworten wurden zur Prüfung der Reliabilität untereinander mittels Interviews und Kappa-basierten Verfahren analysiert (Landis et al. 1977). Des Weiteren wurde für zwei Variablen der Zusammenhang zwischen den betrieblichen Gegebenheiten und dem Eindruck der Studientierärzte geprüft.

2.17 Nachbefragung (IBEI)

Im Zeitraum zwischen Oktober 2013 und März 2014 wurden 38 Landwirte, die an der Studie teilgenommen hatten, im Rahmen eines strukturierten Telefoninterviews zu der Entwicklung ihres Betriebes, zu ihrer Zufriedenheit mit der Studie und zur Umsetzung von Managementmaßnahmen befragt. Dies diente zur Evaluation der Beratung im Rahmen der Studie. Es handelte sich um Fallbetriebe, bei denen der Betriebsbesuch zwischen 6 und 12 Monaten zurück lag. Die Antworten der Landwirte wurden deskriptiv ausgewertet. Zusätzlich erfolgte zur Identifizierung von Faktoren, die eine Umsetzung der Ratschläge der Studientierärzte beeinflussen, eine qualitative Auswertung der Antworten auf offene Fragen und von Kommentaren basierend auf Methoden der gegenstandsbezogenen Theorie (Grounded Theory; Glaser et al. 2009).

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Betriebsrekrutierung und -besuche

Im Zeitraum zwischen Mai 2012 und Februar 2014 wurden insgesamt 287 zur Teilnahme bereite Betriebe gemeldet. Aus unterschiedlichen Gründen (Einschlusskriterien nicht erfüllt, Lage außerhalb der Studienregion, etc.) konnten 118 Betriebe nicht an der Studie teilnehmen. 28 Betriebe hatten sich entweder nach Anforderung der Zahlen hinsichtlich der Einschlusskriterien nicht mehr gemeldet oder durften nicht mehr teilnehmen, da aufgrund der kurzen Studiendauer nicht mehr Betriebe besucht werden konnten. Insgesamt wurden 141 Betriebe (48 Kontroll-, 45 Fall-1- und 48 Fall-2-Betriebe) zwischen Mai 2012 und Februar 2014 besucht. Ein Kontroll- und ein Fall-2-Betrieb wurden

von der weiteren Auswertung aufgrund ihrer Lage außerhalb der Studienregion ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde ein untersuchtes Einzeltier eines Fall-2-Betriebes ausgeschlossen, da dieses Tier bis dato noch nie abgekalbt hatte und damit keine Milchleistungsdaten vorhanden waren. Die im Folgenden dargestellten Auswertungen beziehen sich daher auf 139 Betriebe und 1.389 Tiere. Bei der Erfassung der beiden Herdenindices BCS und Bewegungsscore wurden 17.705 Kühe beurteilt und in der Auswertung berücksichtigt.

Es konnten in weiten Teilen der Studienregion Fall- wie auch Kontrollbetriebe rekrutiert werden (Anhang, Abb. 9). Lokal kam es stellenweise zur Häufung von Betriebsmeldungen, da Tierärzte mehrere Betriebe meldeten oder Landwirte, die sich mit Kollegen aus der Umgebung über die Studie ausgetauscht hatten, auch teilnehmen wollten. Die Verteilung der besuchten Betriebe zeigt große Übereinstimmung mit der Beschreibung des Auftretens des chronischen Botulismus (Böhnel et. al. 2012). Tabelle 3 stellt eine Charakterisierung der teilnehmenden Betriebe dar.

Tab. 3: Betriebsstruktur der teilnehmenden Betriebe getrennt nach Teilnehmergruppe (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb).

Variable	Teilnehmergruppe	Anzahl	Mittelwert	Median	STD	CV	MIN	5%-Quantil	95%-Quantil	MAX
Herden durchschnittsleistung Kg/Tag	K	47	26,01	26,27	3,59	13,81	17,33	21,00	33,70	35,40
	F1	45	22,77	23,17	3,82	16,76	13,47	16,57	29,50	30,70
	F2	47	21,66	21,77	3,84	17,73	13,40	14,60	27,57	30,87
Herdengröße (Laktierende und Trockensteher)	K	47	144,77	120,00	68,00	46,97	66,00	75,00	270,00	380,00
	F1	45	118,87	108,00	69,97	58,86	33,00	48,00	207,00	390,00
	F2	47	116,43	115,00	41,89	35,98	48,00	57,00	192,00	212,00
Gesamtzahl der auf dem Betrieb arbeitenden Personen	K	47	5,43	5,00	1,99	36,61	2,00	3,00	10,00	12,00
	F1	45	5,11	5,00	2,69	52,64	2,00	2,00	12,00	14,00
	F2	47	4,62	4,00	1,69	36,57	1,00	3,00	8,00	10,00
Wirtschafts- Flächen in Hektar (Grünland und Ackerland)	K	47	147,85	125,00	81,59	55,19	50,00	71,00	300,00	500,00
	F1	45	123,81	110,00	69,00	55,73	50,00	56,00	240,00	440,00
	F2	47	127,44	110,00	57,12	44,82	50,00	65,00	250,00	300,00

3.1.2 Angaben der Landwirte zu Erkrankungen und Laborbefunden

Während des Interviews sollten die Landwirte Angaben zu verschiedenen Erkrankungen, die entweder seit Beginn der Auffälligkeiten (Fallbetriebe) oder während der letzten 12 Monate (Kontrollbetriebe) aufgetreten waren, machen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Erkrankungen der Kühe seit Beginn der Krankheitsproblematik im Betrieb (F1=Fallbetrieb ohne Impfung, F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung) bzw. während der letzten 12 Monate (K=Kontrollbetrieb) nach Angaben der Betriebsleiter.

Erkrankung/Symptom	Betrieb	keine Angabe n (%)	keine n (%)	vereinzelt n (%)	häufig n (%)	Gesamt n (%)
Gebärmutterentzündung/ Ausfluss	K	1 (2,13)	0 (0,00)	40 (85,11)	6 (12,77)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	1 (2,22)	28 (62,22)	16 (35,56)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	1 (2,13)	19 (40,43)	27 (57,45)	47 (100,0)
Ketose	K	1 (2,13)	5 (10,64)	35 (74,47)	6 (12,77)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	5 (11,11)	30 (66,67)	10 (22,22)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	6 (12,77)	28 (59,57)	13 (27,66)	47 (100,0)
Labmagenverlagerung	K	1 (2,13)	12 (25,53)	33 (70,21)	1 (2,13)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	9 (20,00)	29 (64,44)	7 (15,56)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	8 (17,02)	31 (65,96)	8 (17,02)	47 (100,0)
Klauenerkrankung	K	1 (2,13)	1 (2,13)	28 (59,57)	17 (36,17)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	0 (0,00)	15 (33,33)	30 (66,67)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	0 (0,00)	13 (27,66)	34 (72,34)	47 (100,0)
Lahmheit	K	1 (2,13)	4 (8,51)	30 (63,83)	12 (25,53)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	2 (4,44)	15 (33,33)	28 (62,22)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	3 (6,38)	12 (25,53)	32 (68,09)	47 (100,0)
Milchfieber	K	1 (2,13)	7 (14,89)	38 (80,85)	1 (2,13)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	5 (11,11)	33 (73,33)	7 (15,56)	45 (100,0)
	F2	1 (2,13)	5 (10,64)	33 (70,21)	8 (17,02)	47 (100,0)
Nachgeburtsverhaltung	K	1 (2,13)	2 (4,26)	39 (82,98)	5 (10,64)	47 (100,0)
	F1	1 (2,22)	0 (0,00)	28 (62,22)	16 (35,56)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	0 (0,00)	23 (48,94)	24 (51,06)	47 (100,0)
Atembeschwerden	K	1 (2,13)	36 (76,60)	10 (21,28)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	28 (62,22)	14 (31,11)	3 (6,67)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	29 (61,70)	17 (36,17)	1 (2,13)	47 (100,0)
Durchfall/Verstopfung	K	1 (2,13)	21 (44,68)	24 (51,06)	1 (2,13)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	17 (37,78)	23 (51,11)	5 (11,11)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	12 (25,53)	27 (57,45)	8 (17,02)	47 (100,0)
Mastitis nach Kalbung	K	1 (2,13)	5 (10,64)	32 (68,09)	9 (19,15)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	3 (6,67)	32 (71,11)	10 (22,22)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	4 (8,51)	26 (55,32)	17 (36,17)	47 (100,0)
Mastitis während Laktation	K	1 (2,13)	0 (0,00)	32 (68,09)	14 (29,79)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	0 (0,00)	36 (80,00)	9 (20,00)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	0 (0,00)	32 (68,09)	15 (31,91)	47 (100,0)
Fruchtbarkeitsprobleme	K	2 (4,26)	3 (6,38)	32 (68,09)	10 (21,28)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	3 (6,67)	22 (48,89)	20 (44,44)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	2 (4,26)	20 (42,55)	25 (53,19)	47 (100,0)

Insgesamt wurde die Angabe „kein oder vereinzelt auftreten“ der jeweiligen Erkrankung häufiger von den Betriebsleitern der Kontrollbetriebe und die Angabe „häufig“ öfter von den Betriebsleitern der Fallbetriebe gemacht. Mehr als 60 % der Fallbetriebe hatten häufig Probleme mit Klauenerkrankungen und anderen Lahmheiten (K: < 40 % bzw. < 30 %), mehr als 40 % Fruchtbarkeitsprobleme (K: < 25 %). Gebärmutterentzündung und Nachgeburtsverhaltung kamen in mehr als 30 % (K: < 15 %) und Ketose, Mastitis nach der Kalbung oder während der Laktation in mehr

als 20 % der Fallbetriebe häufig vor (K: < 15 %, < 20 %, < 30 %). Mehr als 10 % der F-Betriebe hatten häufig Probleme mit Labmagenverlagerung, Milchfieber und Durchfall/Verstopfung (K: < 5 %). Atemwegserkrankungen schienen weder in Fall- noch in Kontrollbetrieben ein Problem zu sein.

Tab. 5: Durch Laborbefunde bestätigte Diagnosen seit Beginn der Krankheitsproblematik im Betrieb (F1=Fallbetrieb ohne Impfung, F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung) bzw. während der letzten 12 Monate (K=Kontrollbetrieb) nach Angaben der Betriebsleiter.

Erkrankung/ Symptom	Betrieb	keine Angabe n (%)	nein n (%)	ja n (%)	weiß nicht n (%)	Gesamt n (%)
BVD	K	1 (2,13)	40 (85,11)	6 (12,77)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	39 (86,67)	6 (13,33)	0 (0,00)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	40 (85,11)	7 (14,89)	0 (0,00)	47 (100,0)
Chlamydien	K	1 (2,13)	43 (91,49)	3 (6,38)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	37 (82,22)	4 (8,89)	4 (8,89)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	32 (68,09)	4 (8,51)	11 (23,40)	47 (100,0)
Eutererkrankungen	K	1 (2,13)	11 (23,40)	34 (72,34)	1 (2,13)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	15 (33,33)	30 (66,67)	0 (0,00)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	13 (27,66)	34 (72,34)	0 (0,00)	47 (100,0)
Listeriose	K	1 (2,13)	46 (97,87)	0 (0,00)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	43 (95,56)	0 (0,00)	2 (4,44)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	40 (85,11)	0 (0,00)	7 (14,89)	47 (100,0)
Mangelerkrankung	K	1 (2,13)	42 (89,36)	4 (8,51)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	34 (75,56)	11 (24,44)	0 (0,00)	45 (100,0)
	F2	1 (2,13)	31 (65,96)	15 (31,91)	0 (0,00)	47 (100,0)
Parasitenbefall	K	1 (2,13)	43 (91,49)	3 (6,38)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	36 (80,00)	9 (20,00)	0 (0,00)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	35 (74,47)	10 (21,28)	2 (4,26)	47 (100,0)
Paratuberkulose	K	2 (4,26)	44 (93,62)	1 (2,13)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	44 (97,78)	1 (2,22)	0 (0,00)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	43 (91,49)	2 (4,26)	2 (4,26)	47 (100,0)
Q-Fieber	K	1 (2,13)	41 (87,23)	5 (10,64)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	41 (81,11)	2 (4,44)	2 (4,44)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	44 (93,62)	1 (2,13)	2 (4,26)	47 (100,0)
Salmonellose	K	1 (2,13)	46 (97,87)	0 (0,00)	0 (0,00)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	43 (95,56)	2 (4,44)	0 (0,00)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	44 (93,62)	2 (4,26)	1 (2,13)	47 (100,0)
Vergiftung	K	1 (2,13)	44 (93,62)	0 (0,00)	2 (4,26)	47 (100,0)
	F1	0 (0,00)	42 (93,33)	1 (2,22)	2 (4,44)	45 (100,0)
	F2	0 (0,00)	44 (93,62)	1 (2,13)	2 (4,26)	47 (100,0)

Weiterhin wurden die Landwirte nach durch Laborbefunde bestätigten Diagnosen verschiedener Erkrankungen befragt (Tab. 5). Für Bovine Virusdiarrhoe (BVD) (13-15 %), Chlamydien (6-9 %), Listeriose (0 %), Eutererkrankungen (67-72 %), Paratuberkulose (2-4 %), Q-Fieber (2-11 %), Salmonellen (0-4 %) und Vergiftungen (0-2 %) lagen für alle Betriebskategorien in etwa vergleichbare positive Laborbestätigungen vor. Nur bei Mangelerkrankungen und Parasitenbefall gab es mehr positive Nennungen bei den Fallbetrieben als bei den Kontrollbetrieben (24-32 % vs. 9 % bzw. 20-21 % vs. 6 %). Diese Tabelle gibt nicht so sehr Informationen über die Häufigkeit bestimmter Erkrankungen als vielmehr über die sowohl vom betreuenden Tierarzt als auch vom Landwirt

beeinflusste Intention, auf bestimmte Erkrankungen hin untersuchen zu lassen. Die Antwort „nein“ beinhaltet dabei sowohl ein negatives Ergebnis einer Untersuchung als auch, dass gar nicht untersucht wurde. Insgesamt scheinen dabei, bezogen auf die nachgefragten Erkrankungen bis auf Euterentzündungen, Parasitenbefall und Mangelerkrankungen nur verhältnismäßig wenige Erkrankungen, die auch als Differentialdiagnosen für chronischen Botulismus in Frage kommen, über Labordiagnostik abgeklärt worden zu sein.

3.1.3 Ergebnisse der Clostridiendiagnostik (LMQS)

Im LMQS sind zwei unterschiedliche Labormethoden zur Untersuchung der Proben auf das Vorhandensein von *C. botulinum* angewendet worden. Das erste Verfahren war eine Singleplex Real Time-PCR mit Voranreicherung zum Nachweis der sechs Neurotoxingenvarianten A bis F von *C. botulinum*. Die zweite genutzte Methodik war die Identifizierung von kulturell anaerob angezüchteten Clostridien-verdächtigen Isolaten mittels 16S rDNA-Genanalyse.

Alle detaillierten Daten und Ergebnisse des LMQS sind sowohl in digitaler als auch in Papierform vorhanden und können bei Bedarf zur Verfügung gestellt werden.

3.1.3.1 Botulinum-Neurotoxin-Gennachweis mittels Real Time-PCR

Es wurden Proben von 141 Betrieben untersucht. Insgesamt ergab dies eine Anzahl von 2.818 Tierproben und 419 Futtermittelproben sowie 141 Wasserproben. Dies ergibt eine Gesamtanzahl von insgesamt 3.378 Proben. Da alle Proben auf die sechs verschiedenen Toxingenvarianten untersucht wurden und für jede Probe eine Amplifikationskontrolle nötig war, wurden insgesamt 23.646 Real Time-PCR-Reaktionen durchgeführt. Hinzu kamen die Reaktionen für Positiv- und Negativkontrollen bei jedem durchgeführten Lauf sowie Wiederholungen und Bestätigungen anhand der Leberbouillonproben bei positiven Resultaten. Die Tierproben teilen sich auf in 1.410 Pansensaft- und 1.408 untersuchte Kotproben. Die Futtermittel- bzw. Umweltproben setzten sich zusammen aus Silageproben, sonstigen Futtermittelproben und wenigen Biogasanlagen-Gärresten (n = 5). Da die Betriebe 5 und 24 außerhalb der Studienregion lagen, werden diese nicht in die weitere Auswertung miteinbezogen. Ebenso wird Tier 6 aus Betrieb 2 nicht einbezogen, da dieses Tier noch keine laktierende Kuh war und deshalb den Kriterien nicht entsprochen hat. Somit werden insgesamt 2.776 Tierproben, 411 Futtermittelproben und 139 Wasserproben in die Auswertung miteinbezogen.

Um als *C.-botulinum*-positiver Betrieb gewertet zu werden, musste mindestens eine Tierprobe (Kot oder Pansensaft) eines Tieres des jeweiligen Betriebes ein positives Signal in der Real Time-PCR geliefert haben. Somit werden Betrieb 56 und 126 nicht als positiv gewertet (nachgewiesen wurde hier die Neurotoxingenvariante A), da in diesen Betrieben jeweils nur eine Umweltprobe positiv war. Es wurden 25 Betriebe gefunden, in deren Proben das Botulinum-Neurotoxin nachweisbar war. Diese verteilten sich auf fünf Fall-1-, elf Fall-2- und neun Kontroll-Betriebe. Dies ergibt einen Anteil von insgesamt 17,99 % aller Betriebe bzw. 11,11 % der Fall-1-, 23,40 % der Fall-2- und 19,15 % der Kontroll-Betriebe (Tab. 6).

Tab. 6: Anzahl untersuchter Betriebe (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb) inklusive Botulinum-Neurotoxingen (BoNT)-positiver Ergebnisse.

Betriebe	BoNT positiv n (%)	BoNT negativ n (%)	Anzahl n
K	9 (19,15)	38 (80,85)	47
F1	5*(11,11)	40*(88,89)	45
F2	11 (23,40)	36 (76,60)	47
Gesamt	25	114	139

* Betrieb 53 und 126 werden zu den negativen gezählt (jeweils 1 Betriebsprobe positiv)

Innerhalb eines Betriebes konnte immer nur eine der sechs Neurotoxingenvarianten nachgewiesen werden. Es konnte bei 19 Betrieben die Toxingenvariante A, bei drei Betrieben die Variante B, bei zwei Betrieben die Variante D und bei einem Betrieb die Toxingenvariante F bestätigt werden. Die Toxingenvarianten C und E konnten bei keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Das Botulinum-Neurotoxin konnte in 108 Tierproben verteilt auf 96 Tier- sowie 12 Betriebsproben festgestellt werden. Diese 96 Tierproben stammten von 86 unterschiedlichen Tieren. Bei zehn Tieren konnte sowohl in der Pansensaft- als auch in der Kotproben BoNT-Gen nachgewiesen werden. Somit erwiesen sich 6,19 % aller Tiere positiv für eine der sechs Neurotoxingen-Varianten (Tab. 7). Betrachtet man die drei Betriebskategorien getrennt, so ergibt sich für F1-Betriebe ein Anteil von 4,00 %, für F2-Betriebe von 7,89 % und für K-Betriebe von 6,60 %. Tabelle 8 und 9 zeigen die Verteilung positiver Kontroll- und Verdachtstiere auf die einzelnen Betriebskategorien (Tab. 8) bzw. die Aufteilung nach Probenart bei Verdachts- und Kontrolltiere innerhalb der drei Betriebskategorien (Tab. 9).

Tab. 7: Anzahl untersuchter Tiere (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb) inklusive Botulinum-Neurotoxingen (BoNT)-positiver Ergebnisse*.

Tiere	BoNT positiv n (%)	BoNT negativ n (%)	Anzahl n
K	31 (6,60)	439 (93,40)	470
F1	18 (4,00)	432 (96,00)	450
F2	37 (7,89)	432 (92,11)	469
Gesamt	86	1303	1389

* von Tier 9 von Betrieb 48 (Fall-1) und von Tier 9 von Betrieb 67 (Kontrolle) ist jeweils nur Pansensaft untersucht worden

Tab. 8: Anzahl Botulinum-Neurotoxigen (BoNT)-positiver Tiere nach Kontroll- und Verdachtstieren (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb).

Tiere	Kontrolltiere n (%)	Verdachtstiere n (%)	Gesamt positiv n (%)
K	17 (54,84)	14 (45,16)	31 (100,00)
F1	10 (55,56)	8 (44,44)	18 (100,00)
F2	16 (43,24)	21 (56,76)	37 (100,00)
Gesamt	43	43	86

Tab. 9: Anzahl Botulinum-Neurotoxigen (BoNT)-positiver Tierproben (Kot- und Pansensaft F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridien; K=Kontrollbetrieb).

Tiere	Kotproben n (%)	Pansensaftproben n (%)	Gesamt positiv n (%)
F1			
Verdachtstiere	9 (14,75)	2 (5,71)	11 (11,46)
Kontrolltiere	5 (8,20)	5 (14,28)	10 (10,42)
F1-Gesamt	14	7	21
F2			
Verdachtstiere	14 (22,95)	7 (20,00)	21 (21,88)
Kontrolltiere	11 (18,03)	8 (22,86)	19 (19,79)
F2-Gesamt	25	15	40
K			
Verdachtstiere	10 (16,39)	6 (17,14)	16 (16,67)
Kontrolltiere	12 (19,67)	7 (20,00)	19 (19,97)
K-Gesamt	22	13	35
Gesamt	61	35	96

Es zeigten elf Futtermittelproben (Silageproben und sonstige Futtermittel) ein positives Ergebnis der Real Time-PCR-Analyse. Diese verteilten sich auf neun Betriebe (6,47 %). Vier dieser Betriebe gehörten zur Gruppe der Fall-1-, zwei zur Gruppe der Fall-2- und drei zu den Kontroll-Betrieben. Somit konnten bei 8,89 % der Fall-1-, 4,26 % der Fall-2- und 6,39 % der Kontroll-Betriebe Neurotoxigene in den Betriebsproben nachgewiesen werden (Tab. 10 und 11).

Bei allen positiven Betriebsproben war die Variante A des Botulinum-Neurotoxigen nachweisbar. Insgesamt konnte nur bei einer Wasserprobe ein Botulinum-Neurotoxigen nachgewiesen werden. Auch hier war die Variante A nachweisbar. In keinem der Biogas-Gärreste war eine der sechs Neurotoxigen-Varianten nachweisbar.

5,51 %, 2,87 % und 2,77 %. Alle weiteren Spezies kamen in weniger als 1% der Isolate als Identifizierungsergebnis vor (Tab. 13).

Tab. 12: Auflistung in der Kultur anaerob wachsender Bakterien, die mit einer Sicherheit von > 97 % mittels 16S rDNA-Genanalyse auf Speziesebene identifiziert werden konnten.

1 <i>Blautia hydrogenotrophica</i>	24 <i>Clostridium frigidicarnis</i>	47 <i>Clostridium sordellii</i>
2 <i>Butyricoccus pulicaecorum</i>	25 <i>Clostridium glycolicum</i>	48 <i>Clostridium sporogenes</i>
3 <i>Clostridiales bacterium oral taxon</i>	26 <i>Clostridium histolyticum</i>	49 <i>Clostridium sporosphaeroides</i>
4 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	27 <i>Clostridium intestinale</i>	50 <i>Clostridium subterminale</i>
5 <i>Clostridium aciditolerans</i>	28 <i>Clostridium leptum</i>	51 <i>Clostridium tepidiprofundii</i>
6 <i>Clostridium aestuarii</i>	29 <i>Clostridium limosum</i>	52 <i>Clostridium tertium</i>
7 <i>Clostridium algidicarnis</i>	30 <i>Clostridium lundense</i>	53 <i>Clostridium tetani</i>
8 <i>Clostridium aminovalericum</i>	31 <i>Clostridium malenominatum</i>	54 <i>Clostridium tetanomorphum</i>
9 <i>Clostridium amylolyticum</i>	32 <i>Clostridium mesophilum</i>	55 <i>Clostridium thiosulfatireducen</i>
10 <i>Clostridium argentinense</i>	33 <i>Clostridium novyi</i>	56 <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
11 <i>Clostridium baratii</i>	34 <i>Clostridium paraputrificum</i>	57 <i>Clostridium uliginosum</i>
12 <i>Clostridium beijerinckii</i>	35 <i>Clostridium pascui</i>	58 <i>Clostridium xylanolyticum</i>
13 <i>Clostridium bifermentans</i>	36 <i>Clostridium perfringens</i>	59 <i>Desulfotomaculum guttoideum</i>
14 <i>Clostridium butyricum</i>	37 <i>Clostridium proteolyticum</i>	60 <i>Eubacterium combesii</i>
15 <i>Clostridium cadaveris</i>	38 <i>Clostridium puniceum</i>	61 <i>Eubacterium contortum</i>
16 <i>Clostridium celerecrescens</i>	39 <i>Clostridium putrefaciens</i>	62 <i>Eubacterium multiforme</i>
17 <i>Clostridium clariflavum</i>	40 <i>Clostridium roseum</i>	63 <i>Lachnobacterium bovis</i>
18 <i>Clostridium cochlearium</i>	41 <i>Clostridium saccharobutylicum</i>	64 <i>Lactonifactor longoviformis</i>
19 <i>Clostridium cochlearium/tetani</i>	42 <i>Clostridium saccharolyticum</i>	65 <i>Peptostreptococcus stomatis</i>
20 <i>Clostridium difficile</i>	43 <i>Clostridium saccharoperbutylac</i>	66 <i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>
21 <i>Clostridium diolis</i>	44 <i>Clostridium sardiniense</i>	67 <i>Robinsoniella peoriensis</i>
22 <i>Clostridium disporicum</i>	45 <i>Clostridium sartagoforme</i>	
23 <i>Clostridium drakei</i>	46 <i>Clostridium Schirmacherense</i>	

Es wurden bis zu 89 Isolate von jedem Betrieb untersucht. Das Minimum lag bei 26 erhaltenen Isolaten bei einem Betrieb. Im Durchschnitt gibt es Ergebnisse von 54 Isolaten für Kontroll-, 57 Isolaten für Fall-1- und 60 Isolaten für Fall-2-Betriebe. Zusätzlich wurde betrachtet, wie viele unterschiedliche Spezies auf den jeweiligen Betrieben gefunden werden konnten. Es kamen in der

Fall-1- und Fall-2-Gruppe durchschnittlich elf unterschiedliche Isolate vor und in der Gruppe der Kontrollen zehn. Auf allen Betrieben wurden mindestens fünf verschiedene Isolate gefunden. Der Betrieb mit den meisten verschiedenen Isolaten zeigt eine Anzahl von 19 und gehörte zu den Fall-2-Betrieben.

Tab. 13: Anzahl der am häufigsten mittels 16S rDNA-Genanalyse identifizierten Clostridien-Spezies bezogen auf den Betriebsstatus (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb).

Spezies	F1 n (%)	F2 n (%)	K n (%)	Gesamt n (%)
<i>C. sporogenes</i>	1.093 (42,65)	1.176 (41,54)	1.110 (43,61)	3.379 (42,56)
<i>C. cochlearium/ tetani</i>	296 (11,55)	399 (14,09)	371 (14,58)	1.066 (13,43)
<i>C. perfringens</i>	250 (9,75)	225 (7,95)	206 (8,09)	681 (8,58)
<i>C. butyricum</i>	108 (4,21)	190 (6,71)	139 (5,46)	437 (5,50)
<i>C. beijerinckii</i>	64 (2,50)	94 (3,32)	70 (2,75)	228 (2,87)
<i>C. bifermentas</i>	80 (3,12)	76 (2,68)	64 (2,51)	220 (2,77)
Sonstige Spezies	672 (26,22)	666 (23,57)	585 (22,99)	1.923 (24,24)
Gesamt	2.563	2.826	2.545	7.934*

*Die Differenz zu den untersuchten 8.728 Isolaten entsteht aufgrund des Ausschlusses einiger Proben sowie durch nicht-identifizierbare Isolate

Alle Isolate, die als *C. sporogenes* identifiziert wurden, wurden auf Grund der nahen Verwandtschaft zu *C. botulinum* auf das Vorliegen der Neurotoxingenvarianten A und B getestet, ebenso alle *C. novyi*-Isolate auf die Varianten C und D, alle *C. butyricum*-Isolate auf die Variante E und alle *C. baratii*-Isolate auf die Toxingenvariante F. Es wurden insgesamt 3.625 Sporogenes-verdächtige Isolate getestet sowie 69 *C. novyi*-Isolate, 65 *C. baratii*- und 478 *C. butyricum*-Isolate. Um zu klären, ob *C. botulinum* eine Rolle bei chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbeständen hat, wurden auch Isolate mit Sequenzidentitäten von weniger als 97 % auf die BoNT-Genvarianten getestet. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um sicher falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können.

Es wurden alle der 3.625 *C. sporogenes*-Isolate auf das Vorliegen der Toxingenvarianten A und B getestet. Hierbei wurden (um sicher falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können) auch Isolate in die Untersuchung einbezogen, welche nicht alle Gütekriterien der 16S rDNA-Genanalyse erfüllten (z.B. Identität von mindestens 97 %). Bei keinem der Isolate konnte die Variante A mittels Real Time-PCR nachgewiesen werden. Bei einem Isolat konnte der Genabschnitt für die Neurotoxingenvariante B nachgewiesen werden. Damit wird dieses Isolat als *C. botulinum*-Neurotoxintyp-B bezeichnet. Dieses Isolat stammte aus einer Kotprobe eines Kontrolltieres von Betrieb 122 (Fall-2-Betrieb). Dieser Betrieb ist auch in dem Real Time-PCR-Verfahren mit Voranreicherung positiv auf die Neurotoxingenvariante B getestet worden. Bei keinem Isolat von *C. novyi*, *C. butyricum* und *C. baratii* konnten die oben genannten Genvarianten mit Hilfe des Real Time-PCR-Verfahrens gefunden werden.

3.1.3.3 Untersuchungen mit MALDI-TOF-MS

Es wurden insgesamt 254 Isolate zusätzlich zur 16S rDNA-Identifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MS) untersucht. Für die ersten 81 massenspektrometrischen Messungen wurden Isolate ausgewählt, von denen bereits Ergebnisse der Identifikation anhand des 16S rDNA-

Genabschnittes vorlagen. Es wurden möglichst viele verschiedene und nicht sehr häufig vorkommende Spezies ausgewählt, für welche noch nicht ausreichend Referenzspektren in der Bruker-MALDI-TOF-Datenbank vorhanden waren. Später erfolgte eine Untersuchung von weiteren 173 Isolaten. Bei diesen handelte es sich um Kulturen, welche während der Routineprojektarbeit für die 16S rDNA-Identifizierung in einem bestimmten Zeitraum angezüchtet wurden. Es erfolgte hier also keine Selektion sondern eine Sammlung zufällig erhaltener Proben. Für die Auswertung wurde die Einteilung in zwei Gruppen beibehalten.

Die Isolate setzten sich aus 35 verschiedenen Spezies zusammen. Von den zunächst untersuchten 81 Isolaten stimmten die Ergebnisse von 16S rDNA-Analyse und MALDI-TOF-MS für 36 Isolate überein (44,44 %). Weitere vier Isolate lieferten zwar unterschiedliche Ergebnisse, diese Spezies waren allerdings auch mit dem Goldstandard, der 16S rDNA-Sequenzierung nicht immer eindeutig zu unterscheiden. Für 15 Isolate (18,52 %) konnte die massenspektrometrische Untersuchung nicht die gleiche Identifizierung liefern wie die Sequenzierung, und für 26 der seltenen Isolate (32,1 %) konnte kein ausreichend guter Score Value in der MALDI-TOF-MS-Analyse erreicht werden, um eine Spezies zu identifizieren.

Die MALDI-TOF-MS-Daten von sechs Isolaten der zweiten Gruppe wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da keine zufriedenstellenden Sequenzdaten für diese Proben generiert werden konnten. Somit liegen Daten von beiden Verfahren für weitere 167 Isolate vor. Nicht übereinstimmende Identifizierungsergebnisse zwischen MALDI-TOF und 16S rDNA-PCR gab es für neun Proben (5,39 %). Kein ausreichend guter Score Value konnte für drei Isolate (1,8 %) erreicht werden. Somit konnten für 92,82 % der Identifizierungen (155 Isolate) übereinstimmende Ergebnisse mit beiden Verfahren erzielt werden. Von diesen stimmten die Ergebnisse für 146 Proben (87,43 %) speziesgenau überein. Allerdings gab es auch hier neun Isolate (5,39 %), bei denen unterschiedliche Identifizierungen sehr eng verwandter Spezies generiert wurden.

Die besonders häufig vorkommenden Spezies *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. butyricum* und *C. bifementans* ließen sich gut mit dem Biotyper identifizieren. Für die sehr eng miteinander verwandten Spezies *C. roseum*, *C. diolis* sowie *C. beijerinckii* lieferten MALDI-TOF-MS und 16S rDNA-PCR unterschiedliche Ergebnisse.

Die Ergebnisse des Vergleiches der beiden Identifikationsmethoden für Clostridienspezies zeigen, dass die MALDI-TOF-MS-Technologie geeignet ist, um häufig vorkommende Clostridien sicher auf Speziesebene zu identifizieren. Für seltener vorkommende Spezies waren in der Datenbank von Bruker Daltonik, zum Zeitpunkt der Messung der ersten Isolate (bis August 2013), noch nicht ausreichend Referenzspektren vorhanden.

3.1.4 Mikrobielle Gemeinschaft der *Clostridia*

Für die untersuchten 15 Betriebe für Kot- und Pansensaftproben wurden die Profile der Gemeinschaft der *Clostridia* mittels SSCP-Analyse erstellt. Exemplarisch werden im Folgenden für jeweils einen Betrieb aus jeder Versuchsgruppe die SSCP-Profile für Kot- und Pansensaftproben in den Abbildungen 4-6 dargestellt. Abbildung 4 zeigt die SSCP-Profile der Gemeinschaft der *Clostridia* für den Kontrollbetrieb 2 (Betriebe über fortlaufende Nummern anonymisiert) mit Dendrogramm und Ähnlichkeiten der einzelnen Proben zueinander. Alle Profile in A und B weisen eine hohe Ähnlichkeit (> 80 %) zueinander auf. Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass sich die Kontrolltiere nicht signifikant von den Verdachtstieren unterscheiden.

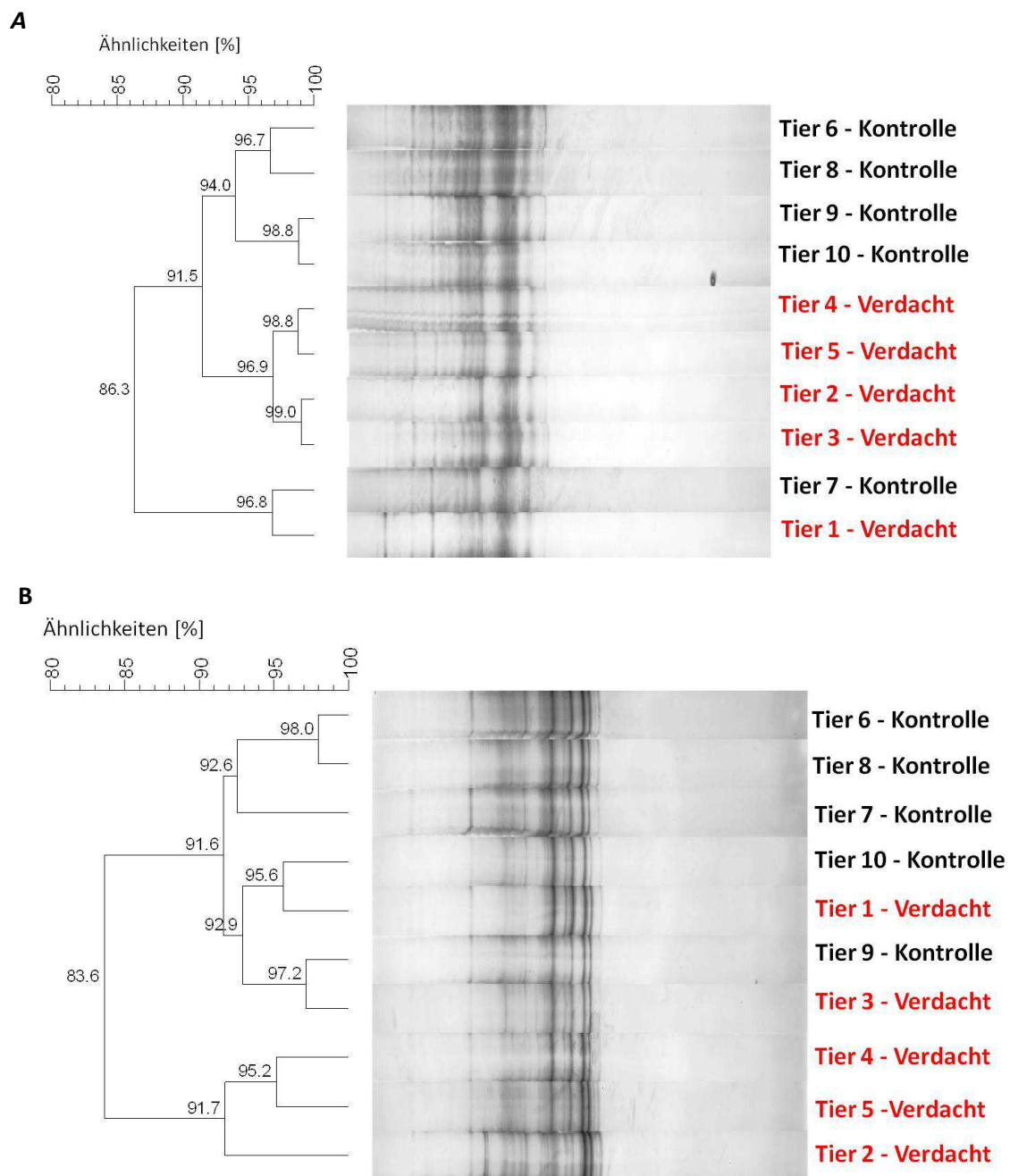


Abb. 4: SSCP-Gele für Betrieb 2 (Kontrollbetrieb); A Pansen, B Kot.

Abbildung 5 zeigt die SSCP-Profile der Gemeinschaft der *Clostridia* für den Verdachtsbetrieb 7 mit Dendrogramm und Ähnlichkeiten der einzelnen Proben zueinander. Alle Profile in A und B weisen eine hohe Ähnlichkeit (> 90 %) zueinander auf. Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass die Kontrolltiere sich nicht signifikant von den Verdachtstieren unterscheiden.

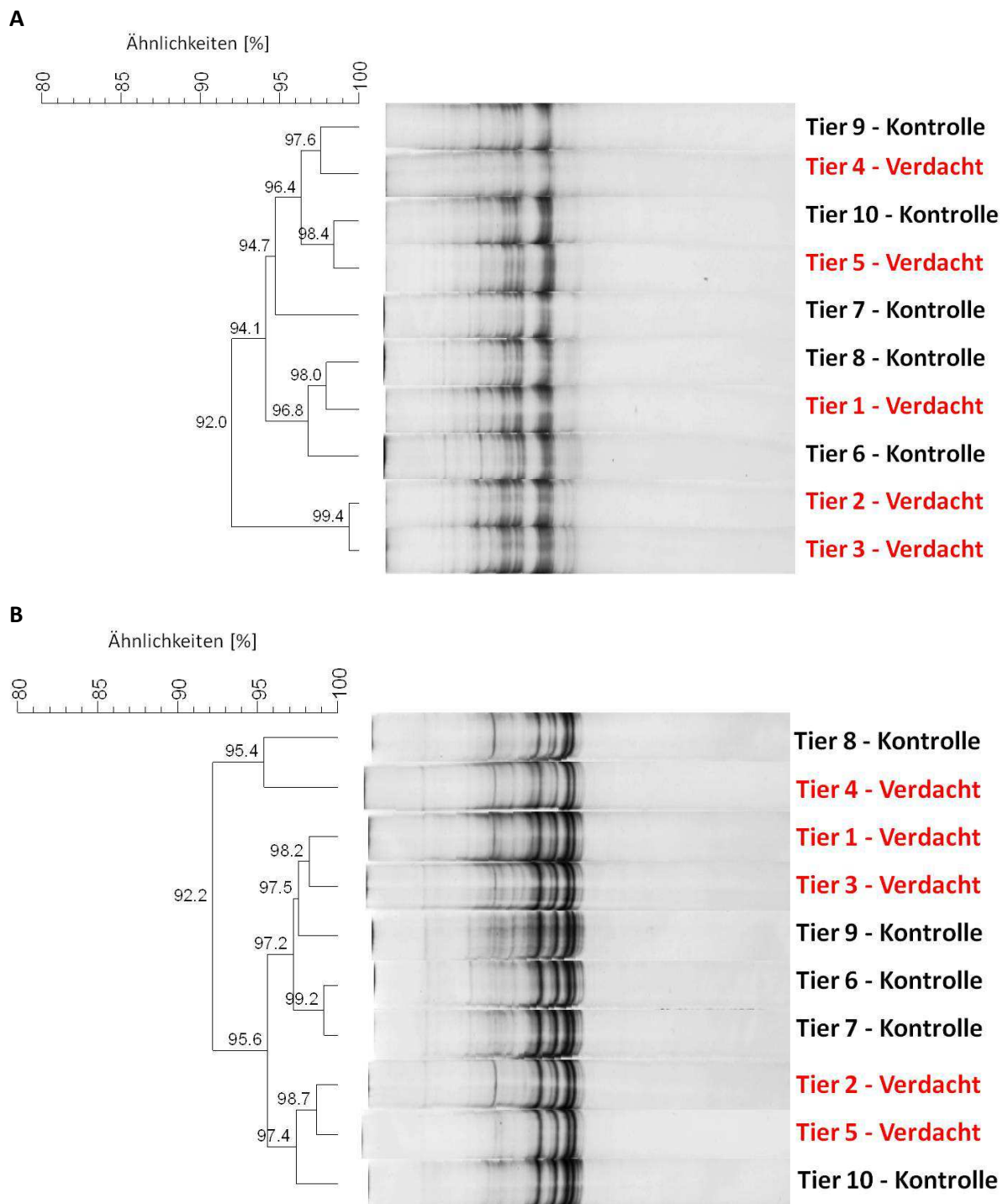


Abb. 5: SSCP-Gele für Betrieb 7 (Fall 1: Verdachtsbetrieb); A Pansen, B Kot.

Abbildung 6 zeigt die SSCP-Profile der Gemeinschaft der Clostridia für den Verdachtsbetrieb 13, in dem die Tiere geimpft waren, mit Dendrogramm und Ähnlichkeiten der einzelnen Proben zueinander. Die Mehrheit der Pansensaftproben in A zeichnet sich durch eine sehr hohe Ähnlichkeit von > 90 % der Profile zueinander aus. Tier 1 und Tier 8 zeigen dagegen kaum sichtbare Profile auf dem Bild. Für die Kotproben wurden Profil-Ähnlichkeiten von > 80 % festgestellt. Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass die Kontrolltiere sich nicht signifikant von den Verdachtstieren unterscheiden.

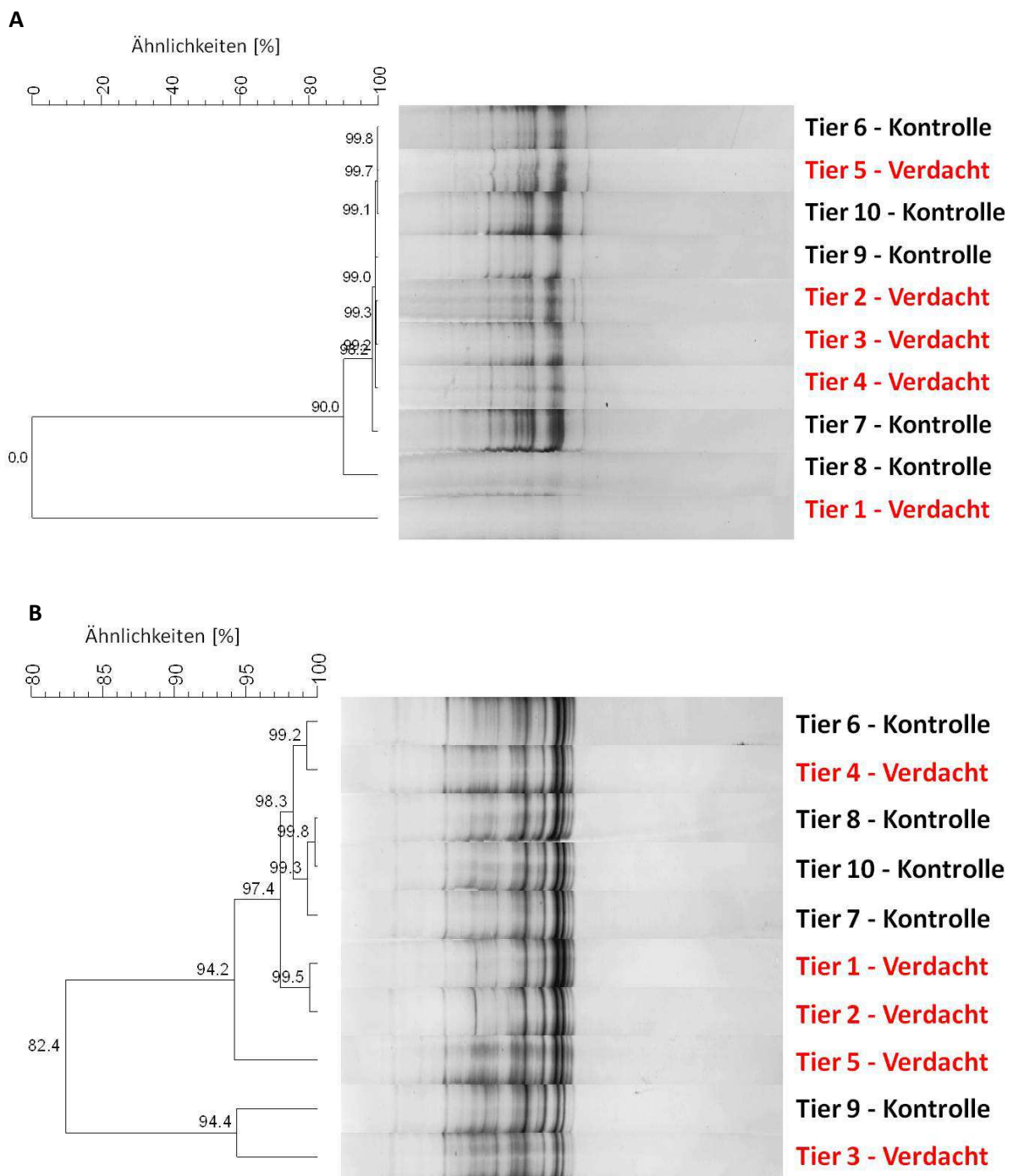


Abb. 6: SSCP-Gele für Betrieb 13 (Fall 2: Verdachtsbetrieb); A Pansen, B Kot.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der SSCP-Profile mit Hilfe des Programms PERMANOVA für Kot- und Pansensaftproben getrennt voneinander erfasst. Die Tabelle enthält Informationen über die Betriebsart (Kontrolle bzw. F1/F2), die anonymisierte Betriebsnummer sowie den p-Wert für den Vergleich der Kontroll- mit den Verdachtstieren für jeden Betrieb. Für die Pansensaftproben der Betriebe 6, 10 und 12 war die statistische Auswertung nicht möglich, da z.T. die Amplifizierung eines PCR-Produktes nicht gelang. Dies war auch der Fall für die Kotproben der Betriebe 5 und 8.

Für die Mehrheit der Proben konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Gemeinschaft der *Clostridia* zwischen den Kontroll- und den Verdachtstieren identifiziert werden ($p > 0,05$). Zwei Ausnahmen davon lagen für die Kotproben des Kontrollbetriebs 3 und des Verdachtsbetriebs 11 vor. Da auch die Profile dieser Betriebe bei Betrachtung sehr homogen waren, ist ein inhaltlicher Unterschied der Profile zwischen Kontroll- und Verdachtstieren auszuschließen, obwohl $p < 0,05$ ist. Vielmehr kam dieses Ergebnis aufgrund der nicht gleichmäßigen Silbernitrat-Färbung zustande, deren Hintergrund z.T. sehr stark war. Insgesamt ergaben sich demnach keine Unterschiede in der Gemeinschaft der *Clostridia* zwischen den Kontroll- und Verdachtstieren innerhalb eines Betriebes.

Tab. 14: Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels PERMANOVA (Kontrolltier vs. Verdachtstier; F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb).

Probe	Betriebsart	Anonymisierte Betriebsnummer	PERMANOVA
Pansen	K	1	p = 0,41
	K	2	p = 0,08
	K	3	p = 0,06
	K	4	p = 0,14
	K	5	p = 0,84
	F1	6	-
	F1	7	p = 0,31
	F1	8	p = 0,11
	F1	9	p = 0,25
	F1	10	-
	F2	11	p = 0,34
	F2	12	-
	F2	13	p = 0,34
	F2	14	p = 0,31
	F2	15	p = 0,08
Kot	K	1	p = 0,74
	K	2	p = 0,08
	K	3	p = 0,02*
	K	4	p = 0,12
	K	5	-
	F1	6	p = 0,54
	F1	7	p = 0,49
	F1	8	-
	F1	9	p = 0,09
	F1	10	p = 0,11
	F2	11	p = 0,03*
	F2	12	p = 0,90
	F2	13	p = 0,80
	F2	14	p = 0,45
	F2	15	p = 0,05

* $p < 0,05$ aufgrund ungleichmäßiger Silbernitrat-Färbung.

Insgesamt wurden keine fachlich relevanten Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* zwischen den Kontroll- und den Verdachtstieren für die Kontrollbetriebe, Fall 1-Betriebe

oder Fall 2-Betriebe gefunden. Es traten Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* zwischen Kot- und Pansensaftproben hinsichtlich desselben Betriebes auf. In weiteren Untersuchungen müsste daher geklärt werden, welche Speziesunterschiede den unterschiedlichen Profilen zugrunde liegen. Die vorliegenden Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels SSCP deuten darauf hin, dass das bei Rindern beobachtete Krankheitsbild ungeklärter Ursache sich nicht auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* im Kot/Pansen auszuwirken bzw. in keinem Zusammenhang mit einer veränderten mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* in Kot/Pansen zu stehen scheint.

Obwohl der Vorteil der SSCP-Analyse in der qualitativen Abbildung der Gesamtheit der mikrobiellen Gemeinschaft einer betrachteten Gruppe liegt, könnte ein Nachteil die Tatsache sein, dass die Methode eine begrenzte Auflösung hat. Es konnte in *in silico* Profilen für die SSCP-Analyse ebenso wie für die DGGE-Analyse gezeigt werden, dass nicht mehr als die Anzahl von 35 Banden in einer Spur abgebildet werden können, auch wenn die Diversität der Mikroorganismen in der Probe weiter ansteigt (Loisel et al. 2006). Ein weiterer Punkt ist die Möglichkeit des Auftretens von Co-Migration verschiedener Sequenzen (Fracchia et al. 2006, Schmalenberger u. Tebbe 2003, Witzig et al. 2010). Dies würde zu einer Unterschätzung der mikrobiellen Diversität führen oder auftretende Unterschiede verschleiern. Der wichtigste Vorteil jedoch der SSCP-Analyse ist, dass es eine Kultivierungs-unabhängige Methode zur Untersuchung komplexer mikrobieller Populationen inklusive der bisher unidentifizierten Spezies ist (Strobel et al. 2008, Witzig et al. 2010).

In diesem Teilprojekt wurden die Flüssigkeits-assoziierten Mikroorganismen im Pansen untersucht. Eine Untersuchung der partikelassoziierten Pansen-Mikroorganismen, die bekanntlich die Mehrheit im Pansen darstellen, wäre interessant gewesen, war jedoch aufgrund der Methode der Probennahme über eine Schlundsonde nicht realisierbar.

3.1.5 Zusammenhang zwischen chronischem Krankheitsgeschehen und dem Auftreten von *C. botulinum*

Der direkte Zusammenhang zwischen Nachweis von *C. botulinum* und dem Auftreten von chronischem Krankheitsgeschehen ist in den Tabellen 15 und 16 beschrieben. Das Odds Ratio für das Vorkommen von *C. botulinum* auf Betriebsebene beträgt 1,0909 (KI: 0,4787 – 2,4863). Im Rahmen dieser Studie kann mit dem aktuellen Stand der Auswertung mittels einfaktorieller univariater logistischer Regression somit ein direkter und deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *C. botulinum* und einem chronischen Krankheitsgeschehen auf Milchviehbetrieben nicht bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass *C. botulinum* nicht der wesentlichste Hauptverursacher des chronischen Krankheitsgeschehens ist. Es sind jedoch noch mehrfaktorielle Analysen durchzuführen und die Rolle potentieller Confounder zu untersuchen, bevor abschließende Aussagen darüber gemacht werden können, ob *C. botulinum* am chronischen Krankheitsgeschehen zumindest beteiligt ist.

Tab. 15: Beziehung zwischen dem Nachweis von *C. botulinum* (Neurotoxin-Gennachweis mittels PCR im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit der Tierärztlichen Hochschule Hannover und Friedrich-Löffler-Institut Jena) und chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben in Norddeutschland (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb).

Fall/Kontrollbetrieb	Nachweis von <i>C. botulinum</i> (BoNT-Gen)				Gesamt N
	positiv		negativ		
	Anzahl	Anteil in %	Anzahl	Anteil in %	
K	11	23,40	36	76,60	47
F1	10	22,22	35	77,78	45
F2	13	27,66	34	72,34	47
Gesamt	34	24,46	105	75,54	139

* Ein Betrieb wurde dann als positiv definiert, wenn mindestens eine Probe, die von einem Tier stammte, in mindestens einem Verfahren positiv war.

Tab. 16: Zusammenhang zwischen dem Status des Tieres (Kontrolltier vs. Verdachtstier) und dem Nachweis von *C. botulinum* (Neurotoxin-Gennachweis mittels PCR im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit der Tierärztlichen Hochschule Hannover und Friedrich-Löffler-Institut Jena). Daten von 1.389 Einzeltieren von 139 Betrieben in Norddeutschland (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb)

<i>C. botulinum</i> -Nachweis	Verdachtstiere		Kontrolltiere		OR	LCI	UCI	p-Wert
	Anzahl	Anteil in %	Anzahl	Anteil in %				
K								
positiv*	16	6,81	19	8,09	0.8306	0.4161	1.6577	0,5994
negativ (Ref.)	219	93,19	216	91,91				
F1								
positiv*	14	6,22	13	5,78	1.0820	0.4967	2.3571	0,8428
negativ (Ref.)	211	93,78	212	94,22				
F2								
positiv*	26	11,06	22	9,40	1.1988	0.6585	2.1822	0,5539
negativ (Ref.)	209	88,94	212	90,60				

*ein Tier ist dann als positiv eingestuft worden, wenn mindestens eine Probe in mindestens einem Nachweisverfahren auf *C. botulinum* positiv war; OR= Odds Ratio, LCI= unteres Konfidenzintervall, UCI= oberes Konfidenzintervall, p-Wert= p-Wert der logistischen Regression.

Auch auf Ebene der Einzeltiere bestätigte sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. botulinum* und dem Status als Verdachts- bzw. Kontrolltiere (Tab. 16).

Die beiden zentralen Hypothesen, dass es (1) Beziehungen gibt zwischen dem Auftreten von toxinogenem *C. botulinum* und chronischem Krankheitsgeschehen und (2) der Nachweis von toxinogenem *C. botulinum* bei einem chronisch kranken Tier mit seiner Herkunft aus einem Fallbetrieb in Verbindung steht, können zunächst nicht bestätigt werden. Momentan zeigen die Ergebnisse an, dass *C. botulinum* offensichtlich nicht als Hauptexpositionsfaktor für die Einordnung in einen Fallbetrieb in Frage kommt. Ob der Erreger in Verbindung mit anderen Faktoren an der Entstehung von chronischen Krankheitsgeschehen beteiligt ist, soll in weitergehenden komplexeren statistischen Analysen weiter untersucht werden.

3.1.6 Einteilung der Tiere in Kontroll- und Verdachtstiere

Für die Einzeltieruntersuchung wurden Verdachts- und Kontrolltiere ausgewählt. Verdachtstiere hatten den Habitus eines chronisch kranken Tieres (abgemagert, stumpfes Haarkleid) und noch mindestens ein weiteres offensichtliches für den chronischen Botulismus beschriebenes Symptom. Kontrolltiere durften keines dieser Symptome aufweisen. Darüber hinaus mussten sie einen Bewegungsscore von 1 aufweisen.

In Abbildung 7 ist die Häufigkeit der verschiedenen Symptome, die bei der Vorselektion bei den Verdachtstieren festgestellt wurden, unter Berücksichtigung der Betriebskategorie dargestellt. Lahmheit war bei mit 77-86 % das häufigste Symptom. Sie wurde bei den Tieren aus F2-Betrieben signifikant häufiger festgestellt als bei Tieren aus Kontrollbetrieben ($p < 0,05$). Ein positiver Venenpuls als Kreislaufsymptom wurde dagegen bei den Tieren aus Kontrollbetrieben signifikant häufiger gefunden als bei Tieren aus F2-Betrieben ($p < 0,05$). Als Trend ($p < 0,1$) traten bei den Tieren aus F2-Betrieben häufiger Zeichen einer Bulbärparalyse auf. Allerdings ist die Häufigkeit dieses Symptoms mit 3,0 % nur gering. Die F1-Betriebe unterschieden sich bei diesen Symptomen nicht von den beiden anderen Betriebskategorien. Für alle weitere Symptome unterschieden sich die Tiere der drei Betriebskategorien nicht voneinander ($p > 0,05$).

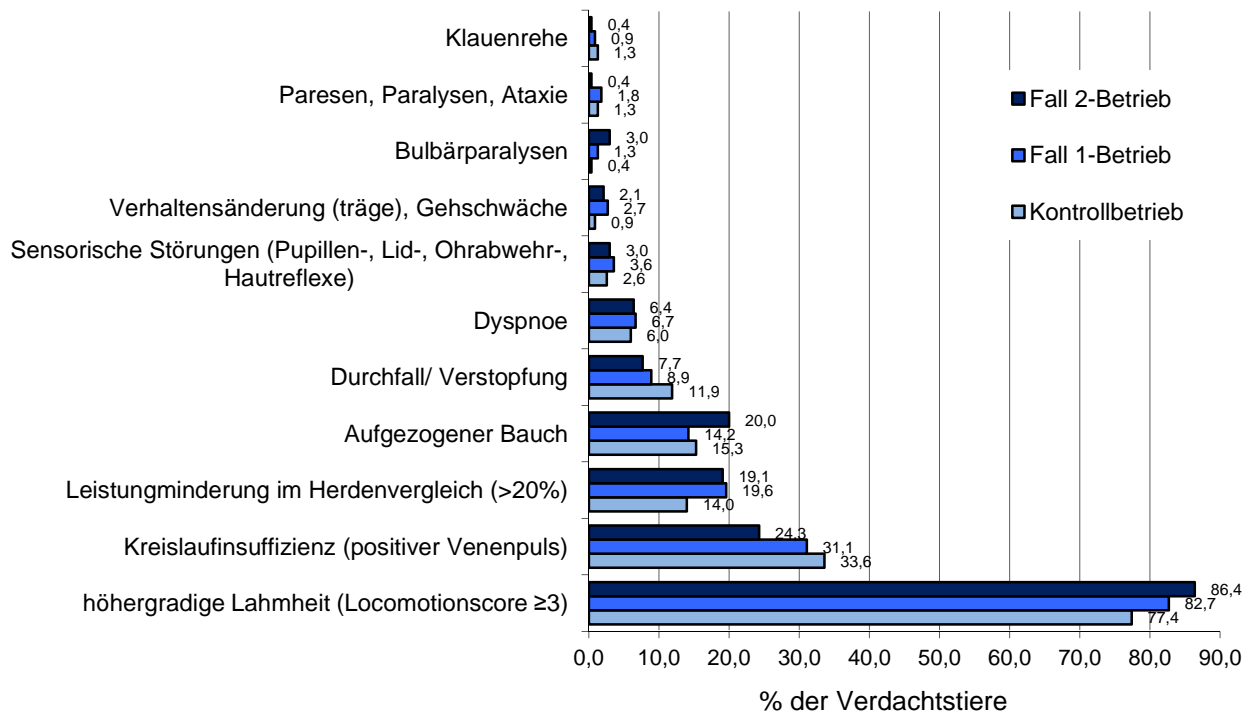


Abb. 7 Häufigkeit der bei der Selektion der Verdachtstiere (n=695) gefundenen Symptome. Mehrfachnennungen sind möglich.

3.1.7 Untersuchung der Einzeltiere

3.1.7.1 Klinische Untersuchung

Insgesamt wurden 1.389 Tiere einer gründlichen klinischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurden pro Tier für die verschiedenen Organsysteme 86 Befunde erhoben. Die für jedes Organsystem zehn (Euter fünf) häufigsten Abweichungen sind in den Tabellen 25-27 im Anhang aufgeführt. Insgesamt kamen bei diesen 75 Befunden Abweichungen sowohl bei Verdachts- als auch bei Kontrolltieren vor. Viele der Befunde wurden aber bei den Verdachtstieren signifikant häufiger nachgewiesen als bei den Kontrolltieren (Tab. 17). Eine Beziehung zur Herkunft der Tiere aus Fall- oder Kontrollbetrieben bestand für die meisten Merkmale nicht, so dass die Abweichung von Normalbefunden eher auf den Einzeltierstatus (chronisch krank vs. Kontrolle) als auf seine Herkunft aus einer bestimmten Betriebskategorie zurückzuführen ist. Bei den Verdachtstieren wurden in Fallbetrieben häufiger ein herabgesetzter Mimiktonus und eine Kronsaum-Weichteilschwellung festgestellt als in Kontrollbetrieben. Insgesamt deutet dieses Ergebnis daraufhin, dass in Betrieben mit chronischen Krankheitsgeschehen kein einheitliches klinisches Bild, welches für eine bestimmte Erkrankung wie z.B. den sgVB spricht, ermittelt werden konnte. Eine multivariate Auswertung der Ergebnisse und die Zuordnung positiver BoNT-Ergebnisse zu klinischen Befunden stehen noch aus.

Tab. 17: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Häufigkeit von klinischen Befunden zwischen Verdachts- ($n=695$) und Kontrolltieren ($n=694$) für unterschiedliche Organsysteme bzw. den Komplex „unspezifische Krankheitssymptome“.

Herz-/Kreislaufapparat			Neurologie		
Symptom	V %	K %	Symptom	V %	K %
Gefüllte Jugularvene	52,5	12,4	Speichelmenge ↑	36,9	29,4
Veränderte Herzintensität	50,1	26,7	Schwanztonus ↓	22,3	14,8
Schlecht abgesetzte Herztöne	20,9	14,4	Nervöses Verhalten	19,6	26,8
Endokardiale Nebengeräusche	17,8	9,2	Verzögerter Pupillarreflex	18,1	10,6
Positiver Venenpuls	14,4	0,4	Oberschenkelreflex ↓	12,4	8,8
Exokardiale Nebengeräusche	8,9	2,6	Pannikulusreflex ↓	7,6	3,0
Schwanzspitzennekrose	7,7	2,5	Speichelviskosität ↑	5,8	2,3
Atmungstrakt			Verdauungstrakt		
Symptom	V %	K %	Symptom	V %	K %
Verschärfte Lungengeräusche	40,6	14,9	Abweichende Kotkonsistenz	44,3	34,8
Dyspnoe	18,3	7,4	Pansenintensität ↓	22,4	11,7
Blasse Maulschleimhaut	11,3	3,3	Veränderte Pansenschichtung	17,3	11,0
Purulenter Nasenausfluss	3,6	2,5	Kotbeimengung-Schleim	11,7	16,7
Röhrenatmen	2,8	0,1	Kotfarbe verändert	11,0	6,1
Harn- und Geschlechtstrakt			Bewegungsapparat		
Symptom	V %	K %	Symptom	V %	K %
Vulvaschrägstellung	62,2	26,8	Tarsus-periartikuläre Schwellung	50,9	35,7
Abweichende Ovarbefunde	30,7	12,9	Carpus-periartikuläre Schwellung	41,8	27,4
Uterusfluktuation	9,4	4,6	Kronsaum-Weichteilschwellung	20,5	1,2
Nierenvergrößerung	7,2	2,6	Fesselgelenk vermehrt gefüllt	11,4	6,2
Urovagina	5,6	1,3	Knie-periartikuläre Schwellung	8,3	2,1
Mangelhafter Vulvaschluss	2,9	0,4	Fesselgelenk-periartikuläre Schwellg.	8,5	0,9
Pneumovagina	2,7	0,1	Carpalgelenk vermehrt gefüllt	8,0	5,2
Unspezifische Symptome			Euter		
Symptom	V %	K %	Symptom	V %	K %
Stumpfes/struppiges Haarkleid	89,9	16,3	Sekret verändert	9,3	3,6
Hohlschwanz	78,8	15,4			
Klauenpflegezustand schlecht	61,3	30,7			
Hautverletzungen	60,5	19,4			
Bauchdeckenspannung ↑	54,0	15,5			
Kyphose	48,9	5,0			
Gliedmaßenstellung abw.	36,2	0,1			
Umfangsvermehrungen	33,9	9,5			
Aufgezogener Bauch	24,2	0,0			
Füllung Episkleralgefäße ↑	19,7	12,9			

3.1.7.2 Klinisch-chemische Untersuchung

Die Auswertung der klinisch-chemischen Untersuchung ergab im Vergleich der Verdachtstiere mit den Kontrolltieren innerhalb einer Betriebskategorie einen deutlich erniedrigten Wert der Glutaraldehydprobe (GAP), erhöhte Gesamteiweißgehalte, sowie erniedrigte Vitamin A-, Vitamin E- und Selengehalte ($p < 0,05$). Dies deutet einerseits auf ein aktuell stattfindendes Entzündungsgeschehen hin (GAP, Gesamteiweiß), während andererseits die Vitamin A-, Vitamin E- und Selenversorgung bei den Verdachtstieren unausgeglichen ist. Bei gleicher Futtergrundlage

innerhalb eines Betriebs könnte dies entweder auf eine unzureichende Futteraufnahme oder einen erhöhten Bedarf an Antioxidantien im Rahmen von Entzündungsprozessen sprechen. Die Daten zur klinisch-chemischen und Blutuntersuchung finden sich in Tabelle 28-29 im Anhang.

3.1.7.3 Differentialdiagnosen

Zur Abklärung möglicher Differentialdiagnosen wurden ein Antikörper(AK)-Screening (Chlamydien, Coxiellen, Lungenwürmer, Leberegel), eine parasitologische Kotuntersuchung (Magen-Darm-Würmer, Lungenwürmer, Leberegel, Kokzidien) und eine kulturell mikrobiologische Untersuchung (Para-Tbc, Salmonellen) durchgeführt.

Salmonellen wurden aus dem Kot der Einzeltiere nicht nachgewiesen. Von den bisher vorhandenen Ergebnissen (n=127 Betriebe) der Untersuchung von Poolproben (Pool-Verdachtstiere[V], Pool Kontrolltiere[K] auf Para-Tbc gab es einen positiven Nachweis eines Pool-V in einem Kontrollbetrieb. In den F1-Betrieben wurden jeweils zwei positive Pool-V und Pool-K bestimmt, während für die F2-Betriebe zwei positive Pool-V detektiert wurden. Bezogen auf die Gesamtzahl an Poolproben pro Betrieb ergab sich zum jetzigen Zeitpunkt damit eine Frequenz positiver Ergebnisse von 1,25 % (K), 4,5 % (F1) und 4,7 % (F2). Positive Nachweise fanden sich häufiger bei Verdachtstieren als bei Kontrolltieren.

Tab. 18: Nachweis von Chlamydien-, Coxiellen-, Lungenwurm- (Serum von 10 Einzeltieren pro Betrieb) und Leberegel-Antikörpern (AK; Tankmilch), von Parasiteneiern im Kot (Einzelproben von 10 Tieren pro Betrieb) und *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP) (2 Poolproben pro Betrieb). Ein Betrieb galt als positiv, wenn mind. eine Probe von 10 Einzeltieren, mind. 1 Poolprobe oder die Tankmilchprobe positiv waren (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb).

	Positive Betriebe (%)		
	K-Betrieb (n=47) % (n)	F1-Betrieb (n=45) % (n)	F2-Betrieb (n=47) % (n)
Chlamydien-AK	95,7 (45)	93,3 (42)	95,7 (45)
Coxiellen-AK	61,7 (29)	48,9 (22)	44,7 (21)
Lungenwürmer-AK	23,4 (11)	28,9 (13)	23,4 (11)
Leberegel-AK	17,0 (8)	24,4 (11)	14,9 (7)
Kokzidien-Eier	53,2 (25)	66,7 (30)	51,1 (24)
MDW-Eier	31,9 (15) ^a	53,3 (24) ^b	34,0 (16) ^{a,b}
Leberegel-Eier	8,5 (4)	8,9 (4)	8,5 (4)
Lungenwurm-Eier	6,4 (3)	13,3 (6)	6,4 (3)
MAP ¹	2,5 (1)	9,1 (4)	4,7 (2)

¹Auswertung bezieht sich auf aktuell n=127 Betriebe (K: n=40; F1: n=44; F2: n=43)

Häufigkeiten mit unterschiedlichen Buchstabenindices sind statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; χ^2 -Test)

In Tab. 18 sind die Ergebnisse des AK-Screenings sowie der parasitologischen Untersuchung auf Betriebsebene dargestellt. Ein Betrieb galt als positiv, wenn mind. eine Probe von 10 Einzeltieren, mind. 1 Poolprobe oder die Tankmilchprobe positiv waren. Auffällig ist Betriebstyp-übergreifend der hohe Anteil von AK bei Chlamydien sowie Coxiellen. Auch die Belastung mit Parasiten wie Lungenwürmern, Magen-Darm-Würmern (MDW, Kokzidien und Leberegeln ist bemerkenswert. In

den F1-Betrieben schien insgesamt die Belastung mit Parasiten höher zu sein, als in den beiden anderen Betriebsgruppen. Signifikante Unterschiede zwischen den Betriebskategorien sind mit Ausnahme der Häufigkeit von MDW-Eiern (F1-Betriebe mehr belastet) jedoch nicht vorhanden. Bis auf Befall mit MDW dürften daher die anderen Infektionen nicht für eine Zuordnung in eine bestimmte Betriebskategorie maßgeblich verantwortlich sein.

3.1.7.4 Klauenbefunde

Von insgesamt 584 lahmen Verdachtstieren wurden 1.187 Beine untersucht (56 Vorderbeine, 1.131 Hinterbeine). Die folgende Auswertung berücksichtigt nur die Hinterbeine. Die Befunde werden pro Bein aufgelistet. Bei dem Zusammenfassen der Außen- und Innenklaue zu einem Bein wurde für das Bein die stärkste Ausprägung einer der beiden Klauen angenommen. Die erhobenen Befunde und Diagnosen auf Beinebene finden sich in Abbildung 8. Das Fehlen von Pflegespuren, zu lange Klauen, fehlende Hohlkehlung, ein flacher Ballen und axiale Wandbeschädigung sprechen für mangelnde und fehlerhafte Klauenpflege. Sehr häufig findet sich eine fehlende Hohlkehlung (63,3 %) und das Fehlen von Pflegespuren (39,6 %) als Ausdruck einer schon länger zurückliegenden Klauenpflege. Rusterholz'sche (RSG) und Klauensohlengeschwüre in unterschiedlicher Ausprägung kommen an 53,4 % der untersuchten Hinterbeine vor. Reheveränderungen finden sich an fast 80 % der Hinterbeine. Ausprägungen sind konkave Dorsalwand (47,7 %), Reheringe (48,6 %), Wanddefekte (44,5 %), doppelte Sohle (39,8 %) und Verfärbungen der Sohle (40,4 %). Dermatitis interdigitalis im Ballenbereich (Ballenfäule) findet sich an 80 % der Beine. Fäuleveränderungen wurden aber auch im Zwischenklauenbereich angetroffen (17,7 %). Dermatitis digitalis (Mortellaro) wurde an 48,2 % der Beine festgestellt. Phlegmonöse Veränderungen im Fußbereich wurden in 16,7 % der Fälle gefunden. Sie waren i.d.R. mit anderen Befunden vergesellschaftet und sind ein Ausdruck einer schwerwiegenden schon weit fortgeschrittenen Klauenerkrankung mit eher ungünstiger Prognose. Zu beachten ist, dass meistens mehrere Befunde und Diagnosen an einem Bein in unterschiedlicher Ausprägung festgestellt wurden. Insgesamt konnte als Ursache der Lahmheit in der Mehrzahl der Fälle eine Mitbeteiligung der Klauen an den Hintergliedmaßen festgestellt werden. Als lahmheitserschwerend kommen dann noch die beobachteten peri- und artikulären Entzündungen hinzu (Tab. 17). Für sechs Befunde/Diagnosen konnte ein Bezug zur Betriebskategorie hergestellt werden: Klauenpflegespuren, flacher Ballen, fehlende Hohlkehlung, RSG, doppelte Sohle und Limax. Dabei waren aber nur RSG und doppelte Sohle in beiden Fall-Kategorien häufiger als in Kontrollbetrieben ($p < 0,05$), während sich für die anderen vier Variablen keine eindeutigen Beziehungen zum Fall-Status herleiten ließen. Kontrollbetriebe unterschieden sich damit nicht von beiden Fall-Betriebskategorien oder hatten häufiger Befunde als mindestens ein Fall-Betriebstyp. In weiteren Auswertungen wird noch der Grad der Ausprägung berücksichtigt, um eventuelle Unterschiede zwischen den Betriebskategorien zu identifizieren. Möglicherweise sind nicht so sehr die Häufigkeiten des Auftretens verschieden, sondern höhergradige Veränderungen könnten in Verdachtsbetrieben häufiger vorkommen als in Kontrollbetrieben.

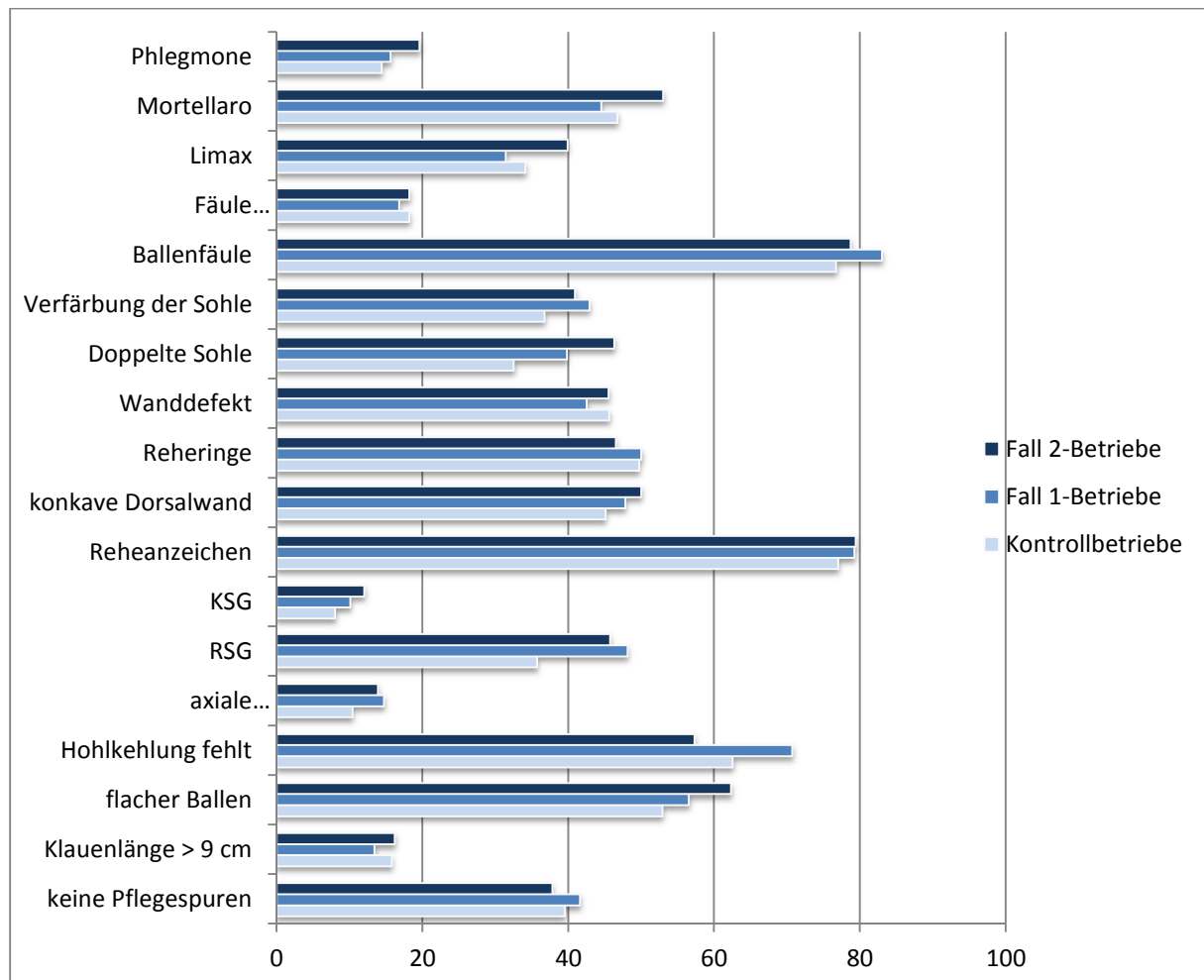


Abb. 8: Häufigkeit von Befunden und Diagnosen an den Hinterbeinen (n=1.131) von insgesamt 584 lahmen Verdachtstieren.

3.1.8 Kontrolle der Fütterung – Rationsberechnung

Die Kontrolle der Fütterung umfasst verschiedene Aspekte. Neben der rechnerischen Überprüfung der Ration, bei der u.U. verschiedene Leistungsgruppen und unterschiedliche Rationstypen (Komponentenfütterung, Totale Mischration [TMR], aufgewertete Mischration [AMR]) berücksichtigt werden müssen, sind die Futtevorlage sowie die Aufnahme und Umsetzung der Ration im Tier von Bedeutung. Zur Beurteilung gehört die Begutachtung des Futters am Futtertisch, die Bestimmung der Körperkondition i.d.R. mittels BCS sowie die Analyse der MLP-Daten. Von Wichtigkeit ist weiter die Qualität der eingesetzten Futtermittel, insbesondere Grobfuttermittel (Grassilage, Maissilage, Heu, Stroh) in Hinsicht auf die sensorische und mikrobiologisch-hygienische Beschaffenheit. Die Fütterung konnte bisher in ihrer Komplexität noch nicht vollständig analysiert werden. Einige Variablen hierzu wie z.B. BCS, Futterqualität etc. wurden im hypothesenprüfenden Ansatz ausgewertet. In diesem Abschnitt werden erste Ergebnisse der rechnerischen Rationsüberprüfung präsentiert.

Die Berechnung der Ration erfolgte unter Berücksichtigung von Grundfutteranalysen, die in den meisten Fällen vorlagen. Die Grobfuttermitteleration, Grundration mit Kraftfutter bei durchschnittlicher Milchleistung sowie Grundration mit Kraftfutter bei maximaler Milchleistung wurden für drei Laktationsstadien (< 100 Tage, 101-200 Tage und > 200 Tage) berechnet. Als Grobfuttermittel werden Grassilage, Maissilage, Heu, Stroh, Frischgras und Weide bezeichnet. Die Grundration ist

definiert als diejenige Ration, welche am Futtertisch vorgelegt wird. Sie enthält die Grobfuttermittel und Ergänzungsfuttermittel zum Ausgleich von Rohprotein (z.B. Soja, Raps) und Energie (z.B. Getreidemischung) sowie Mineralstoffmischungen. Bei der TMR sind alle Komponenten in einer Ration zusammengemischt. Eine AMR hat i.d.R. einen niedrigeren Energiegehalt und Kraftfutter wird individuell über Kraftfutterstationen nach Leistung zugefüttert. Die Berücksichtigung der maximalen Kraftfuttergabe ist wichtig, um die Wiederkäuergerechtigkeit einer AMR bei hohem Leistungsniveau zu beurteilen. Die Zahlenwerte und die Ergebnisse einer ersten univariaten statistischen Analyse (Wilcoxon-Test) finden sich im Anhang (Tab. 30-32). In Tabelle 19 ist exemplarisch ein Vergleich zwischen Kontroll- und Fallbetrieben für die drei berechneten Rationen für die Laktationsgruppe früh (≤ 100 Tage) dargestellt. Insgesamt ist hier zu erkennen, dass zumindest rein rechnerisch K-Betriebe eine höhere Milchbildung aus Energie und nutzbarem Rohprotein (nXP) als F-Betriebe erreichen. Dieses wird nicht so sehr über zugefüttertes Kraftfutter erreicht als vielmehr über eine höhere Grobfutter-TS-Menge und höhere Energiegehalte im Grobfutter, was schon bei der Grobfutterration zu einer höheren Milchbildung führt. Die Grobfutterleistung ist also bei K-Betrieben besser als bei F-Betrieben. Die Ursache ist vermutlich darin zu sehen, dass in Kontrollbetrieben ein höherer Anteil an Maissilage im Vergleich zu Grassilage gefüttert wird ($p < 0,05$). Die bessere errechnete Milchbildung aus der Ration trägt also zu einer höheren durchschnittlichen täglichen Milchleistung bei (Tab. 20).

Tab. 19: Vergleich der Rationskennzahlen der berechneten Rationen unter Berücksichtigung des Betriebsstatus (Kontrolle [K], Fallbetriebe [F1 und F2 zusammengefasst]). Die Pfeile (\uparrow / \downarrow) bedeuten, dass die Kennzahl in K-Betrieben höher bzw. niedriger waren, \pm bedeutet kein Unterschied. Zugrunde gelegt wurde die Ration für Kühe im Laktationsstadium bis 100 Tage nach der Abkalbung.

	Grobfutterration	Grundration mit Kraftfutter bei durchschnittlicher Milchleistung	Grundration mit Kraftfutter bei maximaler Milchleistung
TS ¹ Vorlage kg	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Rohasche g/kg TS	\downarrow	nicht berechnet	nicht berechnet
Energie NEL/kg TS	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Rohfaser g/kg TS	\downarrow	\downarrow	\pm
Strukturierte Rohfaser %	\pm	\downarrow	\pm
Stärke u. Zucker g/kg TS	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Rohprotein g/kg TS	\downarrow	\pm	\pm
Nutzbares Rohprotein (nXP) g/kg TS	\pm	\uparrow	\pm
RNB ² g	\downarrow	\pm	\pm
Milch kg aus NEL	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Milch kg aus nXP	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Individuelles Kraftfutter (kg)	trifft nicht zu	\pm	\pm

¹TS = Trockensubstanz

²RNB = ruminale Stickstoffbilanz

Tab. 20: Durchschnittliche tägliche Milchleistung (kg) von drei Laktationsgruppen im Vergleich zwischen Kontroll- und Fallbetrieben.

Laktationsgruppe	Tage in Laktation	Milchleistung kg	
		Kontrollbetrieb MW \pm SD ¹	Fallbetrieb MW \pm SD
früh	≤ 100 Tage	36,7 \pm 4,0 ^a	31,4 \pm 4,7 ^b
mittel	101 bis 200 Tage	31,2 \pm 3,4 ^a	27,3 \pm 4,8 ^b
spät	mehr als 200 Tage	23,0 \pm 3,9 ^a	19,9 \pm 3,9 ^b

¹= Mittelwert \pm Standardabweichung in einer Zeile: a vs. b: p < 0,0001 (Wilcoxon-Test)

3.1.9 Risikofaktoren für Clostridien in Bezug zum chronischen Krankheitsgeschehen

In dem Interview mit den Landwirten vor Ort wurde nach Risikofaktoren für eine mögliche Clostridienbelastung gefragt, die von Tierärzten, Landwirten und der jeweiligen Fachpresse immer wieder diskutiert werden. Insgesamt wurden 74 Variablen ermittelt, von denen 70 aus dem Betriebsfragebogen (Interview) und vier aus der Beurteilung des Silos durch die Studientierärzte stammten. Inhaltlich geht es um die Intensität und das Management der Grünlandnutzung, Art der Düngung, Vorhandensein einer Biogasanlage, Art und Verwendung der Gärsubstrate und -reste, Belastung der Flächen durch andere Tierarten (Wild, Wassergeflügel, Schädner), Auslauf und Weide für die unterschiedlichen Laktationsgruppen, Silobau, Erntetechnik (Schnitthöhe), Silierdauer und hygienischer Status der Silos. Diese Faktoren wurden in der Vergangenheit als Risikofaktoren für ein vermehrtes Vorkommen von *C. botulinum* genannt. Sie wurden hier zunächst nicht in Bezug zum Vorkommen von verschiedenen Clostridien-Spezies getestet sondern direkt auf einen Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines chronischen Krankheitsgeschehens (Fall-/Kontrollstatus) untersucht.

Dreiundzwanzig Variablen (31,1 %) zeigten keine Variabilität bei den drei verschiedenen Betriebskategorien (K, F1, F2). Diese sind mit der Richtung der Ausprägung in Tabelle 33 im Anhang aufgeführt. Ein beträchtlicher Anteil an Variablen (n=41; 55,4 %) unterschied sich nicht zwischen den Betriebskategorien und kommt damit kaum als Risikofaktor für das Vorkommen von chronischem Krankheitsgeschehen in Frage. Diese sind in Tabelle 34 und 35 im Anhang aufgelistet. Bei 10 Variablen (13,5 %) konnten Unterschiede zwischen den Betriebsgruppen festgestellt werden (Tab. 21). Bei der Interpretation ist zu berücksichtigen, dass es sich zunächst nur um eine einfaktorielle Auswertung handelt. Die Assoziation von Variablen untereinander und die Gewichtung des Einflusses sind Gegenstand weiterer Auswertungen.

Als möglicher Risikofaktor für eine Zuordnung zu einem Fallbetrieb ergeben sich danach die Weidehaltung für Laktierende, die mit der Verfügbarkeit von Weide (Anzahl ha Weide) in Verbindung steht, ein verfrühtes Öffnen oder sogar ein fehlender Verschluss des Maissilos sowie die Verwendung von Mist als Biogasanlagen-Input. Bezüglich letzterem muss einschränkend gesagt werden, dass nur 41 Betriebe Angaben hierzu gemacht haben. In dieser Studie konnte bis zum Stand der jetzigen Auswertung kein positiver Zusammenhang zwischen der Verwendung von Glyphosat, dem Vorkommen von Tauben, der Verwendung von Schweinegülle als Gärsubstrat und der Verfütterung von Biertreber und Auftreten chronischer Krankheitssymptome gezeigt werden. Zum Teil ist gar ein gegenteiliger Trend erkennbar (Tab. 21).

Tab. 21: Variablen zu der Thematik „Risikofaktoren für Clostridien in Bezug zum chronischen Krankheitsgeschehen“ aus der Befragung der Landwirte (n=70) und der sensorischen Überprüfung der Silos durch die Studentierärzte (n=4), die sich statistisch signifikant zwischen den Betriebskategorien unterscheiden (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb; Chi²-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Variable	Betriebskategorie		
	Kontrolle	Fall-1	Fall-2
Anzahl ha Weide (MW±SD)	5,2 ± 6,4 ^{a1}	9,9 ± 11,2 ^b	8,1 ± 8,5 ^{a,b2}
n	46	45	47
Einsatz von Glyphosat (%)	87,2 ^a	76,7 ^{a,b}	62,2 ^b
n	41	33	28
Mist als Biogasanlagen-Input (%)	31,3 ^a	70,0 ^{a,b,1}	73,3 ^{b,2}
n	5	7	11
Gülle/Kot vom Schwein als Biogasanlagen-Input (%)	46,7 ^a	0,0 ^{b,1}	40,0 ^{a,b,2}
n	7	0	6
Vorkommen von Tauben (%)	93,6 ^{a,1}	80,0 ^{a,b,2}	76,6 ^b
n	44	36	36
Weide-Laktierende ≤ 100 d in Milch (%)	31,9 ^a	56,8 ^b	46,8 ^{a,b}
n	15	25	22
Weide-Laktierende 101-200 d in Milch (%)	34,0 ^a	62,2 ^b	48,9 ^{a,b}
n	16	28	23
Weide-Laktierende > 200 d in Milch (%)	36,2 ^a	64,4 ^b	48,9 ^{a,b}
n	17	29	23
Silierdauer mind. 1 Maissilage < 3 Wochen (%)	21,7 ^{a,1}	39,0 ^{a,b,2,x}	40,0 ^{b,y}
n	10	16	18
Verfütterung von Biertreber (%)	19,1 ^a	11,1 ^{a,b}	4,3 ^b
n	9	5	2

Innerhalb eine Zeile: a vs. b: p < 0,05; 1 vs 2 und x vs. y: p < 0,1

3.1.10 Hypothesenprüfender Ansatz zur Ermittlung möglicher Risikofaktoren für chronisches Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben

Basierend auf dem ätiologischen Diagramm wurden 58 Variablen zur Analyse zusammengestellt. Für den übergeordneten Faktor „Knowhow, Arbeitsbelastung und Motivation des Landwirtes, systematische Arbeitsweise des Landwirtes“ konnten keine Variablen ausgewählt werden, da dieser Faktor nicht Teil der ursprünglichen Fragestellung des Verbund-Projektes war. Für den Faktor „latente Pansenazidose“ konnten ebenfalls keine Variablen definiert werden, da die pH-Wert-Messung in der Pansenflüssigkeit aufgrund einer häufigen Kontamination mit Speichel keine verlässlichen Werte ergab. Auch für die beiden Faktoren Stress und Immunstatus konnten keine Variablen bestimmt werden. Die Ergebnisse der deskriptiven und einfaktoriellen Analyse sind getrennt nach quantitativen und qualitativen Variablen im Anhang dargestellt (Tab. 36 und 37).

Es wurde festgestellt, dass nur ein Betrieb eine Boxenbreite von ≥ 120 cm hatte, so dass sämtliche anderen Betriebe unabhängig von ihrem Betriebsstatus im Durchschnitt zu schmale Boxenbreiten aufwiesen verglichen mit den publizierten Sollwerten (CIGR 1994). Diese Variable wurde aufgrund ihrer zu geringen Variabilität von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die deskriptive Auswertung zeigte weiterhin, dass auf Fallbetrieben durchschnittlich etwa zwei Drittel der Herde nicht lahmheitsfrei liefen. Etwa 10 % der Herde zeigten auf Fallbetrieben durchschnittlich eine so

hochgradige Lahmheit, dass das betroffene Bein wenig oder gar nicht mehr belastet wurde. Auch auf Kontrollbetrieben war die Prävalenz lahmer Tiere relativ hoch, aber dennoch erhöht sich die Chance zu einem Fallbetrieb zu werden um 113 %, wenn der Anteil von Lahmheiten in einer Herde um 10 Prozentpunkte steigt. Als mögliche Ursache für Lahmheiten fiel insbesondere Mortellaro auf. Auch wenn Mortellaro durchaus auf Kontrollbetrieben ein Problem darstellte, so zeigten sich auf Fallbetrieben signifikant häufiger hochgradige Befunde. Hinsichtlich der Klauenpflege fielen in Kontrollbetrieben deutlich weniger Tiere mit schlechtem Klauenpflegezustand auf als in Fallbetrieben, wobei es auch eine Gruppe von Fallbetrieben gab, bei denen der Klauenpflegezustand der Tiere besser war als in Kontrollbetrieben. Es könnte sein, dass durch das verstärkte Auftreten von Lahmheiten auf einigen Fallbetrieben bereits Gegenmaßnahmen getroffen worden sind, während andere Betriebe noch keine konsequente Klauenpflege betreiben.

Bezüglich der Körperkondition bestätigte sich, dass auf Fallbetrieben mehr Tiere unterkonditioniert waren. So gab es hier nicht nur mehr Tiere mit einem BCS < 2,5, sondern auch signifikant mehr Tiere unterhalb der unteren Grenze für das jeweilige Laktationsstadium und weniger Tiere über der oberen Grenze.

Bei der Eutergesundheit hat sich der vermutete Zusammenhang hingegen nicht bestätigt und auch bezüglich der Fruchtbarkeit zeigte allein die Zwischenkalbezeit einen Unterschied zwischen Fall- und Kontrollbetrieben auf. Dieser Faktor wurde rückblickend und anhand relativ genauer Angaben erhoben und deutet darauf hin, dass auf Fallbetrieben durchaus eine schlechtere Fruchtbarkeit eine Rolle spielen kann.

Auch bezüglich des Kuh-Komforts bestätigten sich Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben: So wiesen Fallbetriebe einen niedrigeren Kuh-Komfort-Index, Wiederkau-Index und schlechtere Boniturergebnisse für Hautläsionen an Liegeflächen und Steuerelementen auf. Eine mögliche Ursache für Hautläsionen kann das häufigere Vorkommen von Hochboxen und nicht eingestreuten Liegeboxen auf Fallbetrieben sein. Bezüglich der Boxenmaße zeigten sich keine Unterschiede. Auch bezüglich der Faktoren Tier-Fressplatz-, Tier-Tränkeplatz- und Tier-Liegebox-Verhältnis zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollbetrieben. Während das Tier-Liegebox-Verhältnis meist ausgeglichen war, gab es im Durchschnitt zu wenig Fressplätze und Tränkeplätze. Es kann jedoch vermutet werden, dass die Kühe das mangelnde Angebot an Fressplätzen auf Kontrollbetrieben besser ausgleichen können, da hier durchschnittlich eine größere Menge an Futter pro Tier vorgelegt wird und das Futter häufiger an das Fressgitter herangeschoben wird. Zudem weist das Futter im Mittel eine höhere Energiedichte auf und ist von besserer sensorischer wie auch mikrobiologischer Qualität. Bezüglich eines abweichenden Trockensubstanz-Gehaltes, eines erhöhten Rohaschegehaltes oder eines zu hohen pH-Wertes im Grobfutter ließen sich zwischen Fall- und Kontrollbetrieben keine Unterschiede feststellen. Kontrollbetriebe wiesen häufiger ein abweichendes Reineiweiß/Rohprotein-Verhältnis- wie auch eine schlechtere Rohfaserversorgung auf als Fallbetriebe.

Die Sauberkeit der Tiere erfüllte auf Fall- wie auf Kontrollbetrieben nur in Ausnahmefällen die empfohlenen Anforderungen (Cook 2007). Jedoch waren die Tiere auf Fallbetrieben durchschnittlich stärker verschmutzt als auf Kontrollbetrieben. Dies erklärt sich durch die Verschmutzung der tiernahen Umgebung. Liege- wie auch Laufflächen wurden auf Fallbetrieben häufiger als dreckig oder eher dreckig beurteilt.

Bezüglich möglicher Differentialdiagnosen konnte bislang nur ein Unterschied bei dem Befall mit Magen-Darm-Würmern festgestellt werden. Dennoch könnte auch Paratuberkulose eine Rolle

spielen. Es lagen aber zum Zeitpunkt der hier vorgelegten Auswertung jedoch noch nicht alle labordiagnostischen Ergebnisse vor.

Während keine signifikanten und relevanten Zusammenhänge zwischen zwei qualitativen wie auch zwischen qualitativen und quantitativen Einflussfaktoren in dieser Studie nicht gezeigt werden konnten, wurden relevante wie auch signifikante Korrelationen zwischen quantitativen Faktoren festgestellt (Tab. 22). Die Zusammenhänge bestanden jedoch immer zwischen Variablen eines Themenbereichs.

Tab. 22: Signifikante und relevante Korrelationen der Variablen des hypothesenprüfenden Ansatzes untereinander (Korrelationskoeffizient > 0,5).

Variable 1	Variable 2	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert
% der Herde mit Lokomotionscore > 3	% der Herde mit Lokomotionscore > 1	0,6708	<0,0001
% der Herde mit BCS < unterem Referenzwert	% der Herde mit BCS < 2,5	0,7460	<0,0001
% der Herde mit BCS < unterem Referenzwert	% der Herde mit BCS > oberem Referenzwert	-0,6627	<0,0001
% der Herde mit Verschmutzung des Euters > 2	% der Herde mit Verschmutzung der Beine > 2	0,7362	<0,0001
% der Herde mit Verschmutzung der Beine > 2	% der Herde mit Verschmutzung der Flanke > 2	0,7217	<0,0001
% der Herde mit Verschmutzung des Euters > 2	% der Herde mit Verschmutzung der Flanke > 2	0,8198	<0,0001

3.11 Eindruck der Studientierärzte von den Betrieben (IBEI)

Das Ziel der Erfassung des Eindrucks der Studientierärzte vom Management der besuchten Milchviehbetriebe war die Prüfung einer solchen Methodik auf Reliabilität und Validität. Bei der qualitativen Befragung der Studientierärzte, welche Faktoren sie berücksichtigen, wenn sie einen Betrieb hinsichtlich der sechs Variablen beurteilen, zeigte sich bei den Variablen Hygiene-Status und technische Ausstattung eine relativ hohe Übereinstimmung. Dagegen wichen die Antworten der Studientierärzte bezüglich der Variablen Überlastung und Organisation des Betriebes stark auseinander. Die beiden anderen Variablen Tierbeobachtung und Tierbetreuung wiesen qualitativ eine mittlere Übereinstimmung auf, wobei Faktoren, die der eine Studientierarzt für den einen Faktor nannte, bei einem anderen Studientierarzt für den anderen Faktor in Erwägung gezogen wurden. Bei der statistischen Auswertung der Reliabilität zeigten die Antworten der Studientierärzte bei allen Faktoren eine moderate bis erhebliche Übereinstimmung (Landis et al. 1977). Am niedrigsten war sie für die Variable technische Ausstattung (globales Kappa: 0,52), während die Variable Tierbetreuung die höchste Übereinstimmung zeigte (globales Kappa: 0,74). Diese Ergebnisse zeigen, dass obwohl Tierärzte, die aufgrund ihrer persönlichen Erfahrungen unterschiedliche Faktoren bei der Beurteilung des Managements eines Milchviehbetriebes in Betracht ziehen, dennoch zu einer ähnlichen Gesamtbeurteilung kommen.

In einem zweiten Schritt wurde die Beurteilung der technischen Ausstattung und des Hygiene-Status eines Betriebs mit Faktoren verglichen, die die Studientierärzte in der qualitativen Befragung genannt

hatten (Tab. 23). Es zeigt sich in den überwiegenden Fällen ein signifikanter aber schwacher Zusammenhang. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass der Eindruck eines Menschen sich nicht nur durch einzelne Faktoren erklären lässt, sondern viele Faktoren in unterschiedlich starker Weise berücksichtigt werden.

Tab. 23: Zusammenhang zwischen dem Eindruck der Studentierärzte und den betrieblichen Gegebenheiten.

		Tierarzt A		Tierarzt B		Tierarzt C	
		Cramer's V	p-Wert Fisher's Exakt- Test	Cramer's V	p-Wert Fisher's Exakt- Test	Cramer's V	p-Wert Fisher's Exakt- Test
Technische Ausstattung	Spaltenschieber vorhanden	0,3420	0,0217	0,3960	0,0100	0,4616	0,0023
	Mischwagen vorhanden	0,3777	0,0051	0,2342	0,2371	0,5063	0,0020
	Melkroboter vorhanden	0,3542	0,0124	0,2091	0,4016	0,4563	0,0017
Hygiene- Status	Laufflächen verschmutzt	0,2731	0,0878	0,3315	0,0070	0,3261	0,0073
	Liegeflächen verschmutzt	0,3473	0,0071	0,3195	0,0200	0,3225	0,0098
	Beine verschmutzt	0,2496	0,0832	0,2860	0,0101	0,1660	0,7106
	Flanken verschmutzt	0,2010	0,4291	0,2336	0,3775	0,1511	0,8589
	Euter verschmutzt	0,2138	0,3443	0,2035	0,4226	0,2540	0,2445

3.12 Nachbefragung (IBEI)

Zur Evaluation der Beratung, die im Rahmen des Botulismus-Projektes für die Landwirte stattgefunden hat, und zur Identifizierung von Faktoren, die eine Umsetzung von Vorschlägen verhinderten, wurden insgesamt 38 Landwirte, die als Fallbetrieb an der Studie teilgenommen haben, nochmals telefonisch befragt (Tab. 24). Es zeigt sich, dass der Betriebsbesuch - abgesehen von einer Ausnahme - durchgehend als positiv eingestuft wurde. Auch der Bericht wurde von allen Landwirten bis auf einen gelesen und von dem überwiegenden Anteil als verständlich (n=36, 94,74%) und hilfreich (n=34, 89,47 %) beurteilt. 27 Landwirte (79,41 %) setzten laut eigener Angabe zumindest einen Teil der vorgeschlagenen Maßnahmen um.

Bei der Auswertung des qualitativen Teils des Interviews wurde ermittelt, dass die Erwartungshaltung, dass Maßnahmen zur Bekämpfung von chronischem Botulismus vorgeschlagen werden, einen Einfluss auf die Umsetzung der Vorschläge hatte. Zudem verhinderten die mangelnde Zusammenarbeit mit dem Hoftierarzt sowie der Eindruck, keine neuen Erkenntnisse durch den Betriebsbesuch gewonnen zu haben, die Umsetzung von Vorschlägen. Weiterhin wurde kein Bedarf gesehen, Dinge zu verändern, wenn der Eindruck bestand, dass die Impfung gegen Clostridien sich

sehr positiv auf die Herdengesundheit ausgewirkt hatte. Des Weiteren wurde angemerkt, dass nicht alle Maßnahmen umgesetzt wurden, wenn sich dies nicht mit den betrieblichen Gegebenheiten vereinbaren ließ, dies aufgrund der finanziellen Möglichkeiten oder Arbeitskapazität nicht durchführbar war oder ein Nachfolger für den Betrieb fehlte. Auch ein Mangel an Selbstdisziplin wurde als Grund für eine fehlende Umsetzung der Vorschläge genannt.

Bei dem Betriebsbesuch wurde besonders häufig die freundliche Art der Studententierärzte, der Umfang der Untersuchungen, der gute Umgang mit den Kühen, die Beratung und die gute Organisation des Betriebsbesuchs lobend erwähnt.

Die Nachbefragung hat gezeigt, dass die Studie von den Landwirten gut aufgenommen wurde und – obwohl die Beratung nur einmalig erfolgte – bei einigen Betrieben zu einer Verbesserung der Herdengesundheit beitragen konnte. Für weitere Studien und auch für die tierärztliche Beratungspraxis konnten durch diese Studie Faktoren identifiziert werden, die bei der Beratung von Landwirten zukünftig stärker beachtet werden sollten. So müssen beratende Tierärzte zukünftig wesentlich stärker darauf achten, mit dem Landwirt gemeinsam und unter Beachtung der betrieblichen, finanziellen sowie personellen Gegebenheiten die notwendigen und möglichen Maßnahmen zu erarbeiten. Dies macht es notwendig, den Landwirt stärker in den Prozess der Problemerkennung mit einzubeziehen, um die Wahrnehmung zu schärfen. Anknüpfende Studien sollten sich daher mit der Entwicklung und Implementierung moderner Beratungsprozesse in der Tiermedizin befassen.

Tab. 24: Antwortmuster der Landwirte im Rahmen der Nachbefragung.

							N	%	
Betriebsbesuch gefallen	Bericht gelesen	Bericht nachvollziehbar	Bericht hilfreich	Erwartungen erfüllt	Umsetzung von Vorschlägen	Verbesserung durch Vorschläge			
mittel	vollständig/größtenteils	vollständig/größtenteils	sehr/größtenteils	teilweise/ und ganz	voll	nein, keine	trifft nicht zu	1	2.63
gut/ sehr gut ↓	Nein	trifft nicht zu/ weiß nicht	trifft nicht zu/ weiß nicht	teilweise/ und ganz	voll	trifft nicht zu	trifft nicht zu	1	2.63
	vollständig/größtenteils ↓	vollständig/größtenteils ↓	nein	nein	nein, keine	trifft nicht zu	2	5.26	
			sehr/größtenteils	teilweise/ und ganz	voll	nein, keine	trifft nicht zu	3	7.89
						ja, einige/ viele	nein, schlechter	1	2.63
							keine Veränderung	5	13.16
							ja, sicher/ vermutlich	12	31.58
							weiß nicht	10	26.32
					weiß nicht	ja, einige/ viele	weiß nicht	1	2.63
							Keine Veränderung	1	2.63
			trifft nicht zu/ weiß nicht	nein	nein	trifft nicht zu	trifft nicht zu	1	2.63
Alle							38	100.00	

3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Dieses Projekt stellt ein Entscheidungshilfe-Vorhaben für das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) mit der Bundesanstalt für Ernährung und Landwirtschaft (BLE) als Projektträger dar. Es sollte geklärt werden, ob toxinogene *C. botulinum*-Stämme mit dem Auftreten von chronisch-unspezifischen Krankheitsgeschehen in Verbindung stehen. Vor diesem Projekt wurde postuliert, dass die Krankheit durch eine Toxikoinfektion mit *C. botulinum* entsteht. Dabei würden die Sporen i.d.R. über das Futter aufgenommen. Nach Passage durch den Verdauungstrakt, sollte es in den hinteren Darmabschnitten zur Auskeimung mit nachfolgender Bildung von Neurotoxinen kommen. Diese sollen kontinuierlich in kleinsten Mengen gebildet werden und dann die verschiedenen Krankheitssymptome hervorrufen. Begünstigend sollen Dysbiosen auch in Verbindung mit anderen Clostridien sein. In den letzten Jahren wurde der Sachverhalt in den betroffenen Berufsgruppen (Landwirte, Tierärzte, Wissenschaftler) äußerst kontrovers diskutiert. Auch in Presse- und Fernsehberichten wird die Thematik häufig und z.T. polemisch dargestellt. Da es bisher aber keinen wissenschaftlichen Beweis für einen Zusammenhang zwischen *C. botulinum* oder seinen BoNT und dem chronischen Krankheitsgeschehen gibt, ist das Krankheitsbild des chronischen Botulismus als eine eigenständige Erkrankung bisher nicht anerkannt. Von einer Gruppe von Landwirten, die davon überzeugt ist, dass ihre Herden vom sog. chronischen Botulismus befallen waren, wird auf rechtlichem Wege versucht, die Anerkennung der Krankheit als eine Tierseuche mit Anzeigepflicht zu erwirken, um auf diese Weise Entschädigungen für die entstandenen Verluste einfordern zu können. Die Gründe, warum der sgVB bisher noch nicht als Krankheit anerkannt ist, sind folgende:

Clostridien einschließlich *C. botulinum* werden im Darmtrakt von gesunden Menschen und Tieren festgestellt. Bisher fehlen systematische Untersuchungen, in denen gesunde und kranke Individuen untersucht wurden, um den Stellenwert positiver Befunde einschätzen zu können. In vorliegender Studie wurde dieser Aspekt daher mit dem Design einer Fall-Kontroll-Studie berücksichtigt.

Die Diagnostik ist problematisch. Die Anzucht von *C. botulinum* ist sehr anspruchsvoll und gelingt in vielen Fällen nicht. Für den Toxinnachweis gilt der Maus-Bioassay als Goldstandard. Dieser ist sehr aufwändig und berührt wegen der hohen Zahl darin zu nutzender Mäuse in erheblichem Maße Fragen des Tierschutzes. PCR-Methoden existieren, sind aber bisher nicht standardisiert. In vorliegender Studie wurden die verschiedenen Nachweismethoden (Anzucht mit 16S rRNA-Spezies-Identifizierung, zwei verschiedene PCR-Methoden zum Toxingennachweis (LMQS, FLI), MALDI-TOF (LMQS) und Maus-Bioassay (FLI) durchgeführt, womit von verschiedenen Seiten ein Erreger- oder Toxinnachweis verfolgt wurde.

Für ein chronisches Krankheitsgeschehen gibt es viele Differentialdiagnosen, wobei auch Haltungs- und Fütterungsbedingungen und das Betriebsmanagement einen entscheidenden Einfluss haben können. Diese Aspekte wurden ebenfalls in dieser Studie untersucht.

Das beschriebene Krankheitsbild ist sowohl auf Einzeltier- als auch auf Herdenebene sehr unspezifisch. Hier bestand das größte Problem für die Durchführung einer Fall-Kontroll-Studie, deren Aussagefähigkeit von einer genauen Definition und Beschreibung der Fälle und Kontrollen abhängt. Mit den bisher verfügbaren Informationen konnten weder Herden noch Einzeltiere eindeutig als Fälle definiert werden. Aus diesem Grunde wurden in dieser Untersuchung Auswahlgrößen gewählt, mit denen man ein chronisches Krankheitsgeschehen sowohl auf Herden- als auch auf Einzeltierebene objektiv nachprüfen kann. Weiterhin wurde eine systematische klinische Untersuchung von definiert chronisch kranken Kühen und unverdächtigen Kontrollkühen mit umfangreicher Labordiagnostik durchgeführt. Der Einschluss von chronisch kranken Kühen auch in Kontrollbetrieben diente dem

Zweck, herauszufinden, ob es möglicherweise doch ein umschriebenes „typisches“ Krankheitsbild eines chronisch kranken Tieres aus einem Fallbetrieb gibt.

Der kulturelle Erregernachweis gelang nur aus der Kotprobe von einem gesunden Kontrolltier aus einem F2-Betrieb. Basierend auf einem positiven Toxingennachweis (Ergebnisse von LMQS und FLI) waren 24,5 % der Betriebe als positiv eingestuft worden. Signifikante Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben im Hinblick auf das Vorkommen von Toxingen bestanden nicht. Die Häufigkeit positiver Toxingen-Nachweise auf Einzeltierebene ist mit ca. 8 % der untersuchten Tiere gering, ohne dass sich Verdachts- und Kontrolltiere unterscheiden. Berücksichtigt werden muss weiterhin, dass ein Toxingennachweis nach Anreicherung nur bedeutet, dass Sporen im Ausgangsmaterial vorhanden waren. Eine Aussage, dass diese in vivo auch tatsächlich Toxin produzieren und eine Krankheit auslösen, ist nicht möglich. Ein direkter Nachweis von freiem Toxin gelang nicht (FLI). Wenngleich *C. botulinum* erwartungsgemäß im Umfeld der Tiere vorhanden ist, kann eine Beziehung zwischen *C. botulinum* als Hauptexpositionsfaktor und chronischem Krankheitsgeschehen nicht abgeleitet werden. Die geringe Häufigkeit der Nachweise beim Einzeltier und die nur vereinzelt Nachweise in Silageproben lassen nicht auf eine seuchenhafte Verbreitung des Erregers schließen. Inwieweit *C. botulinum* möglicherweise doch als Begleitfaktor an einem chronischen Krankheitsgeschehen beteiligt ist, muss in weitergehenden komplexeren statistischen Auswertungen überprüft werden. Aufgrund der Kürze der Laufzeit des Projektes war dies bisher noch nicht möglich.

Kulturell und mittels 16s rRNA-Genanalyse konnten aus mehr als 8.700 Clostridien-verdächtigen Isolaten mehr als 90 verschiedene Spezies isoliert und identifiziert werden. Mit etwa 8,5 % war *C. perfringens* am dritthäufigsten vertreten. Inwieweit dieser Erreger eine Rolle für ein chronisches Krankheitsgeschehen spielt, sollte weiter abgeklärt werden. Im Rahmen dieser Studie trat *C. perfringens* in etwa gleicher Häufigkeit in Fall- und Kontrollbetrieben auf. Allerdings sollte zur Abschätzung der möglichen pathogenen Bedeutung der Toxintyp bestimmt werden. Die Untersuchungen hierzu laufen noch. Neben dem qualitativen Nachweis stellt die Quantität eines Erregers für die Entstehung einer Krankheit eine Rolle, was in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte.

Die vielen verschiedenen Clostridienspezies, die pro Betrieb gefunden werden konnten, und die Tatsache, dass die mikrobielle Gemeinschaft der Clostridien in Pansen und Darm unterschiedlich ist, deuten darauf hin, dass sich das Clostridien-Mikrobiom offensichtlich sehr dynamisch an umwelt- und tierbezogene Bedingungen adaptiert. Veränderungen könnten mit einer erhöhten Krankheitsdisposition in Verbindung stehen. Auch hier ergeben sich noch viele Fragestellungen für weitere Forschungsprojekte.

Die Einteilung in Verdachts- und Kontrolltiere war mit den hier definierten Auswahlkriterien ohne Probleme möglich. Das mit mehr als 80 % häufigste Symptom war eine Lahmheit, die entweder ausschließlich oder zusammen mit einer anderen Gliedmaßenkrankung mit einer Klauenerkrankung in Verbindung stand. Obwohl Lahmheiten in Verdachtsbetrieben häufiger gefunden wurden als in Kontrollbetrieben, war der Prozentsatz lahmer Tiere auch in Kontrollbetrieben immer noch deutlich zu hoch. Lahmheiten sind nicht nur ökonomisch bedeutsam sondern spielen auch im Rahmen des Tierschutzgedanken als Tierwohlindikator eine wichtige Rolle. Hier müssen Landwirte, Klauenpfleger und Tiermediziner gemeinsam Wege finden, um die Prävalenz von Lahmheiten in einen akzeptablen Rahmen zu senken.

Die klinische Untersuchung der Einzeltiere ergab, dass sich chronisch kranke Tiere in vielen Befunden bei unterschiedlichen Organsystemen deutlich von Kontrolltieren unterscheiden und zwar unabhängig von ihrer Herkunft aus einem Fall- oder Kontrollbetrieb. Das Hauptsymptom eines

chronisch kranken Tieres war in ca. 80 % der Fälle eine Lahmheit. Verdachtstiere hatten weiterhin labordiagnostisch vermehrt Hinweise auf ein Entzündungsgeschehen, welches sich zum einen großen Teil durch die entzündlichen Erkrankungen an den Klauen und Gliedmaßen erklärt. Veränderungen in anderen Organen (z.B. endokardiale Nebengeräusche) deuten auf eine Streuung von Erregern im Organismus hin, welche ebenfalls den chronischen Status erklären kann.

Hinsichtlich der Haltung, Fütterung und den hygienischen Bedingungen ergaben sich für alle Betriebe Ergebnisse, die insbesondere, was die Herdenindices angeht, außerhalb der in der Literatur beschriebenen Zielbereiche lagen. Für alle Betriebe gilt also unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu einem bestimmten Betriebsstatus, dass hier noch Verbesserungen in vielen Bereichen möglich und nötig sind. Dennoch gab es Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben. So waren der Kuh-Komfort und die hygienischen Bedingungen in den Kontrollbetrieben besser als in den Verdachtsbetrieben. Bezüglich der Fütterung gelang es Kontrollbetrieben, eine höhere Trockensubstanzaufnahme und damit höhere Milchleistung zu erzielen als in Fallbetrieben und zwar durch ein besseres Fütterungsmanagement (Futtermittelqualität), höhere Grobfutterleistung und bessere Silagequalität. Inwieweit ein höherer Kraftfutteeinsatz in Relation zum Grobfutter in Fallbetrieben das Risiko einer latenten Pansenazidose erhöht, konnte in dieser Studie nicht eindeutig geklärt werden. Ein Problem ist hier, dass es offensichtlich kaum belastbare Indikatoren gibt, um eine Pansenazidose sicher festzustellen und die hier benutzten in der Praxis verbreiteten Indikatoren möglicherweise weniger geeignet sind.

Im Rahmen dieses Projektes wurden drei Schritte, die in separaten Projekten bearbeitet hätten werden können, in einem einzigen Projekt durchgeführt: zum einen wurden Definitionen erarbeitet, die einen chronisch kranken Milchviehbetrieb und eine chronisch kranke Kuh klar beschreiben. Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen diesem chronischen Krankheitsgeschehen und dem Nachweis von *C. botulinum* in mehreren diagnostischen Verfahren und zahlreichen Proben untersucht. Darüber hinaus wurden auch andere Faktoren, wie beispielsweise Differentialdiagnosen zum chronischen Botulismus, aber auch Fütterung, Haltung und Hygiene, auf ihren Zusammenhang mit dem chronischen Krankheitsgeschehen hin untersucht. Durch dieses Vorgehen wurde eine umfangreiche und aufwändige Studie notwendig. Dies in Kombination mit der außerordentlich kurzen Projektlaufzeit bedingt es, dass die hier zusammengestellten Ergebnisse als vorläufig zu betrachten sind und weitere eingehendere Analysen abgeschlossen werden müssen.

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. botulinum* und einem chronischen Krankheitsgeschehen auf Milchviehbetrieben, so dass diesem Erreger als Hauptfaktor keine ausschlaggebende Bedeutung zukommen dürfte. Ein chronisch krankes Tier war im Wesentlichen durch eine Lahmheit gekennzeichnet. Auf den Betrieben waren zum Teil massive Herdengesundheitsprobleme feststellbar, die nach den bisherigen Auswertungen eher ursächlich durch Managementfaktoren als Auslöser für die Problematik hervorgerufen wurden. Um den betroffenen Betrieben weiter zu helfen, sollte eine langfristig angelegte Bestandsbetreuung angeboten werden, in der mit den Landwirten die wichtigsten Probleme identifiziert und Schritte zur Lösung erarbeitet und umgesetzt werden. Neben weiteren Untersuchungen zu der Rolle von *C. perfringens* etc. scheint daher ein wichtiger Punkt weiterer Forschungstätigkeit insbesondere die Wahrnehmung von Herdenproblemen durch den Landwirt zu sein, ebenso wie die Anpassung der tierärztlichen Beratungspraxis an die Bedürfnisse der Milchviehhalter.

4. Zusammenfassung

In vorliegender Fall-Kontroll-Studie wurde die Bedeutung von *Clostridium (C.) botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen in 139 Milchviehbetrieben in Norddeutschland untersucht. Fallbetriebe mussten mindestens drei von fünf Auswahlkriterien (herabgesetzte Milchleistung, erhöhte Abgangsrate, erhöhte Rate von Todesfällen, erhöhtes Aufkommen von milchfieberartigem Festliegen, insgesamt erhöhte Krankheitsrate) erfüllen und wurden in Fall-1-Betriebe (F1=keine Impfung, n=45) und Fall-2-Betriebe (F2=Impfung gegen Clostridien, aber nicht gegen *C. botulinum*, n=47) eingeteilt. Diese wurden mit 47 Kontrollbetrieben verglichen. An den Tieren einer Herde wurden die Körperkondition, das Gangbild, der hygienische Zustand und die Gelenksbonitur erhoben. In jedem Betrieb wurden fünf klinisch unauffällige und fünf chronisch kranke Tiere ausgesucht und klinisch untersucht. Von diesen Tieren wurden Blut-, Pansensaft- und Kot-, Haar- und Harnproben gewonnen. Insgesamt gingen 1.389 Tiere in die Untersuchung ein. Des Weiteren erfolgte eine Erhebung über die Betriebsgegebenheiten einschließlich Haltung, Hygiene und Fütterung sowie von Risikofaktoren für Clostridieninfektionen. Weiterhin wurden Silage-, Wasser- und Tankmilchproben gewonnen. Bei 38 Betrieben erfolgte eine Nachbefragung über den Betriebsbesuch.

Mittels Real Time-PCR mit Voranreicherung zum Nachweis der Neurotoxin(BoNT)-Genvarianten A bis F von *C. botulinum* wurden 2.776 Tierproben, 411 Futtermittel und 139 Wasserproben untersucht. Es konnten 25 Betriebe (17,99 %) als BoNT-Gen positiv eingestuft werden. Gefunden wurden die Toxingenvarianten A (76 %), B (12 %), D (8 %) und F (4 %). Auf Tierebene waren 6,19 % der Tiere BoNT-positiv. Unter Einbeziehung von PCR-Ergebnissen vom FLI-Jena am gleichen Probenmaterial waren 24,46 % der Betriebe und 7,92 % der Einzeltiere BoNT-Gen-positiv. Im Rahmen dieser Studie konnte mit dem aktuellen Stand der Auswertung mittels einfaktorieller univariater logistischer Regression kein direkter und deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *C. botulinum* und einem chronischen Krankheitsgeschehen auf Milchviehbetrieben oder bei Tieren bestätigt werden, was darauf hindeutet, dass *C. botulinum* nicht der wesentliche Hauptverursacher des chronischen Krankheitsgeschehens ist.

Nach anaerober Kultivierung wurden 8.728 Isolate mittels 16S rDNA-Gennachweis untersucht. Von diesen konnten 92 % bis auf Speziesebene identifiziert werden. Die häufigsten vorkommenden kultivierbaren Spezies waren *C. sporogenes* (42,65 %), *C. cochlearium/tetani* (11,55 %) und *C. perfringens* (8,58 %). In einem einzigen Fall gelang der kulturelle Nachweis von *C. botulinum* Typ B aus einer Kotprobe eines Kontrolltieres aus einem F2-Betrieb.

Zusätzlich wurde die Identifizierung von Clostridienisolaten mittels 16S rDNA-Sequenzierung und MALDI-Technologie verglichen. Hierzu wurden 254 Isolate mit beiden Technologien untersucht und die Ergebnisse vergleichend analysiert. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass zur Identifizierung von Clostridienpezies die Verwendung von MALDI-TOF-MS zu gleichwertigen Ergebnissen führte wie die 16S-rDNA-Sequenzierung und somit als Alternative zur Letztgenannten in der Routinediagnostik verwendet werden kann.

Mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse wurde die mikrobielle Gemeinschaft der *Clostridia* für 15 Betriebe (F1=5; F2=5; K=5) mit jeweils 10 Tieren (Verdachtstier n=5; Kontrolltier n=5) in Kot- und Pansensaftproben untersucht. Die SSCP-Analyse zeigte, dass Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* zwischen Kot- und Pansensaftproben innerhalb eines Tieres auftraten, es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* zwischen Kontroll- und Verdachtstieren innerhalb eines Betriebes gab. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das beschriebene chronische Krankheitsgeschehen in keinem

Zusammenhang mit einer veränderten mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia* in Kot/Pansen zu stehen scheint.

Die klinische Untersuchung ergab, dass das häufigste Symptom bei chronisch kranken Tieren eine Lahmheit war (77,4 bis 86,4 %), die in der Mehrheit der Fälle auf eine Klauenerkrankung zurückzuführen war. Verdachtstiere unterschieden sich in vielen Befunden in den verschiedenen Organsystemen von Kontrolltieren, wobei bis auf ein herabgesetzter Mimiktonus sowie eine Kronsaum-Weichteilschwellung (häufiger in F-Betrieben als in K-Betrieben) kein eindeutiger Betriebseffekt festzustellen war. Verdachtstiere wiesen anhand der Laborparameter häufiger Anzeichen einer Entzündung auf. Weiterhin war die Belastung mit Magen-Darm-Parasiten in Fallbetrieben größer als in Kontrollbetrieben. Anhand der klinischen Befunde können Verdachtstiere also nicht einem bestimmten Betriebsstatus zugeordnet werden.

Die Untersuchung auf mögliche in der breiten Öffentlichkeit diskutierte Clostridien-Risikofaktoren (n=74 Variablen) erbrachte bei 31,1 % der Variablen keine Variabilität zwischen den Betrieben, 55,4 % unterschieden sich nicht zwischen den Betriebskategorien und bei 13,5 % wurde ein Betriebseffekt nachgewiesen. Als möglicher Risikofaktor für das Auftreten eines chronischen Krankheitsgeschehens ergaben sich danach die Weidehaltung für Laktierende, die mit der Verfügbarkeit von Weide (Anzahl ha Weide) in Verbindung steht, ein verfrühtes Öffnen oder sogar ein fehlender Verschluss des Maissilos sowie die Verwendung von Mist als Biogasanlagen-Input. Die Verwendung von Glyphosat, das Vorkommen von Tauben, die Verwendung von Schweinegülle als Gärsubstrat und die Verfütterung von Biertreber konnten nicht in einen positiven Zusammenhang mit einem chronischen Krankheitsgeschehen gebracht werden.

Auf den Fallbetrieben konnten im Gegensatz zu den Kontrollbetrieben z.T. erhebliche Probleme bezüglich der Tiergesundheit aufgedeckt werden. Es zeigte sich, dass Kühe auf Fallbetrieben häufiger mager und häufiger lahm waren, während Probleme mit der Eutergesundheit und der Fruchtbarkeit eher eine untergeordnete Rolle spielten. Als mögliche Ursache für die chronischen Herdengesundheitsprobleme konnten Faktoren in der Fütterung, im Bereich der Hygiene wie auch des Kuh-Komforts am deutlichsten identifiziert werden.

Unabhängig von den möglichen Ursachen für ein chronisches Krankheitsgeschehen ist es jedoch auch erwähnenswert, dass die untersuchten Milchviehbetriebe unabhängig von der Betriebskategorie offenbar bestimmte Mindestanforderungen im Bereich des Stallbaus, der Tierbelegung und der Sauberkeit der Tiere nicht erreichen. Hierzu gehört neben zu geringen Boxenbreiten auch eine weit verbreitete Überbelegung der Ställe.

Im Rahmen des Projektes konnten aber nicht nur erste Erkenntnisse über die Ursächlichkeit von chronischen Problemen mit der Herdengesundheit gewonnen werden. Durch die Betriebsuntersuchungen und den daraus resultierenden Bericht wurde den Landwirten und ihren Hoftierärzten auch individuell eine umfassende, kostenlose Betriebsanalyse zur Verfügung gestellt, in der Schwachstellen benannt und Vorschläge zur Verbesserung der Symptomatik unterbreitet wurden. Die Ergebnisse der Nachbefragung deuten an, dass dieses Vorgehen wie auch der gesamte Betriebsbesuch gut von den Landwirten aufgenommen wurde. Zukünftige Studien sollten sich stärker damit beschäftigen, wie bzw. warum Probleme mit der Tiergesundheit auf Betrieben entstehen und wie bereits bekannte Maßnahmen zur Verbesserung tatsächlich in Anwendung und Umsetzung gebracht werden können.

5. Gegenüberstellung der ursprünglichen zu den tatsächlich erreichten Zielen; weiterführende Fragestellungen

Die von der RiKli in Ermanglung eines in der Literatur beschriebenen klaren klinischen Bildes auf Betriebs- und Einzeltierebene entwickelten Definitionen für Fallbetriebe und Verdachtstiere waren geeignet, zwischen den verschiedenen Betriebs- und Tierkategorien (F1 u. F2 vs. K; Verdachtstier vs. Kontrolltier) zu diskriminieren. Damit war unter Berücksichtigung epidemiologischer Gesichtspunkte eine Aussage möglich, ob Beziehungen zwischen *C. botulinum* und einem chronischen Krankheitsgeschehen anzunehmen sind.

Die von der RiKli organisierte Betriebsrekrutierung und Betriebsbesuche verliefen reibungslos. Die ursprünglich geplante Anzahl von 150 Betrieben wurde nur geringfügig unterschritten, da die Anzahl zu besuchender Betriebe pro Woche durch zeitweise nicht ausreichende Laborkapazität begrenzt wurde. Mit insgesamt 139 Betrieben war aber immer noch eine belastbare Aussage möglich.

Als ein Hauptproblem in Milchviehbetrieben wurden Lahmheiten durch Klauenerkrankungen festgestellt. Ein chronisch krankes Tier war in der Mehrheit der Fälle durch eine Lahmheit charakterisiert. Dieses tierschutzrelevante Problem sollte in Zukunft unbedingt angegangen werden, um die Prävalenz von Lahmheiten zu senken. Die Umsetzung ist nicht einfach und erfordert die Zusammenarbeit verschiedener Berufsgruppen aus Landwirtschaft und Tiermedizin. Hier wird Bedarf gesehen, durch geförderte Projekte Therapie- und Präventionsmaßnahmen praxisnah umzusetzen. Mit Hilfe derartiger „Kick off“-Projekte könnte in der Breite dann eine Sensibilisierung für das Thema Lahmheit und eine stärkere Bereitschaft, sich der Problematik zu widmen, erreicht werden.

Als Faktor, der mit oder ohne Beteiligung von *C. botulinum* eine Rolle für chronisches Krankheitsgeschehen spielen kann, wurde die Fütterung untersucht. Ein Problem wird in der mangelnden Wiederkäuergerechtigkeit heutiger Milchviehrationen gesehen, die die Entstehung von latenten Pansenazidosen mit nachfolgender negativer Auswirkung auf die Tiergesundheit begünstigt. Dieses Problem konnte in der durchgeführten Studie nicht zufrieden stellend analysiert werden, weil die gängigen, in der Praxis verwendeten Indikatoren (MLP-Daten, Rationskennzahlen) offensichtlich nicht geeignet sind, diesen Zustand hinreichend genau zu erfassen. Die geringere Grobfutterleistung deutet darauf hin, dass in Fallbetrieben relativ mehr Kraftfutter im Vergleich zum Grobfutter eingesetzt wird als in Kontrollbetrieben. Zukünftige Projekte sollten sich mit der Frage nach belastbaren Indikatoren für eine latente Pansenazidose befassen.

Aufgrund der kurzen Projektlaufzeit konnten von RiKli in Zusammenarbeit mit IBEI bisher keine multivariaten oder mehrfaktoriellen Auswertungen erfolgen. Diese werden Gegenstand weiterer Untersuchungen in naher Zukunft sein.

Die geplanten Ziele vom LMQS konnten in vollem Umfang erreicht werden. Proben von 141 Betrieben (139 lagen in der Studienregion) sind auf alle sechs Toxingenvarianten (A-F) getestet worden. Es konnten die Varianten A, B, D und F nachgewiesen werden. Die 16s RNA-Sequenzanalyse wurde an 8.728 Clostridien-verdächtigen Isolaten untersucht und erbrachte für mehr als 92 % der Isolate sehr gute Identifizierungsergebnisse auf Speziesebene. Eine vergleichende Untersuchung der Identifizierung mittels 16s rDNA-Genanalyse und MALDI-TOF-MS wurde an 254 Isolaten durchgeführt und bewertet. Aufgrund des großen Anteils an *C. perfringens* an der Gesamtheit der identifizierten Isolate und der klinischen Bedeutung dieser Spezies wurde die weitere Charakterisierung der *C. perfringens*-Isolate als ein zusätzliches Ziel im Laufe des Projektes definiert. Hierzu werden von allen *C. perfringens* die Toxintypen mittels PCR bestimmt. Die Untersuchungen sind in Bearbeitung.

Das Teilprojekt „Bedeutung der mikrobiellen Gemeinschaft der *Clostridia*“, welches durch das Physiologische Institut bearbeitet wurde, konnte ebenfalls erfolgreich abgeschlossen werden. Als weitergehende Untersuchung könnte eine Differenzierung der Mikrobiota auf Speziesebene durchgeführt werden.

Das IBEI hat die Ziele hinsichtlich der Dokumentation der Daten, inklusive der Erstellung einer sehr umfangreichen Datenbank und der Plausibilitätsprüfungen erreicht und auch erste Ergebnisse bei der Auswertung der Daten erzielen können. Auch wenn die Analyse der Daten noch nicht abgeschlossen ist, zeigt das Projekt Ansätze für weiterführende Fragestellungen auf. Es wird ein Bedarf daran gesehen, zu klären, wie das Management von Milchviehbetrieben weiter verbessert werden kann. Neben der Vermittlung von Knowhow scheint es dabei wichtig zu sein, dass betriebliche Berater auf die Ziele eines Betriebs und auf seine individuellen Gegebenheiten stärker eingehen. Darüber hinaus wird ein Bedarf gesehen, was die Vermittlung von Arbeitstechniken (Mitarbeiterführung, Zeitmanagement, etc.) betrifft.

Um hier zukünftig die Qualität der tierärztlichen Beratung optimieren zu können, bedarf es daher zunächst einer Evaluation der tierärztlichen Beratungspraxis auf Milchviehbetrieben und der Entwicklung eines neuen Beratungskonzeptes. So kann die Kommunikation zwischen Landwirt und Tierarzt noch effektiver gestaltet werden und dadurch die Umsetzung erforderlicher Maßnahmen heraufgesetzt werden. Darüber hinaus sollten Methoden entwickelt werden, die die betrieblichen Gegebenheiten, die Ziele des Betriebes und die Einstellung des Landwirtes wie auch den ökonomischen Nutzen einer Bestandsbetreuung noch stärker in den Mittelpunkt des tierärztlichen Handelns stellen.

6. Literaturverzeichnis

- Anderson, M.J. (2001): A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral. Ecol.* 26, 32-46
- Anderson, M.J u. J. Robinson (2003): Generalized discriminant analysis based on distances. *Aust. N. Z. J. Stat.* 45,301-318
- Bock, J. (1998): Bestimmung des Stichprobenumfangs. Oldenbourg Verlag, München
- Böhnel, H. u. F. Gessler (2012): Hinweise zum Vorkommen von Rinderbotulismus in Deutschland anhand von Laboruntersuchungen der Jahre 1996-2010. *Tierärztl. Umsch.* 67, 251-256
- Böhnel, H., B. Schwagerick u. F. Gessler (2001): Visceral botulism – A new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J. Vet. Med. A* 48, 373-383
- Brandt M. u. K. Rohr (1981): Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen [Contributions to the quantification of N-conversion in the forestomach of dairy cows]. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd.* 46, 39-48
- CIGR (1994): The design of dairy cow housing. In Report of the CIGR working group No. 14. Ed F. B. R. T. ADAS BRIDGETS DAIRY RESEARCH CENTRE
- Cook, N. B. (2007): A tool box for assessing cow, udder and teat hygiene. In 46th Annual Meeting of the National Mastitis Council. San Antonio, Texas
- Cook, N.B. (2009): Free stall design for maximum cow comfort. *WCDS Advances in Dairy Technology* 21, 255-268
- CLSI (2008): Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved Guideline. CLSI document MM18-A Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Dahlenborg, M., E. Borch u. P. Radström (2001): Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4781-4788
- Dahlenborg, M., E. Borch u. P. Radström (2003): Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 105-110
- De Kruif, A., R. Mansfeld u. M. Hoedemaker (2007): Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. 2. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart
- Dirksen, G., H.-D. Gründer u. M. Stöber (2012): Die klinische Untersuchung des Rindes. 4. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg
- Domingo, R.M., J.S. Haller u. M. Gruenthal (2008): Infant botulism: two recent cases and literature review. *J. Child Neurol.* 23, 1336-1346
- Dridi, B., M. Henry, A. El Khéchine, D. Raoult, M. Drancourt (2009): High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One* 4, e7063
- Edmonson, A.J., I.J. Lean, L.D. Weaver u. T. Farver (1989): A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 68-78
- Eicken, K. (2005): Mögliche gesundheitliche Probleme von Milchkühen bei Grassilage betonten Rationen. *Nutztierpraxis aktuell*, Ausgabe 13. Juni 2005
- EVSA (2005): Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the Commission related to *Clostridium* spp. in foodstuff. *The EFSA Journal* 199, 1-65
- Fahrmeir, L., R. Künstler, I. Pigeot u. G. Tutz (2012): Statistik: Der Weg zur Datenanalyse, Springer, Berlin-Heidelberg
- Fracchia, L., A.B. Dohrmann, M.G. Martinotti u. C.C. Tebbe (2006): Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 942-952
- Glaser, S. u. L. Kreienbrock (2011): Stichprobenplanung bei veterinärmedizinischen Studien – Ein Leitfaden zur Bestimmung des Untersuchungsumfangs, Schlütersche, Hannover

- Glaser, B.G. u. A.L. Klein (2009): The discovery of grounded theory: Strategies for qualitative research. Transaction Publishers, Piscataway Township, New Jersey
- Graham, R. u. H.R. Schwarze (1921): Botulism in cattle. J. Bacteriol. 6, 69-83
- Kehler, W. (2010): Botulismus des Rindes: Problematik in den 90-er Jahren. In: Agrar- und Veterinärakademie (AVA), Ernst-Günther Hellwig (Hrsg.): Chronischer Botulismus – Botulinumtoxikosen bei Mensch und Tier – Chronischer Botulismus in Milchviehherden? Was ist daran? PER.CEPTO mediengestaltung, Laer, 110-129
- Kirchner S. , K.M. Kramer, M. Schulze, D. Pauly, D. Jacob, F. Gessler, A. Nitsche, B.G Dorner u. M.B. Dorner (2010): Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4387–4395
- Kreienbrock, L., I. Pigeot u. W. Ahrens (2012): Epidemiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg
- Landis, J. R. u. G.G. Koch (1977): The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33, 159-174
- Le Bourhis, A.G., K. Saunier, J. Dore, J.P. Carlier, J.F. Chamba, M.R. Popoff u. J.L. Tholozan (2005): Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium spp.* in cheese by temporal temperature gradient electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 71,29-38
- Little, R. u. D. Rubin (1987): Statistical analysis with missing data. John Wiley & Sons; New York
- Loisel, P., H. Harmond, O. Zemb, E. Latrille, C. Lobry, J.P. Delgènes u. J.-J. Godon (2006): Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. Environ. Microbiol. 8720-8731
- Merle, R., M. Busse, G. Rechter u. U. Meer (2012): Regionalisierung Deutschlands anhand landwirtschaftlicher Strukturdaten. Regionalisation of Germany by data of agricultural structures. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 8, 52-59
- Nelson, A.J. (1996): On-farm nutrition diagnostics. Proc. 29th Ann. Conf. Am. Assoc. Bovine Pract., San Diego, 76-85
- Reubold, H. (2003): Bewertung der Tiergerechtheit von Liegeboxen. Vet-Med Report 27, Sonderausgabe VI, 14-15
- Schwagerick, B. u. H. Böhnelt (2001): Eine chronische Erkrankung bei Milchkühen mit Nachweis von Botulinumtoxin – eine Fallstudie. Prakt. Tierarzt 82, 516-524
- Stöber, M. (2002): Botulismus. In: Dirksen, G. u. M. Stöber (Hrsg.): Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. 4. Aufl., Parey Buchverlag, Berlin, 1113-1118
- Schmalenberger, A. und C.C. Tebbe (2003): Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. Mol. Ecol. 12,251-262
- Sprecher, D.J., D.E. Hostetler u. J.B. Kaneene (1997): A lameness scoring system that uses posture and gait to predict cattle reproductive performance. Theriogenology 47, 1179-1187
- Strobel, E., K. Seeling u. C.C. Tebbe (2008): Diversity responses of rumen microbial communities to Fusarium-contaminated feed, evaluated with rumen simulating technology. Environ. Microbiol. 10, 483-496
- Witzig, M., J. Boguhn, S. Kleinsteuber, I. Fetzer u. M. Rodehutschord (2010): Influence of the maize silage to grass silage ratio and feed particle size of rations for ruminants on the community structure of ruminal Firmicutes in vitro. J. Appl. Microbiol. 109,1998-2010

Anhang

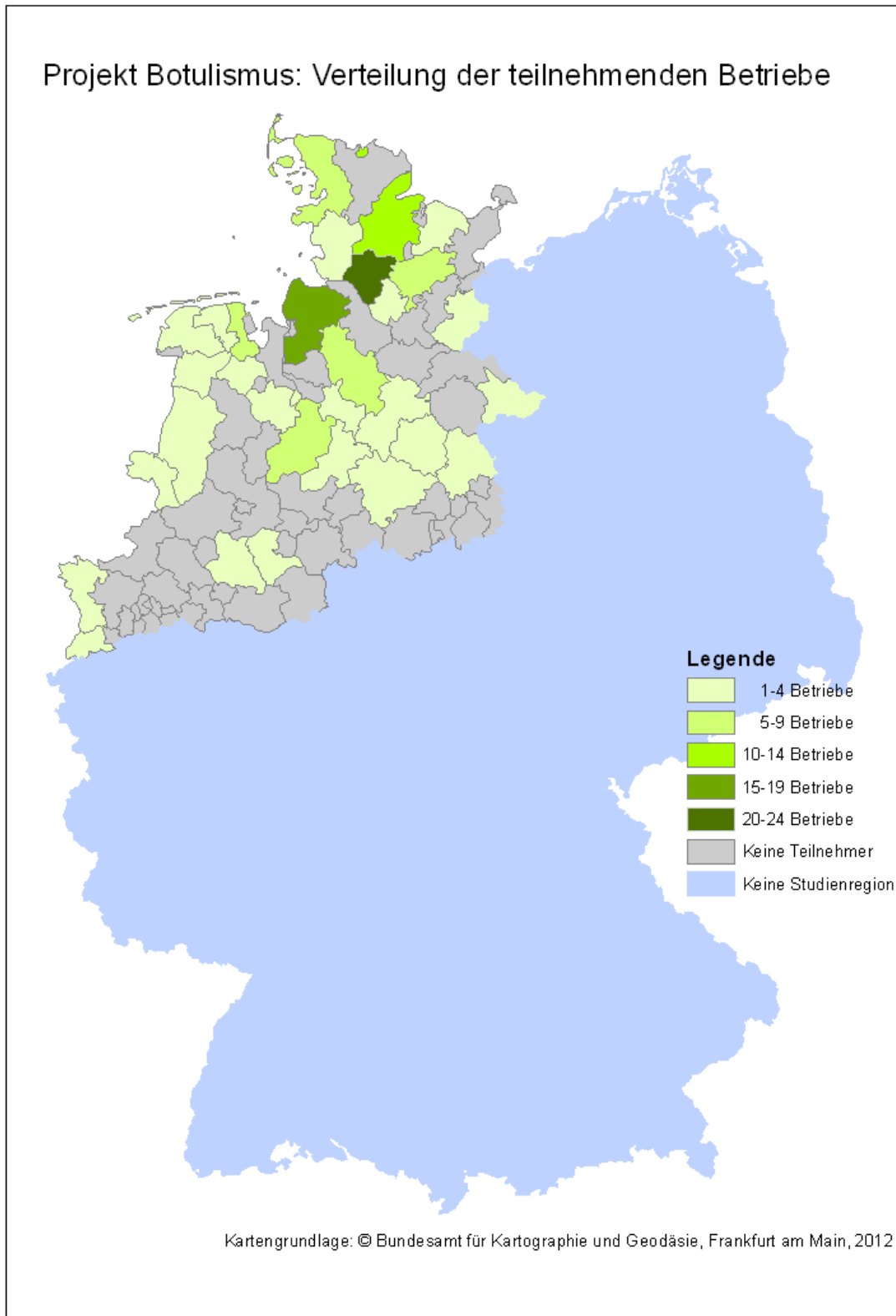


Abb. 9: Karte der Studienregion mit Verteilung der teilnehmenden Betriebe

Tab. 25: Die häufigsten Symptome der klinischen Untersuchung der **Verdachtstiere**, prozentual [%] und absolut [n], bezogen auf die Gesamtzahl der Tiere, die auf das jeweilige Symptom untersucht wurde [n(untersuchte Tiere gesamt)], eingeteilt nach Organsystemen und Betriebsgruppen, ausgewählt auf der Grundlage des Vorkommens bei Verdachtstieren insgesamt. Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Betriebsgruppen innerhalb der beiden Tiergruppen mittels Chi²- bzw. Fishers exakter-Test (***) = p ≤ 0,001; ** = p ≤ 0,01 ; * = p ≤ 0,05; n.s. = p > 0,05)

SYMPTOM	VERDACHTSTIERE % (n)				Chi ² bzw. Fishers exakter p-Wert		
	Betriebsgruppe	K	F1	F2		Gesamt	
n-Betriebe	47	45	47	139			
n-Tiere (untersucht)	235	225	235	695			
HERZ-/KREISLAUF	gefüllte Jugularvene	53,85 (126) 234	57,14 (128) 224	46,81 (110) 235	52,52 (364) 693	0,0758 n.s.	
	veränderte Herzintensität (schwach, pochend)	51,06 (120) 235	44,39 (99) 223	54,46 (128) 235	50,08 (347) 693	0,0914 n.s.	
	abweichende Herzfrequenz (<64/min, >80/min)	47,66 (112) 235	46,43 (104) 224	42,3 (99) 234	45,46 (315) 693	0,4768 n.s.	
	schlecht abgesetzte Herztöne	20,85 (49) 235	21,43 (48) 224	20,43 (48) 235	20,89 (145) 694	0,9655 n.s.	
	Nebengeräusche endokardial	19,66 (46) 234	13,84 (31) 224	19,75 (46) 233	17,79 (123) 691	0,1691 n.s.	
	positiver Venenpuls	11,97 (28) 234	17,41 (39) 224	14,04 (33) 235	14,43 (100) 693	0,2477 n.s.	
	Nebengeräusche exokardial	7,66 (18) 235	8,93 (20) 224	10,22 (24) 235	8,93 (62) 694	0,6245 n.s.	
	Herzarrhythmie	5,98 (14) 234	9,38 (21) 224	8,51 (20) 235	7,94 (55) 693	0,3748 n.s.	
	Schwanzspitzennekrose	5,98 (14) 234	5,81 (13) 224	11,20 (26) 232	7,68 (53) 690	0,0466 *	
	gerötete Maulschleimhaut	4,72 (11) 233	5,38 (12) 223	6,39 (15) 235	5,50 (38) 691	0,7295 n.s.	
	ATMUNGSAPPARAT	verschärfte Lungengeräusche	40,86 (96) 235	44,19 (99) 224	37,03 (87) 235	40,64 (282) 694	0,2931 n.s.
		seröser Nasenausfluss	35,19 (82) 233	32,88 (73) 222	25,53 (60) 235	31,15 (215) 690	0,0625 n.s.
		Atemfrequenz >36/min	28,94 (68) 235	33,93 (76) 224	24,68 (58) 235	29,11 (202) 694	0,0926 n.s.
		Dyspnoe	16,17 (38) 235	20,09 (45) 235	18,72 (44) 235	18,30 (127) 694	0,5431 n.s.
muköser Nasenausfluss		12,45 (29) 233	10,31 (23) 223	17,87 (42) 235	13,60 (94) 691	0,0507 n.s.	
blasse Maulschleimhaut		9,87 (23) 233	13,84 (31) 224	10,21 (24) 235	11,27 (78) 692	0,3334 n.s.	
purulenter Nasenausfluss		2,58 (6) 233	4,49 (10) 223	3,83 (9) 235	3,62 (25) 691	0,5388 n.s.	
Röhrenatmen		2,56 (6) 235	4,02 (9) 224	1,72 (4) 233	2,75 (19) 692	0,3144 n.s.	
zyanotische Maulschleimhaut		0,00 (0) 233	0,45 (1) 223	0,85 (2) 235	0,43 (3) 691	0,3749 n.s. 0,544	
Stridores		0,00 (0) 233	0,45 (1) 223	0,43 (1) 235	0,29 (2) 691	0,5997 n.s. 0,7703	

SYMPTOM	K	VERDACHTSTIERE % (n)			Chi ² bzw. Fishers exakter Test p-Wert		
		n (untersuchte Tiere gesamt)					
Betriebsgruppe		F1	F2	Gesamt			
n-Betriebe	47	45	47	139			
n-Tiere (untersucht)	235	225	235	695			
NEUROLOGIE	erhöhte Speichelmenge	41,2 (96) 233	36,61 (82) 224	32,76 (77) 235	36,85 (255) 692	0,1664 n.s.	
	gesenkter Schwanztonus	22,65 (53) 234	18,83 (42) 223	25,21 (59) 234	22,29 (154) 691	0,2579 n.s.	
	herabgesetzter Mimiktonus	14,59 (34) 233	23,77 (53) 223	25,10 (59) 235	21,13 (146) 691	0,0104 *	
	nervöses Verhalten	14,89 (35) 235	16,52 (37) 224	27,35 (64) 234	19,62 (136) 693	0,0011 **	
	verzögerter Pupillarreflex	15,02 (35) 233	15,69 (35) 223	23,41 (55) 235	18,09 (125) 691	0,033 *	
	gesenkte Zungenspannung	15,88 (37) 233	17,41 (39) 224	16,59 (39) 235	16,62 (105) 692	0,9079 n.s.	
	herabgesetzter Oberschenkelreflex	10,21 (24) 235	12,95 (29) 224	14,04 (33) 235	12,39 (86) 694	0,4315 n.s.	
	gesenkte Oberflächen-sensibilität	6,38 (15) 235	9,82 (22) 224	10,21 (24) 235	8,79 (61) 694	0,274 n.s.	
	herabgesetzter Pannikulusreflex	5,53 (13) 235	8,04 (18) 224	9,36 (22) 235	7,64 (53) 694	0,284 n.s.	
	erhöhte Speichelviskosität	5,58 (13) 233	4,93 (11) 223	6,81 (16) 235	5,79 (40) 691	0,6817 n.s.	
	UNSPECIFISCHE KRANKHEITSSYMPTOME	stumpfes/struppiges Haarkleid	86,76 (203) 234	89,19 (198) 222	91,02 (213) 234	88,98 (614) 690	0,3339 n.s.
		Hohlschwanz	78,72 (185) 235	78,13 (175) 224	79,49 (186) 234	78,79 (546) 693	0,938 n.s.
		schlechter Klauenpflegezustand	57,08 (133) 233	66,67 (146) 219	60,52 (141) 233	61,31 (420) 685	0,1071 n.s.
		Hautverletzungen	59,57 (140) 235	59,38 (133) 224	62,39 (146) 234	60,46 (419) 693	0,7584 n.s.
erhöhte Bauchdecken-spannung		52,77 (124) 235	54,02 (121) 224	55,32 (130) 235	54,04 (375) 694	0,8571 n.s.	
Kyphose		45,11 (106) 235	49,55 (111) 224	52,13 (122) 234	48,92 (339) 693	0,3053 n.s.	
Gliedmaßen-entlastung		30,21 (71) 235	42,41 (95) 224	36,32 (85) 234	36,22 (251) 693	0,0249 *	
Umfangs-vermehrungen		28,94 (68) 235	33,49 (224) 224	39,31 (92) 234	33,91 (235) 693	0,0589 n.s.	
aufgezogener Bauch	20,0 (47) 235	23,67 (53) 224	29,06 (68) 234	24,24 (168) 693	0,0706 n.s.		
erhöhte Episkleralgefäß-füllung	17,03 (40) 235	18,76 (42) 224	23,40 (55) 235	19,74 (137) 694	0,1992 n.s.		

SYMPTOM	K	VERDACHTSTIERE % (n)			Gesamt	Chi ² bzw. Fishers exakter Test p-Wert		
		n (untersuchte Tiere gesamt)	F1	F2				
Betriebsgruppe	47	45	47	139				
n-Betriebe	235	225	235	695				
n-Tiere (untersucht)								
HARN- UND GESCHLECHTSAPPARAT	Vulvaschrägstellung	60,68 (142) 234	59,64 (133) 223	66,24 (155) 234	62,23 (430) 691	0,2902	n.s.	
	Ovarienbefunde (Zyste oder ohne Funktion)	32,60 (74) 227	32,24 (69) 214	27,43 (62) 226	30,74 (205) 667	0,4156	n.s.	
	Uterusfluktuation	14,53 (34) 234	5,38 (12) 223	8,09 (19) 235	9,39 (65) 692	0,0025	**	
	Nieren-vergrößerung	7,66 (18) 235	8,97 (20) 223	5,11 (12) 235	7,21 (50) 693	0,2652	n.s.	
	Uterus-vergrößerung	9,83 (23) 234	5,83 (13) 223	5,53 (13) 235	7,08 (49) 692	0,1304	n.s.	
	Urovagina	7,23 (17) 235	7,14 (16) 224	2,55 (6) 235	5,62 (39) 694	0,0428	*	
	Blut im Harn (Harnstick)	3,22 (7) 217	3,83 (8) 209	1,74 (4) 229	2,90 (19) 655	0,4062	n.s.	
	mangelhafter Vulvaschluss	2,99 (7) 234	3,59 (8) 223	2,14 (5) 234	2,89 (20) 691	0,6483	n.s.	
	veränderter Vulvafluss (eitrig, übelriechend, Nachgeburt)	2,13 (5) 234	1,78 (4) 224	4,27 (10) 234	2,75 (19) 692	0,2077	n.s.	
	Pneumovagina	3,83 (9) 235	3,13 (7) 224	1,28 (3) 235	2,74 (19) 694	0,2162	n.s.	
	VERDAUUNG	Kotbeimengung-Sand	57,26 (134) 234	59,37 (133) 224	45,11 (106) 235	53,83 (373) 693	0,0039	**
		abweichende Kotkonsistenz (fest, dünnbreiig, suppig, wässrig)	45,30 (106) 234	42,86 (96) 224	44,68 (105) 235	44,30 (307) 693	0,8618	n.s.
		abweichende Kotzerkleinerung (fein, schlecht)	42,31 (99) 234	48,21 (108) 224	41,70 (99) 235	44,01 (305) 693	0,3027	n.s.
gesenkte Pansenfüllung (rektal)		28,51 (67) 235	37,67 (84) 223	33,61 (79) 235	33,18 (230) 693	0,1132	n.s.	
gesenkte Pansenintensität		19,66 (46) 234	20,09 (45) 224	27,23 (64) 235	22,37 (155) 693	0,0879	n.s.	
veränderte Pansenschichtung		14,10 (33) 234	17,42 (39) 224	20,44 (48) 235	17,32 (120) 693	0,1944	n.s.	
Gesenkte Kotmenge		16,24 (38) 234	16,52 (37) 224	17,02 (40) 235	16,59 (115) 235	0,9737	n.s.	
Kotbeimengung-Schleim		11,97 (28) 234	11,21 (25) 223	11,91 (28) 235	11,71 (81) 692	0,9617	n.s.	
veränderte Kotfarbe (hell-, dunkel-oliv, schwarz)		8,97 (21) 234	10,72 (24) 224	13,19 (31) 235	10,96 (76) 693	0,3401	n.s.	
Ketonkörper-Harnstick		12,85 (28) 218	12,44 (26) 209	5,24 (12) 229	10,06 (66) 656	0,0108	*	

SYMPTOM	K	VERDACHTSTIERE % (n)			Chi ² bzw. Fishers exakter Test p-Wert		
		n (untersuchte Tiere gesamt)					
Betriebsgruppe		F1	F2	Gesamt			
n-Betriebe	47	45	47	139			
n-Tiere (untersucht)	235	225	235	695			
EUTER	Befund bei Euterpalpation (akut, chronisch)	10,64 (25) 235	17,49 (69) 223	12,34 (29) 235	13,42 (93) 693	0,083	n.s.
	Zitzenhautveränderungen	9,02 (21) 233	10,76 (24) 223	8,93 (21) 235	9,55 (66) 691	0,7559	n.s.
	Befund im Eutersekret (Flocken und/ oder Milchcharakter nicht erhalten)	7,66 (18) 235	12,56 (28) 223	7,69 (18) 234	9,25 (64) 692	0,1171	n.s.
	Euterhautekzem	8,12 (19) 234	8,97 (20) 223	6,38 (15) 235	7,80 (54) 692	0,5734	n.s.
	Euterzitzenverletzung	7,26 (17) 234	4,03 (9) 223	5,10 (12) 235	5,49 (38) 692	0,3018	n.s.
	Tarsus-Periartikulär	49,79 (116) 233	45,20 (99) 219	57,33 (133) 232	50,88 (348) 684	0,0335	*
	Carpus- Periartikulär	33,90 (79) 233	39,10 (86) 220	52,40 (122) 233	41,80 (287) 686	0,0002	***
	Tarsus-Gelenksfüllung	21,46 (50) 233	19,55 (43) 220	20,60 (48) 233	20,55 (141) 686	0,8806	n.s.
	Kronsaum-Weichteilschwellung	12,45 (29) 233	25,81 (56) 217	23,61 (55) 233	20,50 (140) 683	0,0007	***
	BGSS ³ -Gelenksfüllung	20,69 (48) 232	17,35 (38) 219	20,26 (47) 232	19,47 (133) 683	0,6254	n.s.
BEWEGUNGSAPPARAT ²	Knie-Gelenksfüllung	20,60 (48) 233	17,35 (38) 219	18,10 (42) 232	18,71 (128) 684	0,6475	n.s.
	Fesselgelenk-Gelenksfüllung	12,50 (29) 232	10,50 (23) 219	11,26 (26) 231	11,44 (78) 682	0,7964	n.s.
	Knie- Periartikulär	6,47 (15) 232	6,39 (14) 219	11,97 (28) 234	8,32 (57) 685	0,0453	*
	Fesselgelenk-Periartikulär	7,30 (17) 233	11,47 (25) 218	6,87 (16) 233	8,48 (58) 684	0,1565	n.s.
	Carpus-Gelenksfüllung	7,76 (18) 232	7,73 (17) 220	8,58 (20) 233	8,03 (55) 685	0,9291	n.s.

² Veränderungen am Bewegungsapparat periartikulär in Form von Phlegmone, Abszess, Hämatom, Bursa oder Dekubitus; bei Weichteilschwellungen in Form von Phlegmone, Abszess oder Hämatom

³ BGSS= Beugesehnscheide

Tab. 26: Die häufigsten Symptome der klinischen Untersuchung der **Kontrolltiere**, prozentual [%] und absolut [n], bezogen auf die Gesamtzahl der Tiere, die auf das jeweilige Symptom untersucht wurde [n (untersuchte Tiere gesamt)], eingeteilt nach Organsystemen und Betriebsgruppen, ausgewählt auf der Grundlage des Vorkommens bei Verdachtstieren insgesamt. Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Betriebsgruppen innerhalb der beiden Tiergruppen mittels Chi²- bzw. Fishers Exakter-Test (***) = p ≤ 0,001; ** = p ≤ 0,01 ; * = p ≤ 0,05; n.s. = p > 0,05).

Betriebsgruppe	SYMPTOM	Kontrolltiere % (n)			Chi ² bzw. Fishers exakter Test p-Wert		
		K	F1	F2		Gesamt	
n-Betriebe		47	45	47	139		
n-Tiere (untersucht)		235	225	234 ¹	694 ¹		
HERZ-/KREISLAUF	gefüllte Jugularvene	10,64 (25) 235	13,78 (31) 225	12,88 (30) 233	12,41 (86) 693	0,5734 n.s.	
	veränderte Herzintensität (schwach, pochend)	27,77 (65) 234	26,78 (60) 224	25,64 (60) 234	26,74 (185) 692	0,8723 n.s.	
	abweichende Herzfrequenz (<64/min, >80/min)	47,66 (112) 235	43,31 (97) 224	41,88 (98) 234	44,30 (307) 693	0,4231 n.s.	
	schlecht abgesetzte Herztöne	15,32 (36) 235	12,50 (28) 224	14,53 (34) 234	14,14 (98) 693	0,6721 n.s.	
	Nebengeräusche endokardial	8,08 (19) 235	10,27 (23) 224	9,40 (22) 234	9,23 (64) 693	0,7177 n.s.	
	positiver Venenpuls	0,43 (1) 235	0,00 (0) 225	0,86 (2) 233	0,43 (3) 693	0,3759 n.s.	
	Nebengeräusche exokardial	2,13 (5) 235	2,67 (6) 225	2,99 (7) 234	2,59 (18) 694	0,8381 n.s.	
	Herzarrhythmie	5,11 (12) 235	4,91 (11) 224	4,27 (10) 234	4,76 (33) 693	0,9069 n.s.	
	Schwanzspitzen- nekrose	2,55 (6) 235	2,23 (5) 224	2,59 (6) 232	2,46 (17) 691	0,9645 n.s.	
	gerötete Maulschleimhaut	3,43 (8) 233	5,38 (12) 223	4,70 (11) 234	4,49 (31) 690	0,5936 n.s.	
	ATMUNGSAPPARAT	verschärfte Lungengeräusche	14,89 (35) 235	14,73 (33) 224	14,96 (35) 234	14,87 (103) 693	0,9976 n.s.
		seröser Nasenausfluss	34,34 (80) 233	26,46 (59) 223	32,48 (76) 234	31,16 (215) 690	0,1667 n.s.
		Atemfrequenz >36/min	26,92 (63) 234	32,59 (73) 224	28,76 (67) 233	29,38 (203) 691	0,3992 n.s.
		Dyspnoe	5,96 (14) 235	8,93 (20) 224	7,27 (17) 234	7,36 (51) 693	0,4748 n.s.
		muköser Nasenausfluss	10,73 (25) 233	12,16 (27) 222	14,53 (34) 234	12,48 (86) 689	0,4552 n.s.
		blasse Maulschleimhaut	3,43 (8) 233	1,79 (4) 223	4,70 (11) 234	3,33 (23) 690	0,2225 n.s.
		purulenter Nasenausfluss	1,72 (4) 233	4,05 (9) 222	1,71 (4) 234	2,47 (17) 689	0,1803 n.s.
		Röhrenatmen	0,00 (0) 235	0,45 (1) 224	0,00 (0) 234	0,14 (1) 693	0,3505 n.s.
		zyanotische Maulschleimhaut	0,00 (0) 233	0,45 (1) 223	0,00 (0) 234	0,14 (1) 690	0,3504 n.s.
Stridores		0,00 (0) 233	0,00 (0) 224	0,43 (1) 234	0,14 (1) 691	0,3761 n.s.	

Betriebsgruppe	SYMPTOM	K	Kontrolltiere % (n)			Chi ² bzw. Fishers exakter Test p-Wert	
			n (untersuchte Tiere gesamt)				
n-Betriebe		47	F1 45	F2 47	Gesamt 139		
n-Tiere (untersucht)		235	225	234 ¹	694 ¹		
NEUROLOGIE	erhöhte Speichelmenge	27,90 (65) 233	28,25 (63) 223	32,05 (75) 234	29,42 (203) 690	0,5523 n.s.	
	gesenkter Schwanztonus	11,91 (28) 235	17,41 (39) 224	15,08 (35) 232	14,76 (102) 691	0,2488 n.s.	
	herabgesetzter Mimiktonus	22,32 (52) 233	17,04 (38) 223	27,15 (63) 232	22,24 (153) 688	0,0346 *	
	nervöses Verhalten	22,98 (54) 235	25,33 (57) 225	32,05 (75) 234	26,81 (186) 694	0,0712 n.s.	
	verzögerter Pupillarreflex	6,89 (16) 232	10,22 (23) 225	14,53 (34) 234	10,57 (73) 691	0,027 *	
	gesenkte Zungenspannung	14,17 (33) 233	12,56 (28) 223	12,82 (30) 234	13,18 (91) 690	0,8612 n.s.	
	herabgesetzter Oberschenkelreflex	9,36 (22) 235	9,33 (21) 225	7,73 (18) 233	8,80 (61) 693	0,776 n.s.	
	gesenkte Oberflächen- sensibilität	5,11 (12) 235	5,33 (12) 225	7,30 (17) 233	5,92 (41) 693	0,5457 n.s.	
	herabgesetzter Pannikulusreflex	1,70 (4) 235	2,67 (6) 225	4,72 (11) 233	3,03 (21) 693	0,1512 n.s.	
	erhöhte Speichelviskosität	0,86 (2) 232	4,04 (9) 223	2,14 (5) 234	2,32 (16) 689	0,078 n.s.	
	UNSPECIFISCHE KRANKHEITSSYMPTOME	stumpfes/struppiges Haarkleid	17,17 (40) 235	17,78 (40) 222	14,10 (33) 233	16,33 (113) 690	0,5183 n.s.
		Hohlschwanz	15,74 (37) 235	14,86 (33) 222	15,45 (36) 233	15,36 (106) 690	0,9656 n.s.
		schlechter Klauenpflege- zustand	32,48 (76) 234	28,12 (63) 224	31,33 (73) 233	30,68 (212) 691	0,5799 n.s.
		Hautverletzungen	19,23 (45) 234	19,56 (44) 225	19,31 (45) 233	19,36 (134) 692	0,9958 n.s.
erhöhte Bauchdecken- spannung		16,60 (39) 235	16,59 (37) 223	13,30 (31) 233	15,48 (107) 691	0,5282 n.s.	
Kyphose		5,96 (14) 235	3,56 (8) 225	5,56 (8) 234	5,04 (35) 694	0,4542 n.s.	
Gliedmaßen- entlastung		0,00 (0) 235	0,00 (0) 225	0,43 (1) 234	0,14 (1) 694	0,3737 n.s. 0,6614	
Umfangs- vermehrungen		7,26 (17) 234	6,22 (14) 225	15,02 (35) 233	9,54 (66) 692	0,002 **	
aufgezogener Bauch		0,00 (0) 235	0,00 (0) 225	0,00 (0) 234	0,00 (0) 694	- -	
erhöhte Episkleralgefäß- füllung		11,64 (27) 232	10,22 (23) 225	16,67 (39) 234	12,88 (89) 691	0,0942 n.s.	

SYMPTOM	K	Kontrolltiere % (n)			Gesamt	Chi ² bzw. Fishers exakter Test p-Wert		
		n (untersuchte Tiere gesamt)	F1	F2				
Betriebsgruppe	47	45	47	139				
n-Betriebe	235	225	234 ¹	694 ¹				
nTiere (untersucht)	235	225	234 ¹	694 ¹				
HARN- UND GESCHLECHTSAPPARAT	Vulvaschräg-stellung	21,70 (51) 235	28,13 (63) 224	30,60 (71) 232	26,77 (185) 691	0,081	n.s.	
	Ovarienbefunde (Zyste oder ohne Funktion)	11,86 (23) 194	16,15 (31) 192	10,66 (21) 197	12,87 (75) 583	0,2376	n.s.	
	Uterusfluktuation	2,13 (5) 235	5,33 (12) 225	6,47 (15) 232	4,62 (32) 692	0,0685	n.s.	
	Nierenvergrößerung	3,40 (8) 235	1,33 (3) 225	3,02 (7) 232	2,60 (18) 692	0,3355	n.s.	
	Uterusvergrößerung	10,21 (24) 235	9,78 (22) 225	9,05 (21) 232	9,68 (67) 692	0,9124	n.s.	
	Urovagina	0,85 (2) 235	1,79 (4) 224	1,29 (3) 232	1,30 (9) 691	0,6772 0,5881	n.s.	
	Blut im Harn (Harnstick)	0,91 (2) 220	1,53 (3) 197	2,78 (6) 216	1,74 (11) 633	0,3156 0,322	n.s.	
	mangelhafter Vulvaschluss	0,85 (2) 235	0,00 (0) 224	0,43 (1) 232	0,43 (3) 691	0,3826 0,7769	n.s.	
	veränderter Vulvausfluss (eitrig, übelriechend, Nachgeburten)	0,85 (2) 235	1,78 (4) 224	1,72 (4) 232	1,44 (10) 691	0,6407	n.s.	
	Pneumovagina	0,43 (1) 235	0,00 (0) 224	0,00 (0) 232	0,14 (1) 691	0,3785 1	n.s.	
	VERDAUUNG	Kotbeimengung-Sand	54,71 (128) 234	51,78 (116) 224	40,35 (94) 233	48,92 (338) 691	0,0047	**
		abweichende Kotkonsistenz (fest, dünnbreiig, suppig, wässrig)	29,49 (69) 234	31,39 (70) 223	43,35 (101) 233	34,78 (240) 690	0,0031	**
		abweichende Kotzerkleinerung (fein, schlecht)	34,61 (81) 234	42,15 (94) 223	43,34 (101) 233	40,00 (276) 690	0,1139	n.s.
		gesenkte Pansenfüllung (rektal)	26,07 (61) 234	35,57 (80) 225	27,15 (63) 232	29,52 (204) 691	0,0523	n.s.
gesenkte Pansenintensität		10,21 (24) 235	12,50 (28) 224	12,45 (29) 233	11,70 (81) 692	0,6814	n.s.	
veränderte Pansenschichtung		10,22 (24) 235	12,11 (27) 223	10,73 (25) 233	11,00 (76) 691	0,8002	n.s.	
gesenkte Kotmenge		13,61 (32) 235	13,84 (31) 224	15,02 (35) 233	14,16 (98) 692	0,8966	n.s.	
Kotbeimengung-Schleim		13,67 (32) 234	18,01 (40) 222	18,45 (43) 233	16,69 (115) 689	0,3114	n.s.	
veränderte Kotfarbe (hell-, dunkel-oliv, schwarz)		3,42 (8) 234	6,73 (15) 223	8,15 (19) 233	6,09 (42) 690	0,09	n.s.	
Ketonkörper-Harnstick		12,27 (27) 220	12,12 (24) 198	10,64 (23) 216	11,67 (74) 634	0,8456	n.s.	

SYMPTOM	K	Kontrolltiere % (n)			Chi ² bzw. Fishers exakter Test p-Wert	
		n (untersuchte Tiere gesamt)	F1	F2		Gesamt
Betriebsgruppe						
n-Betriebe	47	45	47	139		
n-Tiere (untersucht)	235	225	234 ¹	694 ¹		
EUTER	Befund bei Euterpalpation (akut, chronisch)	4,68 (11) 235	5,36 (12) 224	3,02 (7) 232	4,34 (30) 691	0,4491 n.s.
	Zitzenhautveränderungen	7,66 (18) 235	7,11 (16) 225	6,46 (15) 232	7,08 (49) 692	0,881 n.s.
	Befund im Eutersekret (Milchcharakter noch erhalten oder nicht)	5,54 (13) 235	2,23 (5) 224	3,02 (7) 232	3,62 (25) 691	0,1393 n.s.
	Euterhautekzem	6,84 (16) 234	4,04 (9) 223	2,59 (6) 232	4,50 (31) 689	0,0795 n.s.
	Euterzitzenverletzung	3,40 (8) 235	0,44 (1) 225	3,88 (9) 232	2,60 (18) 692	0,0445 *
BEWEGUNGSAPPARAT ²	Tarsus-Periartikulär	29,00 (67) 231	35,32 (71) 201	42,79 (98) 229	35,70 (236) 661	0,0085 **
	Carpus- Periartikulär	24,70 (57) 231	26,10 (52) 199	31,10 (71) 228	27,40 (18) 658	0,2686 n.s.
	Tarsus-Gelenksfüllung	17,03 (39) 229	16,34 (33) 202	19,30 (44) 228	17,60 (116) 659	0,6953 n.s.
	Kronsaum- Weichteilschwellung	0,00 (0) 231	2,97 (6) 202	0,88 (2) 228	1,21 (8) 661	0,016 0,0104 *
	BGSS ³ -Gelenksfüllung	7,52 (17) 226	11,44 (23) 201	15,63 (35) 224	11,52 (75) 651	0,0267 *
	Knie-Gelenksfüllung	21,40 (49) 229	15,58 (31) 199	18,94 (43) 227	18,78 (123) 655	0,3057 n.s.
	Fesselgelenk-Gelenksfüllung	4,42 (10) 226	4,48 (9) 201	9,42 (21) 223	6,15 (40) 650	0,0437 *
	Knie- Periartikulär	1,74 (4) 230	2,03 (4) 197	2,64 (6) 227	2,14 (14) 654	0,7937 0,7953 n.s.
	Fesselgelenk-Periartikulär	0,43 (1) 230	2,02 (4) 198	0,44 (1) 227	0,92 (6) 655	0,1487 0,255 n.s.
	Carpus-Gelenksfüllung	5,24 (12) 229	2,99 (6) 201	7,08 (16) 226	5,18 (34) 656	0,1627 n.s.

¹ ein Kontrolltier war eine hochtragende Färsen und fiel somit aus dem Rahmen des Studiendesigns² Veränderungen am Bewegungsapparat periartikulär in Form von Phlegmone, Abszess, Hämatom, Bursa oder Dekubitus; bei Weichteilschwellungen in Form von Phlegmone, Abszess oder Hämatom³ BGSS= Beugesehnscheide

Tab. 27: Prüfung der häufigsten Symptome der klinischen Untersuchung, eingeteilt nach Organsystemen, auf signifikante Unterschiede zwischen den Verdachts- und den Kontrolltieren unabhängig von den Betriebsgruppen mittels Chi²- bzw. Fishers Exakter- Test. (** = p ≤ 0,001; ** = p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05= n.s. = p > 0,05).

SYMPTOM		Chi ² / Fishers exakter Test V/K-Tiere	SYMPTOM		Chi ² / Fishers exakter Test V/K-Tiere
n-Betriebe		139	n-Betriebe		139
n-Tiere (untersucht)		1389	n-Tiere (untersucht)		1389
HERZ-/KREISLAUF	gefüllte Jugularvene	< 0,0001 ***	NEUROLOGIE	erhöhte Speichelmenge	0,0130 *
	veränderte Herzintensität	< 0,0001 ***		gesenkter Schwanztonus	0,0011 **
	abweichende Herzfrequenz	0,4275 n.s.		herabgesetzter Mimiktonus	0,4882 n.s.
	schlecht abgesetzte Herztöne	0,0009 ***		nervöses Verhalten	0,0055 **
	Nebengeräusche endokardial	< 0,0001 ***		verzögerter Pupillarreflex	< 0,0001 ***
	positiver Venenpuls	< 0,0001 ***		gesenkte Zungenspannung	0,1930 n.s.
	Nebengeräusche exokardial	< 0,0001 ***		Oberschenkelreflex ↓	0,0299 *
	Herzarrhythmie	0,0154 *		Oberflächensensibilität ↓	0,1101 n.s.
	Schwanzspitzennekrose	< 0,0001 ***		Pannikulusreflex ↓	0,0001 ***
	gerötete Maulschleimhaut	0,3720 n.s.		erhöhte Speichelviskosität	0,0011 **
ATMUNGSAPPARAT	verschärfte Lungengeräusche	< 0,0001 ***	UNSPECIFISCHE KRANKHEITSSYMPTOME	stumpfes Haarkleid	< 0,0001 ***
	seröser Nasenausfluss	1,00 n.s.		Hohlschwanz	< 0,0001 ***
	Atemfrequenz >36/min	0,9117 n.s.		Klauenpflegezustand ↓	< 0,0001 ***
	Dyspnoe	< 0,0001 ***		Hautverletzungen	< 0,0001 ***
	muköser Nasenausfluss	0,8198 n.s.		Bauchdeckenspannung ↑	< 0,0001 ***
	blasse Maulschleimhaut	< 0,0001 ***		Kyphose	< 0,0001 ***
	purulenter Nasenausfluss	0,0501 n.s.		Gliedmaßen Entlastung	< 0,0001 ***
	Röhrenatmen	< 0,0001 ***		Umfangvermehrungen	< 0,0001 ***
	zyanotische Maulschleimhaut	0,6245 n.s.		aufgezogener Bauch	< 0,0001 ***
	Stridores	1,00 n.s.		Episkleralgefäßfüllung ↑	0,0003 ***
SYMPTOM		Chi ² / Fishers exakter Test V/K-Tiere	SYMPTOM		Chi ² / Fishers exakter Test V/K-Tiere
n-Betriebe		139	n-Betriebe		139
n-Tiere (untersucht)		1389	n-Tiere (untersucht)		1389
HARN- UND GESCHLECHTSAPPARAT	Vulvaschrägstellung	< 0,0001 ***	EUTER	Befund bei Euterpalpation	< 0,0001 ***
	Ovarienbefunde	< 0,0001 ***		Zitzenhautveränderungen	0,1631 n.s.
	Uterusfluktuation	0,0005 ***		Befund im Eutersekret	0,0001 ***
	Nierenvergrößerung	0,0001 ***		Euterhautekzem	0,0106 *
	Uterusvergrößerung	0,0808 n.s.		Euterzitzenverletzung	0,0158 *
	Urovagina	< 0,0001 ***	BEWEGUNGSAPPARAT	Tarsus-Periartikulär	< 0,0001 ***
	Blut im Harn (Harnstick)	0,1399 n.s.		Carpus- Periartikulär	< 0,0001 ***
	mangelhafter Vulvaschluss	0,0004 ***		Tarsus-Gelenksfüllung	0,1687 n.s.
	veränderter Vulvausfluss	0,2244 n.s.		Kronsaum-	
	Pneumovagina	< 0,0001 ***		Weichteilschwellung	< 0,0001 ***
VERDAUUNG	Kotbeimengung- Sand	0,1414 n.s.		BGSS- Gelenksfüllung	< 0,0001 ***
	abweichende Kotkonsistenz	0,0002 ***		Knie-Gelenksfüllung	0,9756 n.s.
	Kotzerkleinerung fein,schlecht	0,2546 n.s.		Fesselgelenk- Gelenksfüllung	0,0007 ***
	Pansenfüllung ↓	0,0758 n.s.		Knie- Periartikulär	< 0,0001 ***
	Pansenintensität ↓	< 0,0001 ***		Fesselgelenk- Periartikulär	< 0,0001 ***
	Pansenschichtung ↓	< 0,0001 ***	Carpus-Gelenksfüllung	0,0363 *	
	Kotmenge ↓	0,0996 n.s.			
	Kotbeimengung- Schleim	0,0183 *			
	veränderte Kotfarbe	0,0034 **			
	Ketonkörper- Harnstick	0,6129 n.s.			

Tab. 28: Arithmetischen Mittelwerte [MW] mit Standardabweichung [STD] von den aus venösem Serum bestimmten Parametern der Verdachts- und Kontrolltiere, unterteilt in die drei Betriebsgruppen.

Parameter/Einheit	Betriebs- gruppe	Verdachtstiere		Kontrolltiere	
		MW \pm STD	N	MW \pm STD	N
AST [U/l]	K	76,65 \pm 32,39	234	76,02 \pm 30,32	235
	F 1	74,26 \pm 29,27	225	76,71 \pm 27,02	224
	F 2	75,01 \pm 26,39	235	76,72 \pm 28,56	233
beta-HBS [U/l]	K	0,58 \pm 0,32	234	0,58 \pm 0,26	235
	F 1	0,57 \pm 0,31	225	0,58 \pm 0,28	225
	F 2	0,54 \pm 0,25	235	0,61 \pm 0,36	234
Bilirubin [μ mol/l]	K	3,23 \pm 1,18	233	3,30 \pm 1,31	234
	F 1	3,21 \pm 1,46	225	3,30 \pm 1,43	224
	F 2	3,33 \pm 1,19	229	3,42 \pm 1,37	230
Cholesterin [mmol/l]	K	4,71 \pm 1,34	235	4,98 \pm 1,33	235
	F 1	4,30 \pm 1,23	225	4,75 \pm 1,23	225
	F 2	4,41 \pm 1,45	235	4,65 \pm 1,23	234
Freie Fettsäuren [μ mol/l]	K	273,34 \pm 262,84	235	249,30 \pm 272,28	235
	F 1	215,09 \pm 190,41	225	253,39 \pm 297,92	225
	F 2	221,31 \pm 142,00	235	237,24 \pm 257,94	234
Glutar-Aldehyd- Probe [min]	K	6,53 \pm 4,30	235	12,47 \pm 4,23	235
	F 1	5,49 \pm 3,98	225	11,41 \pm 4,32	224
	F 2	5,22 \pm 3,34	235	10,85 \pm 4,34	233
Gesamteiweiß [g/l]	K	82,03 \pm 8,89	235	76,18 \pm 6,53	235
	F 1	84,50 \pm 10,04	225	77,20 \pm 6,56	225
	F 2	84,20 \pm 10,02	235	76,65 \pm 8,18	234
Gamma-GT [U/l]	K	32,00 \pm 15,69	233	33,26 \pm 14,29	234
	F 1	34,89 \pm 21,80	225	32,46 \pm 11,79	224
	F 2	33,01 \pm 24,07	229	31,56 \pm 13,17	230
GLDH [U/l]	K	25,50 \pm 35,94	234	26,16 \pm 29,46	235
	F 1	19,74 \pm 19,45	225	25,42 \pm 24,32	224
	F 2	21,36 \pm 24,06	235	23,58 \pm 27,53	233
Kupfer [μ mol/l]	K	12,46 \pm 2,57	235	11,16 \pm 2,29	235
	F 1	12,48 \pm 2,81	225	11,41 \pm 2,29	225
	F 2	12,67 \pm 3,04	235	11,58 \pm 2,50	234
Zink [μ mol/l]	K	11,42 \pm 2,43	235	13,54 \pm 2,36	235
	F 1	10,72 \pm 2,52	225	12,81 \pm 2,50	225
	F 2	11,13 \pm 2,46	235	12,89 \pm 2,31	234
Selen [μ g/l]	K	116,18 \pm 25,35	222	122,52 \pm 25,92	223
	F 1	112,00 \pm 27,72	215	113,27 \pm 29,62	216
	F 2	119,11 \pm 25,75	220	124,72 \pm 24,99	218
Vitamin E [mg/l]	K	5,69 \pm 2,20	235	6,32 \pm 2,41	235
	F 1	4,88 \pm 2,03	225	5,39 \pm 2,03	225
	F 2	5,34 \pm 2,28	235	5,62 \pm 2,00	234
Vitamin A [mg/l]	K	0,34 \pm 0,10	235	0,42 \pm 0,10	234
	F 1	0,32 \pm 0,10	225	0,41 \pm 0,11	225
	F 2	0,33 \pm 0,11	235	0,40 \pm 0,11	234

Tab. 29: Arithmetischen Mittelwerte [MW] mit Standardabweichung [STD] von den aus venösem EDTA-Blut bestimmten Parametern der Verdachts- und Kontrolltiere, unterteilt in die drei Betriebsgruppen.

Parameter/Einheit	Betriebs- gruppe	Verdachtstiere		Kontrolltiere	
		MW \pm STD	N	MW \pm STD	N
Erythrozyten [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	K	5,52 \pm 0,64	221	6,23 \pm 0,66	222
	F 1	5,59 \pm 0,78	215	6,14 \pm 0,65	216
	F 2	5,86 \pm 0,67	219	6,13 \pm 0,72	218
Hämatokrit [%]	K	29,64 \pm 3,83	221	33,28 \pm 3,42	222
	F 1	29,80 \pm 4,08	215	33,28 \pm 3,60	216
	F 2	31,05 \pm 3,57	219	33,30 \pm 3,74	218
Hämoglobin [g/dl]	K	8,68 \pm 0,96	221	9,82 \pm 0,95	222
	F 1	8,69 \pm 1,08	215	9,64 \pm 1,08	216
	F 2	8,97 \pm 0,98	219	9,61 \pm 0,98	218
Leukozyten [$/\mu\text{l}$]	K	7568,10 \pm 10429,13	221	7845,95 \pm 6667,21	222
	F 1	7251,63 \pm 5547,93	215	8887,04 \pm 10418,07	216
	F 2	7021,28 \pm 1972,31	219	7263,76 \pm 1797,67	218
MCH [pg] Mittleres korpuskulares Hämoglobin	K	15,78 \pm 1,31	220	15,84 \pm 1,36	222
	F 1	15,70 \pm 1,30	215	15,92 \pm 1,33	216
	F 2	15,40 \pm 1,31	219	15,80 \pm 1,64	218
MCHC [g/dl] Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration	K	29,43 \pm 1,90	221	29,54 \pm 1,88	222
	F 1	29,27 \pm 1,85	215	29,33 \pm 1,78	216
	F 2	28,96 \pm 2,00	219	29,06 \pm 1,95	218
MCV [μm^3] mittleres Erythrozytenvolumen	K	53,70 \pm 6,19	221	53,84 \pm 5,83	222
	F 1	53,44 \pm 6,18	215	54,49 \pm 5,77	216
	F 2	53,30 \pm 6,01	219	54,62 \pm 7,22	218
Thrombozyten [$/\mu\text{l}$]	K	397134,33 \pm 131433,20	201	345489,80 \pm 111331,50	196
	F 1	389979,80 \pm 122883,13	198	367613,40 \pm 123585,55	194
	F 2	390021,28 \pm 138689,51	188	359559,57 \pm 118767,35	188

Tab. 30: Fütterungsparameter der Grobfuttermitteln in Kontrollbetrieben (K) im Vergleich zu Fallbetrieben (F; Fall-1 und Fall-2 Betriebe zusammengefasst). Die Daten werden angegeben für folgende Laktationsgruppen: Frühlaktierende (LF; Laktationstag 0-100), Mittellaktierende (LM; Laktationstag 101-200), Spätlaktierende (LS; Laktationstag > 200).

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p- Wert	Signifikanz
TS Vorlage kg	LF	nein	F	13,31	13,22	2,30	9,20	16,67	0,0158	*
			K	14,29	14,20	1,84	11,61	17,80		
	LM	nein	F	13,38	13,32	2,27	9,30	16,67	0,0047	**
			K	14,46	14,60	1,91	11,30	17,80		
	LS	nein	F	13,34	13,32	2,29	9,00	16,67	0,0044	**
			K	14,51	14,23	1,96	11,84	18,10		
Rohasche- gehalt g/kg TS	LF	nein	F	75,73	71,00	22,71	53,00	110,00	0,0164	*
			K	67,15	66,00	10,96	53,00	86,00		
	LM	nein	F	75,84	70,50	22,75	54,00	110,00	0,0337	*
			K	67,53	67,00	11,37	50,00	86,00		
	LS	nein	F	76,10	70,50	22,66	54,00	110,00	0,1333	n.s.
			K	69,51	68,00	12,66	50,00	92,00		
Energiegehalt NEL/kg TS	LF	nein	F	6,28	6,27	0,27	5,90	6,71	0,0037	**
			K	6,41	6,43	0,23	5,96	6,74		
	LM	nein	F	6,27	6,25	0,25	5,90	6,68	0,0010	***
			K	6,42	6,43	0,22	5,96	6,78		
	LS	ja	F	6,27	6,25	0,25	5,90	6,68	0,0025	**
			K	6,41	6,43	0,23	5,96	6,78		
Rohfasergehalt g/kg TS	LF	nein	F	229,00	226,00	18,74	203,00	266,00	0,0020	**
			K	217,40	220,00	19,84	189,00	248,00		
	LM	nein	F	229,90	226,90	17,05	208,00	266,00	0,0008	***
			K	218,13	219,00	17,03	191,00	244,00		
	LS	nein	F	230,34	226,00	17,42	208,00	266,00	0,0004	***
			K	217,85	219,00	16,89	191,00	243,00		

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p- Wert	Signifikanz	
Strukturierte Rohfaser %	LF	nein	F	83,63	84,00	4,40	78,00	88,00	0,1807	n.s.	
			K	83,91	85,00	4,51	76,00	88,00			
	LM	nein	F	83,73	84,00	3,71	78,00	87,00	0,4492	n.s.	
			K	83,68	85,00	4,39	76,00	88,00			
LS	nein		F	83,71	84,00	3,73	78,00	87,00	0,5984	n.s.	
			K	83,62	85,00	4,37	76,00	88,00			
Stärke- und Zuckergehalt g/kg TS	LF	nein	F	165,32	167,50	55,47	48,00	252,00	0,0015	**	
			K	196,23	203,00	52,95	110,00	279,00			
	LM	ja	F	164,78	165,00	55,00	54,00	248,00	0,0050	**	
			K	193,53	199,00	54,81	107,00	279,00			
LS	ja		F	162,59	165,00	56,02	48,00	248,00	0,0156	*	
			K	187,55	198,00	59,05	76,00	279,00			
Rohprotein g/kg TS	LF	nein	F	121,74	119,50	18,67	97,00	158,00	0,0245	*	
			K	115,30	112,00	18,44	95,00	156,00			
	LM	nein	F	122,37	120,00	19,11	97,00	158,00	0,0738	n.s.	
			K	117,77	113,00	21,19	93,00	163,00			
LS	nein		F	122,57	121,00	19,00	97,00	158,00	0,1541	n.s.	
			K	118,77	117,00	20,80	94,00	156,00			
nutzbares Rohprotein g/kg TS	LF	nein	F	133,10	134,00	5,49	124,00	140,00	1.0000	n.s.	
			K	131,98	133,00	9,17	124,00	140,00			
	LM	nein	F	132,39	133,50	6,62	124,00	139,00	0,2429	n.s.	
			K	134,36	134,00	4,95	128,00	144,00			
LS	nein		F	131,97	134,00	8,03	124,00	139,00	0,2238	n.s.	
			K	134,06	134,00	4,30	128,00	140,00			
RNB g	LF	nein	F	-23,32	-26,00	36,90	-74,00	54,00	0,0069	**	
			K	-38,70	-48,00	38,43	-81,00	44,00			
	LM	nein	F	-23,35	-26,00	36,52	-74,00	54,00	0,0183	*	
			K	-35,60	-43,00	44,74	-85,00	45,00			
	LS	nein		F	-21,06	-25,00	37,46	-73,00	54,00	0,0274	*
				K	-32,98	-36,00	46,09	-85,00	56,00		

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p- Wert	Signifikanz	
Milchbildung kg aus NEL	LF	nein	F	13,68	13,75	4,69	5,10	20,80	0,0047	**	
			K	15,95	16,00	3,65	10,40	21,30			
	LM	nein	F	13,79	13,90	4,56	5,10	20,60	0,0011	**	
			K	16,30	17,00	3,82	8,90	21,60			
LS	nein		F	13,70	13,95	4,59	4,90	20,60	0,0008	**	
			K	16,48	16,50	3,97	10,30	22,60			
Milchbildung kg aus nXP	LF	nein	F	15,48	15,50	3,86	8,80	21,00	0,0322	*	
			K	17,11	16,60	3,33	12,50	22,60			
	LM	nein		F	15,59	15,60	3,76	9,20	21,00	0,0082	**
				K	17,51	17,60	3,60	11,20	24,40		
LS	nein		F	15,52	15,60	3,82	9,20	21,00	0,0112	*	
			K	17,54	16,90	3,70	12,60	24,40			

* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$

n.s.= nicht signifikant

Tab. 31: Fütterungsparameter der Grundration plus individueller Kraftfuttergabe in Kontrollbetrieben (K) im Vergleich zu Fallbetrieben (F; Fall-1 und Fall-2 Betriebe zusammengefasst). Die Daten werden angegeben für folgende Laktationsgruppen: Frühlaktierende (LF; Laktationstag 0-100), Mittellaktierende (LM; Laktationstag 101-200), Spätlaktierende (LS; Laktationstag > 200).

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p-Wert	Signifikanz	
TS Vorlage kg	LF	nein	F	20,35	20,67	2,06	16,00	23,25	< 0,0001	***	
			K	21,87	21,80	1,20	20,20	24,00			
	LM	nein	F	19,18	19,40	2,20	15,00	22,27	< 0,0001	***	
			K	20,66	20,50	1,43	18,80	23,00			
LS	nein		F	17,15	17,10	2,12	13,37	20,99	0,0020	**	
			K	18,14	17,99	1,97	15,60	21,29			
Energiegehalt NEL/kg TS	LF	ja	F	6,85	6,86	0,23	6,41	7,21	0,0035	**	
			K	6,98	6,97	0,19	6,71	7,29			
	LM	ja		F	6,74	6,77	0,20	6,39	7,06	0,0011	**
				K	6,86	6,87	0,19	6,61	7,24		
LS	nein		F	6,55	6,54	0,23	6,19	6,90	0,0251	*	
			K	6,63	6,63	0,22	9,17	7,00			
Rohfaser- gehalt g/kg TS	LF	ja	F	174,90	174,50	14,31	152,00	198,00	0,0076	**	
			K	168,53	166,00	14,74	149,00	200,00			
	LM	nein		F	181,66	181,00	17,20	156,00	210,00	0,0541	n.s.
				K	176,55	177,00	15,58	153,00	204,00		
LS	ja		F	197,83	196,50	16,79	171,00	230,00	0,1744	n.s.	
			K	193,02	194,00	18,35	165,00	245,00			
Strukturierte Rohfaser %	LF	nein	F	64,38	65,00	7,31	50,00	74,00	0,0392	*	
			K	62,30	63,00	5,98	50,00	69,00			
	LM	nein		F	67,87	68,00	6,69	55,00	78,00	0,4155	n.s.
				K	66,96	69,00	5,79	54,00	74,00		
LS	nein		F	74,28	75,00	5,82	64,00	83,00	0,8584	n.s.	
			K	74,19	75,00	5,35	63,00	82,00			

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p-Wert	Signifikanz
Stärke- und Zuckergehalt g/kg TS	LF	ja	F	199,71	196,50	33,52	145,00	256,00	0,0098	**
			K	212,13	213,00	37,31	142,00	271,00		
	LM	ja	F	192,57	188,00	34,77	142,00	255,00	0,0449	*
			K	205,34	202,00	41,61	139,00	271,00		
LS	ja	F	180,72	183,50	40,49	118,00	245,00	0,1246	n.s.	
		K	191,36	192,00	46,36	101,00	271,00			
Rohprotein g/kg TS	LF	nein	F	172,62	172,00	13,29	147,00	192,00	0,5791	n.s.
			K	173,74	174,00	12,18	156,00	196,00		
	LM	nein	F	166,98	167,00	12,60	149,00	186,00	0,3314	n.s.
			K	169,68	169,00	14,47	149,00	199,00		
LS	nein	F	156,74	158,00	15,24	132,00	181,00	0,7033	n.s.	
		K	155,98	157,00	17,37	123,00	187,00			
nutzbares Rohprotein g/kg TS	LF	nein	F	159,47	161,00	10,42	147,00	172,00	0,0732	n.s.
			K	162,15	163,00	8,14	150,00	173,00		
	LM	nein	F	154,95	156,00	10,49	143,00	170,00	0,0541	n.s.
			K	158,94	157,00	7,99	148,00	175,00		
LS	nein	F	148,91	149,50	8,75	135,00	159,00	0,3001	n.s.	
		K	150,19	151,00	7,72	135,00	162,00			
RNB g	LF	ja	F	43,24	39,50	33,34	-14,00	102,00	0,9894	n.s.
			K	42,77	45,00	31,02	-7,00	86,00		
	LM	nein	F	35,98	29,50	33,58	-12,00	82,00	0,8499	n.s.
			K	35,47	33,00	35,22	-22,00	95,00		
LS	nein	F	21,90	21,50	30,27	-37,00	75,00	0,4451	n.s.	
		K	18,96	19,00	38,36	-36,00	76,00			
Milchbildung kg aus NEL	LF	nein	F	30,43	30,90	4,90	20,50	37,60	< 0,0001	***
			K	34,36	34,60	3,01	29,60	39,50		
	LM	nein	F	27,56	27,90	5,43	17,90	35,60	< 0,0001	***
			K	31,00	30,80	3,41	25,60	37,30		
	LS	nein	F	22,53	22,15	5,07	15,30	31,30	0,0033	**
			K	24,67	24,10	4,53	17,90	33,50		

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p-Wert	Signifikanz
Milchbildung kg aus nXP	LF	nein	F	32,97	33,60	5,45	22,40	39,90	< 0,0001	***
			K	36,66	36,50	3,28	31,10	43,50		
	LM	nein	F	29,94	30,30	5,47	20,70	38,40	0,0001	***
			K	33,32	32,80	3,71	27,80	39,40		
	LS	nein	F	25,44	25,00	5,96	17,80	33,90	0,0388	*
			K	26,83	26,10	4,58	20,80	34,90		
Individuelles KF	LF	nein	F	6,44	6,50	2,76	2,00	10,00	0,5391	n.s.
			K	6,87	7,00	2,38	3,00	10,50		
	LM	nein	F	4,49	4,00	2,89	0,00	9,00	0,8710	n.s.
			K	4,53	4,25	2,63	0,50	10,00		
	LS	nein	F	1,11	0,00	1,61	0,00	4,5	0,6476	n.s.
			K	0,96	0,00	1,71	0,00	5,00		

* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$ n.s = nicht signifikant

Tab. 32: Fütterungsparameter der Grundration plus maximaler Kraftfuttermenge in Kontrollbetrieben (K) im Vergleich zu Fallbetrieben (F; Fall-1 und Fall-2 Betriebe zusammengefasst). Die Daten werden angegeben für folgende Laktationsgruppen: Frühlaktierende (LF; Laktationstag 0-100), Mittellaktierende (LM; Laktationstag 101-200), Spätlaktierende (LS; Laktationstag > 200).

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p-Wert	Signifikanz
TS Vorlage kg	LF	nein	F	21,24	21,51	1,83	17,00	23,55	0,0040	**
			K	22,15	22,20	1,16	20,80	24,14		
	LM	nein	F	21,11	21,50	1,93	17,33	23,51	0,0649	n.s.
			K	21,76	21,74	1,53	19,00	24,11		
LS	nein		F	20,80	21,41	2,36	15,00	23,51	0,7519	n.s.
			K	20,83	21,60	2,53	17,00	24,11		
Energiegehalt NEL/kg TS	LF	nein	F	6,91	6,92	0,24	6,41	7,27	0,0485	*
			K	7,00	7,02	0,21	6,71	7,42		
	LM	ja	F	6,90	6,90	0,21	6,46	7,23	0,1357	n.s.
			K	6,96	6,97	0,21	6,69	7,29		
LS	nein		F	6,87	6,90	0,24	6,38	7,23	1,0000	n.s.
			K	6,86	6,89	0,26	6,36	7,22		
Rohfaser- gehalt g/kg TS	LF	nein	F	169,22	169,00	13,54	148,00	190,00	0,2164	n.s.
			K	166,66	164,00	14,70	143,00	196,00		
	LM	ja	F	170,59	170,50	14,13	147,00	190,00	0,3902	n.s.
			K	168,53	166,00	15,66	140,00	198,00		
LS	nein		F	172,97	172,50	16,05	148,00	206,00	0,9149	n.s.
			K	174,98	172,00	19,56	152,00	213,00		
Strukturierte Rohfaser %	LF	nein	F	61,42	62,00	6,60	50,00	72,00	0,9289	n.s.
			K	61,26	62,00	6,52	47,00	69,00		
	LM	nein	F	61,63	61,00	6,44	51,00	72,00	0,3618	n.s.
			K	62,60	63,00	7,39	50,00	74,00		
LS	nein		F	62,43	62,00	7,45	51,00	74,00	0,1230	n.s.
			K	64,85	64,00	9,11	50,00	82,00		

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p-Wert	Signifikanz
Stärke- und Zuckergehalt g/kg TS	LF	nein	F	203,78	201,50	33,44	142,00	256,00	0,0270	*
			K	213,57	214,00	35,91	142,00	271,00		
	LM	ja	F	202,29	203,00	33,94	142,00	256,00	0,1097	n.s.
			K	211,91	213,00	37,88	142,00	271,00		
LS	nein	F	200,58	201,50	34,80	136,00	256,00	0,2562	n.s.	
		K	205,30	210,00	42,16	124,00	271,00			
Rohprotein g/kg TS	LF	nein	F	176,76	177,00	11,90	156,00	196,00	0,6383	n.s.
			K	175,55	175,00	12,71	156,00	196,00		
	LM	nein	F	176,43	176,50	11,86	157,00	196,00	0,7501	n.s.
			K	175,64	176,00	16,29	151,00	203,00		
LS	nein	F	174,29	176,00	15,14	149,00	196,00	0,4719	n.s.	
		K	170,72	175,00	21,04	123,00	198,00			
nutzbares Rohprotein g/kg TS	LF	nein	F	162,40	162,50	10,81	148,00	175,00	0,6834	n.s.
			K	163,30	164,00	8,42	150,00	177,00		
	LM	nein	F	161,92	162,00	10,79	148,00	175,00	0,9166	n.s.
			K	162,66	162,00	8,94	149,00	179,00		
LS	nein	F	160,17	162,00	15,46	141,00	178,00	0,4869	n.s.	
		K	159,68	160,00	10,63	135,00	175,00			
RNB g	LF	nein	F	49,74	47,00	35,50	-7,00	102,00	0,5869	n.s.
			K	45,19	45,00	31,58	-3,00	88,00		
	LM	nein	F	48,84	47,00	34,68	-6,00	102,00	0,8082	n.s.
			K	46,04	45,00	39,08	-22,00	108,00		
LS	nein	F	46,49	47,00	37,34	-14,00	102,00	0,4424	n.s.	
		K	39,47	40,00	42,68	-29,00	105,00			
Milchbildung kg aus NEL	LF	nein	F	32,50	33,30	4,66	23,40	38,80	0,0011	**
			K	35,01	35,30	3,13	29,90	40,10		
	LM	nein	F	32,41	33,30	4,93	23,80	39,10	0,0848	n.s.
			K	34,02	34,10	3,94	28,90	40,60		
LS	nein	F	31,34	32,95	5,83	18,00	38,70	0,8100	n.s.	
		K	31,59	32,70	6,23	19,20	40,10			

Parameter	Laktations- gruppe	normal- verteilt	Betrieb	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	5 % Quantil	95 % Quantil	p-Wert	Signifikanz
Milchbildung kg aus nXP	LF	nein	F	35,29	36,30	5,08	24,00	41,50	0,0298	*
			K	37,39	36,90	3,48	31,30	43,90		
	LM	nein	F	35,06	35,75	5,31	24,00	42,00	0,3406	n.s.
			K	36,31	36,20	4,19	29,30	42,60		
	LS	nein	F	34,16	35,20	6,10	20,20	41,00	0,8204	n.s.
			K	33,93	35,70	6,33	20,80	42,60		
maximales KF (kg)	LF	nein	F	8,07	8,00	2,07	4,00	11,00	0,2444	n.s.
			K	7,71	7,75	2,23	3,50	12,00		
	LM	nein	F	7,99	8,00	2,11	4,00	11,00	0,1548	n.s.
			K	7,39	7,75	2,39	3,00	10,00		
	LS	nein	F	8,00	8,00	2,06	4,00	11,00	0,1413	n.s.
			K	7,37	7,75	2,38	3,00	10,00		

* = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$

Tab. 33: Variablen, die bei der Untersuchung auf Clostridien-Risikofaktoren keine Variabilität (> 90 % einheitliche Antworten) der Ausprägung zwischen den Betriebskategorien (K, F1, F2) zeigten (n =23).

Variable	Richtung der Ausprägung
Schafe/Ziegen auf dem Betrieb	nein
Gatterwild auf dem Betrieb	nein
Bienen auf dem Betrieb	nein
Wassergeflügel auf dem Betrieb	nein
Temperaturprofil Biogasanlage	mesophil (30-37 °C)
Düngung Grünland (organisch-mineralisch)	ja
Biokompost auf Grünland	nein
Düngung Acker (organisch-mineralisch)	ja
Abschleppen des Grünlands	ja
Biokompost auf Acker	nein
Klärschlamm auf Acker	nein
Klärschlamm auf Grünland	nein
Biogas-Input Gülle/Kot	ja
Biogas-Input Gülle/Kot vom Rind	ja
Biogas-Input Mais	ja
Biogas-Input Schlachtabfälle	nein
Behandlung von Gärrest vor dem Ausbringen	nein
Feststoffseparierte Gülle als Einstreu	nein
Kompost als Einstreu	nein
Pferdemist als Einstreu	nein
Silagevorschub < 1 m pro Woche	nein
Nachgeburts-Entsorgung in spez. Behältnis	nein
Mind. 1 Grassilage Silierdauer < 4 Wochen	nein

Tab. 34: Variablen, die bei der Untersuchung auf Clostridien-Risikofaktoren nicht statistisch signifikant unterschiedlich zwischen den Betriebskategorien (K, F1, F2) waren (=26; P>0,05). Variablen mit zwei Ausprägungen (nur eine wird angezeigt) bzw. stetige Variablen. Die Angabe n steht, wenn nicht anders vermerkt, für die Anzahl der Betriebe.

Variable	Betriebskategorie		
	Kontrolle	Fall-1	Fall-2
Anzahl ha für Schnitte (MW \pm SD)	33,0 \pm 31,1	25,0 \pm 24,7	38,0 \pm 25,9
n	46	45	47
Anzahl ha für Schnitte + Weide (MW \pm SD)	15,9 \pm 19,8	22,32 \pm 24,6	13,7 \pm 21,6
n	47	44	47
Anzahl Schnitte pro Jahr	3,9 \pm 0,7	3,7 \pm 0,5	3,8 \pm 0,5
n	46	44	47
Geflügelhaltung (%)	17,0	17,8	27,7
n	8	8	13
Biogasanlage vorhanden (%)	17,0	13,3	14,9
n	8	6	7
Beweidung von Futterflächen mit Schafen (%)	25,5	24,4	34,0
n	12	11	16
Silage aus Ackergras (%)	57,4	48,8	42,6
n	27	21	20
Biogas-Input Geflügelkot (%)	0,0	22,2	20,0
n	0	2	3
Biogas-Input Grassilage (%)	70,6	70,0	46,7
n	12	7	7
Lagerung Gärsubstrat Wochen (MW \pm SD)	2,7 \pm 3,4	1,5 \pm 1,8	2,3 \pm 2,4
n	12	6	11
Lagerung Gärrest in Wochen (MW \pm SD)	1,6 \pm 0,7	1,5 \pm 0,7	1,7 \pm 0,8
n	14	10	13
Auslauf Trockensteher früh (%)	23,4	15,9	14,9
n	11	7	7
Auslauf Trockensteher spät (%)	10,9	15,9	6,7
n	5	7	3
Auslauf Laktierende \leq 100 d in Milch (%)	25,5	31,1	21,7
n	12	14	10
Auslauf Laktierende 101 – 200 d in Milch (%)	23,4	33,3	21,7
n	11	15	10
Auslauf Laktierende > 200 d in Milch	21,3	33,3	21,7
n	10	15	10
Mind. 1 Silo ohne Bodenplatte (%)	19,1	26,7	26,1
n	9	12	12
Mind. 1 Silo ohne Bodenplatte oder ohne Wände mit Bodenplatte (%) n	76,6	80,0	76,1
	36	36	35
Schnitthöhe Mais (cm) (MW \pm SD)	29,1 \pm 8,3	28,1 \pm 7,4	26,4 \pm 7,3
n Maissilagen	44	40	48
Schnitthöhe Gras (cm) (MW \pm SD)	6,4 \pm 1,2	6,1 \pm 1,1	6,1 \pm 1,5
n Grassilagen	72	70	81
Mind. 1 Silage auffällig beim Öffnen (%)	40,4	42,2	48,9
n	19	19	23
Mind. 1 Silage mit hochgr. sensorischer Abweichung (%)	40,4	60,0	59,6
n	19	27	28

Anschnittsfläche mind. 1 Silage unregelmäßig (%)	68,1	71,1	70,2
n	32	32	33
Mind. 1 Silo deutl. verschmutzt (%)	8,5	17,8	14,9
n	4	8	7
Mind. 1 Silo Hinweis auf Schadnager (%)	2,1	11,1	8,5
n	1	5	4
Mind. 1 Silo Hinweis auf Tierkadaver (%)	4,3	2,2	10,9
n	2	1	5

Tab. 35: Variablen, die bei der Untersuchung auf Clostridien-Risikofaktoren nicht statistisch signifikant unterschiedlich zwischen den Betriebskategorien (K, F1, F2) waren (=15) ($P > 0,05$). Variablen mit mehr als zwei Ausprägungen.

Variable	Betrieb	Ausprägung			
		< 11 ha	11-20 ha	> 20 ha	
Anzahl ha für Ackergras: n (%)	K	33 (70,2)	8 (17,0)	6 (12,8)	
	F1	39 (86,7)	4 (8,9)	2 (4,4)	
	F2	42 (89,4)	4 (8,5)	1 (2,1)	
Behandlung gegen Fliegen: n (%)		nein	alle 3 Mo.	alle 6 Mo.	bei Bedarf
	K	11 (23,4)	1 (2,1)	4 (8,5)	31 (66,0)
	F1	15 (33,3)	1 (2,2)	4 (8,9)	25 (55,6)
	F2	17 (36,2)	1 (2,1)	2 (4,3)	27 (57,4)
Überschwemmung Grünland: n (%)		nein	regelmäßig	unregelmäßig	
	K	35 (74,5)	3 (6,4)	9 (19,1)	
	F1	33 (73,3)	5 (11,1)	7 (15,6)	
Vorkommen von Maulwürfen: n (%)		wenig	mäßig	viel	
	K	3 (6,4)	25 (53,2)	19 (40,4)	
	F1	6 (13,6)	18 (40,9)	20 (45,5)	
Wild auf Grünland: n (%)					
	K	8 (17,0)	25 (53,2)	14 (29,8)	
	F1	6 (13,3)	25 (55,6)	14 (31,1)	
Wild auf Acker: n (%)					
	K	16 (34,0)	22 (46,8)	9 (19,1)	
	F1	11 (25,6)	21 (48,8)	11 (25,6)	
Fremdgülle oder –kot auf Grünland: n (%)		nein	immer	gelegentlich	
	K	43 (93,5)	2 (4,3)	1 (2,2)	
	F1	38 (84,4)	3 (6,7)	4 (8,9)	
Fremdgülle oder –kot auf Acker : n (%)					
	K	39 (83,0)	7 (14,9)	1 (2,1)	
	F1	31 (72,1)	7 (16,3)	5 (11,6)	
Biogas-Output als Dünger: n (%)		nein	Grünland	Acker	beides
	K	30 (63,8)	0 (0,0)	6 (12,8)	11 (23,4)
	F1	34 (75,6)	1 (2,2)	3 (6,7)	7 (15,6)
Herkunft von Gülle/Kot als Biogas-Input: n (%)		eigen	fremd	beides	
	K	3 (20,0)	2 (13,3)	10 (66,7)	
	F1	4 (44,4)	2 (22,2)	3 (33,3)	
Herkunft von Biogas- Output als Dünger: n (%)					
	K	4 (23,5)	10 (58,8)	3 (17,6)	
	F1	3 (27,3)	7 (63,6)	1 (9,1)	
Vorkommen von Fliegen und Larven: n (%)		keine	ggr.	mittelgr.	hochggr.
	K	0 (0,0)	18 (38,3)	20 (42,6)	9 (19,1)
	F1	1 (2,2)	11 (24,4)	23 (51,1)	10 (22,2)
Vorkommen von Ratten und Mäusen: n (%)					
	K	0 (0,0)	34 (72,3)	11 (23,4)	2 (4,3)
	F1	0 (0,0)	27 (60,0)	16 (35,6)	2 (4,4)

Variable	Betrieb	Ausprägung			
	F2	1 (2,1)	28 (59,6)	13 (27,7)	5 (10,6)
		nie	immer	regelmäßig	saisonal/selten
Wasserversorgung aus	K	28 (59,6)	13 (27,7)	1 (2,1)	5 (10,6)
Brunnen: n (%)	F1	18 (40,0)	18 (40,0)	1 (2,2)	8 (17,8)
	F2	34 (72,3)	7 (14,9)	2 (4,3)	4 (8,5)
		nein	mittel	stark	
Mind. 1 Siliergut bei	K	33 (70,2)	13 (27,7)	1 (2,1)	
Ernte verschmutzt: n (%)	F1	35 (77,8)	8 (17,8)	2 (4,4)	
	F2	32 (68,1)	9 (19,1)	6 (12,8)	

Tab. 36: Zusammenhang von verschiedenen quantitativen Einflussgrößen und dem Fall-/Kontrollstatus des Betriebes (Ergebnisse des hypothesenprüfenden Ansatzes)

Faktor	Variable	Gruppe	fehlend	Mittelwert	Median	CV	OR	LCL	UCL	p-Wert																																																																																																																																																																																										
Lahmheit	% der Herde mit Lahmheitsscore > 1	Fälle	0	66,88	66,52	15,72	1,0786	1,0382	1,1205	0,0001																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	58,64	60,25	17,87					Lahmheit	% der Herde mit Lahmheitsscore > 3	Fälle	0	10,92	9,55	75,79	1,1077	1,0409	1,1789	0,0013	Kontr	0	6,26	4,95	91,60	Lahmheit	% der Abgänge wegen Lahmheit im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	5,59	3,62	101,66	1,0814	0,9920	1,1788	0,0755	Kontr	2	3,94	3,48	89,18	Körperkondition	% der Herde mit BCS < 2,5	Fälle	0	18,39	17,24	51,81	1,0549	1,0096	1,1022	0,0171	Kontr	0	14,45	13,39	51,29	Körperkondition	% der Herde mit BCS < unterer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	46,01	45,67	29,96	1,0449	1,0154	1,0752	0,0026	Kontr	0	38,35	37,82	31,95	Körperkondition	% der Herde mit BCS > oberer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	7,05	6,09	71,53	0,9071	0,8504	0,9677	0,0031	Kontr	0	10,73	9,80	74,27	Eutergesundheit	geometr. Mittel der Zellzahlen berechnet über die letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	104,67	97,17	34,56	1,0061	0,9953	1,0170	0,2699	Kontr	0	97,77	92,28	32,31	Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539	Kontr	0	23,85	22,62	8,72	Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639
Lahmheit	% der Herde mit Lahmheitsscore > 3	Fälle	0	10,92	9,55	75,79	1,1077	1,0409	1,1789	0,0013																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	6,26	4,95	91,60					Lahmheit	% der Abgänge wegen Lahmheit im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	5,59	3,62	101,66	1,0814	0,9920	1,1788	0,0755	Kontr	2	3,94	3,48	89,18	Körperkondition	% der Herde mit BCS < 2,5	Fälle	0	18,39	17,24	51,81	1,0549	1,0096	1,1022	0,0171	Kontr	0	14,45	13,39	51,29	Körperkondition	% der Herde mit BCS < unterer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	46,01	45,67	29,96	1,0449	1,0154	1,0752	0,0026	Kontr	0	38,35	37,82	31,95	Körperkondition	% der Herde mit BCS > oberer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	7,05	6,09	71,53	0,9071	0,8504	0,9677	0,0031	Kontr	0	10,73	9,80	74,27	Eutergesundheit	geometr. Mittel der Zellzahlen berechnet über die letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	104,67	97,17	34,56	1,0061	0,9953	1,0170	0,2699	Kontr	0	97,77	92,28	32,31	Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539	Kontr	0	23,85	22,62	8,72	Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79										
Lahmheit	% der Abgänge wegen Lahmheit im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	5,59	3,62	101,66	1,0814	0,9920	1,1788	0,0755																																																																																																																																																																																										
		Kontr	2	3,94	3,48	89,18					Körperkondition	% der Herde mit BCS < 2,5	Fälle	0	18,39	17,24	51,81	1,0549	1,0096	1,1022	0,0171	Kontr	0	14,45	13,39	51,29	Körperkondition	% der Herde mit BCS < unterer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	46,01	45,67	29,96	1,0449	1,0154	1,0752	0,0026	Kontr	0	38,35	37,82	31,95	Körperkondition	% der Herde mit BCS > oberer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	7,05	6,09	71,53	0,9071	0,8504	0,9677	0,0031	Kontr	0	10,73	9,80	74,27	Eutergesundheit	geometr. Mittel der Zellzahlen berechnet über die letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	104,67	97,17	34,56	1,0061	0,9953	1,0170	0,2699	Kontr	0	97,77	92,28	32,31	Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539	Kontr	0	23,85	22,62	8,72	Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																										
Körperkondition	% der Herde mit BCS < 2,5	Fälle	0	18,39	17,24	51,81	1,0549	1,0096	1,1022	0,0171																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	14,45	13,39	51,29					Körperkondition	% der Herde mit BCS < unterer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	46,01	45,67	29,96	1,0449	1,0154	1,0752	0,0026	Kontr	0	38,35	37,82	31,95	Körperkondition	% der Herde mit BCS > oberer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	7,05	6,09	71,53	0,9071	0,8504	0,9677	0,0031	Kontr	0	10,73	9,80	74,27	Eutergesundheit	geometr. Mittel der Zellzahlen berechnet über die letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	104,67	97,17	34,56	1,0061	0,9953	1,0170	0,2699	Kontr	0	97,77	92,28	32,31	Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539	Kontr	0	23,85	22,62	8,72	Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																										
Körperkondition	% der Herde mit BCS < unterer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	46,01	45,67	29,96	1,0449	1,0154	1,0752	0,0026																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	38,35	37,82	31,95					Körperkondition	% der Herde mit BCS > oberer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	7,05	6,09	71,53	0,9071	0,8504	0,9677	0,0031	Kontr	0	10,73	9,80	74,27	Eutergesundheit	geometr. Mittel der Zellzahlen berechnet über die letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	104,67	97,17	34,56	1,0061	0,9953	1,0170	0,2699	Kontr	0	97,77	92,28	32,31	Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539	Kontr	0	23,85	22,62	8,72	Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																										
Körperkondition	% der Herde mit BCS > oberer Referenz des jeweiligen Laktationsstadiums	Fälle	0	7,05	6,09	71,53	0,9071	0,8504	0,9677	0,0031																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	10,73	9,80	74,27					Eutergesundheit	geometr. Mittel der Zellzahlen berechnet über die letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	104,67	97,17	34,56	1,0061	0,9953	1,0170	0,2699	Kontr	0	97,77	92,28	32,31	Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539	Kontr	0	23,85	22,62	8,72	Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																										
Eutergesundheit	geometr. Mittel der Zellzahlen berechnet über die letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	104,67	97,17	34,56	1,0061	0,9953	1,0170	0,2699																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	97,77	92,28	32,31					Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539	Kontr	0	23,85	22,62	8,72	Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																																										
Eutergesundheit	% der Tiere einer Herde mit > 200.000 Zeller pro ml Milch, Durchschnittswert der letzten drei Milchleistungsprüfungen	Fälle	0	25,67	24,64	8,89	1,0248	0,9826	1,0688	0,2539																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	23,85	22,62	8,72					Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048	Kontr	0	405,51	404,00	4,54	Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																																																										
Fruchtbarkeit	Zwischenkalbezeit	Fälle	2	417,49	412,50	5,72	1,0286	1,0086	1,0489	0,0048																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	405,51	404,00	4,54					Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057	Kontr	2	8,93	8,27	64,09	Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																																																																										
Fruchtbarkeit	% der Abgänge wegen Fruchtbarkeitsproblemen im letzten Jahr bezogen auf Herdengröße	Fälle	0	8,47	6,99	86,16	0,9901	0,9404	1,0425	0,7057																																																																																																																																																																																										
		Kontr	2	8,93	8,27	64,09					Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031	Kontr	1	78,95	84,07	20,56	Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																																																																																										
Kuh-Komfort	mittlerer Kuh-Komfort-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	69,50	71,62	24,62	0,9589	0,9326	0,9860	0,0031																																																																																																																																																																																										
		Kontr	1	78,95	84,07	20,56					Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020	Kontr	1	53,36	54,38	29,39	Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																																																																																																										
Kuh-Komfort	mittlerer Wiederkau-Index in allen untersuchten Boxenlaufstall-Abteilen	Fälle	3	44,64	44,64	32,46	0,9597	0,9351	0,9850	0,0020																																																																																																																																																																																										
		Kontr	1	53,36	54,38	29,39					Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029	Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																																																																																																																										
Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Liegeflächen > 2	Fälle	0	31,30	29,76	56,01	1,0381	1,0128	1,0639	0,0029																																																																																																																																																																																										
		Kontr	0	21,77	18,00	69,79																																																																																																																																																																																														

Faktor	Variable	Gruppe	fehlend	Mittelwert	Median	CV	OR	LCL	UCL	p-Wert																																																																																																																																																																																					
Dekubitalstellen	% der untersuchten Tiere mit Bonitur der Steuerelemente > 2	Fälle	0	12,50	8,83	88,74	1,0317	0,9906	1,0745	0,1321																																																																																																																																																																																					
		Kontr	0	9,52	6,12	104,15					Laufflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Beine > 2	Fälle	0	69,82	73,90	29,92	1,0292	1,0117	1,0471	0,0010	Kontr	0	56,29	57,41	38,88	Liegeflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Euter > 2	Fälle	0	38,68	36,02	21,28	1,0318	1,0113	1,0527	0,0022	Kontr	0	26,79	20,37	18,11	Liegeflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Flanke > 2	Fälle	0	66,97	68,18	33,41	1,0214	1,0051	1,0379	0,0098	Kontr	0	56,13	52,78	40,43	Rohfasermangel	% der Tiere einer Herde mit Fett-Eiweiß-Quotient <= 1 bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	7,11	5,18	92,00	0,9640	0,9134	1,0174	0,1825	Kontr	0	8,65	7,34	70,19	Rohfasermangel	% der Tiere mit Fettgehalt <= 3% bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	2,44	1,24	137,54	0,9498	0,8498	1,0616	0,3641	Kontr	0	2,95	2,08	84,35	Energiedichte	Energiegehalt aus Grobfutter in NEL/ kg TS bei Frischlaktierenden	Fälle	0	6,28	6,27	4,23	0,1069	0,0223	0,5115	0,0051	Kontr	0	6,41	6,43	3,54	Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe	Fälle	0	6,85	6,86	2,72	0,0566	0,0088	0,3627	0,0024	Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03
Laufflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Beine > 2	Fälle	0	69,82	73,90	29,92	1,0292	1,0117	1,0471	0,0010																																																																																																																																																																																					
		Kontr	0	56,29	57,41	38,88					Liegeflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Euter > 2	Fälle	0	38,68	36,02	21,28	1,0318	1,0113	1,0527	0,0022	Kontr	0	26,79	20,37	18,11	Liegeflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Flanke > 2	Fälle	0	66,97	68,18	33,41	1,0214	1,0051	1,0379	0,0098	Kontr	0	56,13	52,78	40,43	Rohfasermangel	% der Tiere einer Herde mit Fett-Eiweiß-Quotient <= 1 bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	7,11	5,18	92,00	0,9640	0,9134	1,0174	0,1825	Kontr	0	8,65	7,34	70,19	Rohfasermangel	% der Tiere mit Fettgehalt <= 3% bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	2,44	1,24	137,54	0,9498	0,8498	1,0616	0,3641	Kontr	0	2,95	2,08	84,35	Energiedichte	Energiegehalt aus Grobfutter in NEL/ kg TS bei Frischlaktierenden	Fälle	0	6,28	6,27	4,23	0,1069	0,0223	0,5115	0,0051	Kontr	0	6,41	6,43	3,54	Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe	Fälle	0	6,85	6,86	2,72	0,0566	0,0088	0,3627	0,0024	Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132										
Liegeflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Euter > 2	Fälle	0	38,68	36,02	21,28	1,0318	1,0113	1,0527	0,0022																																																																																																																																																																																					
		Kontr	0	26,79	20,37	18,11					Liegeflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Flanke > 2	Fälle	0	66,97	68,18	33,41	1,0214	1,0051	1,0379	0,0098	Kontr	0	56,13	52,78	40,43	Rohfasermangel	% der Tiere einer Herde mit Fett-Eiweiß-Quotient <= 1 bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	7,11	5,18	92,00	0,9640	0,9134	1,0174	0,1825	Kontr	0	8,65	7,34	70,19	Rohfasermangel	% der Tiere mit Fettgehalt <= 3% bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	2,44	1,24	137,54	0,9498	0,8498	1,0616	0,3641	Kontr	0	2,95	2,08	84,35	Energiedichte	Energiegehalt aus Grobfutter in NEL/ kg TS bei Frischlaktierenden	Fälle	0	6,28	6,27	4,23	0,1069	0,0223	0,5115	0,0051	Kontr	0	6,41	6,43	3,54	Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe	Fälle	0	6,85	6,86	2,72	0,0566	0,0088	0,3627	0,0024	Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																										
Liegeflächenhygiene	% der untersuchten Tiere mit Verschmutzung der Flanke > 2	Fälle	0	66,97	68,18	33,41	1,0214	1,0051	1,0379	0,0098																																																																																																																																																																																					
		Kontr	0	56,13	52,78	40,43					Rohfasermangel	% der Tiere einer Herde mit Fett-Eiweiß-Quotient <= 1 bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	7,11	5,18	92,00	0,9640	0,9134	1,0174	0,1825	Kontr	0	8,65	7,34	70,19	Rohfasermangel	% der Tiere mit Fettgehalt <= 3% bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	2,44	1,24	137,54	0,9498	0,8498	1,0616	0,3641	Kontr	0	2,95	2,08	84,35	Energiedichte	Energiegehalt aus Grobfutter in NEL/ kg TS bei Frischlaktierenden	Fälle	0	6,28	6,27	4,23	0,1069	0,0223	0,5115	0,0051	Kontr	0	6,41	6,43	3,54	Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe	Fälle	0	6,85	6,86	2,72	0,0566	0,0088	0,3627	0,0024	Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																										
Rohfasermangel	% der Tiere einer Herde mit Fett-Eiweiß-Quotient <= 1 bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	7,11	5,18	92,00	0,9640	0,9134	1,0174	0,1825																																																																																																																																																																																					
Kontr	0	8,65	7,34	70,19	Rohfasermangel	% der Tiere mit Fettgehalt <= 3% bei der letzten Milchleistungsprüfung					Fälle	0	2,44	1,24	137,54	0,9498	0,8498	1,0616	0,3641	Kontr	0	2,95	2,08	84,35	Energiedichte	Energiegehalt aus Grobfutter in NEL/ kg TS bei Frischlaktierenden	Fälle	0	6,28	6,27	4,23	0,1069	0,0223	0,5115	0,0051	Kontr	0	6,41	6,43	3,54	Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe	Fälle	0	6,85	6,86	2,72	0,0566	0,0088	0,3627	0,0024	Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																												
Rohfasermangel	% der Tiere mit Fettgehalt <= 3% bei der letzten Milchleistungsprüfung	Fälle	0	2,44	1,24	137,54	0,9498	0,8498	1,0616	0,3641																																																																																																																																																																																					
Kontr	0	2,95	2,08	84,35	Energiedichte	Energiegehalt aus Grobfutter in NEL/ kg TS bei Frischlaktierenden					Fälle	0	6,28	6,27	4,23	0,1069	0,0223	0,5115	0,0051	Kontr	0	6,41	6,43	3,54	Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe	Fälle	0	6,85	6,86	2,72	0,0566	0,0088	0,3627	0,0024	Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																												
Energiedichte	Energiegehalt aus Grobfutter in NEL/ kg TS bei Frischlaktierenden	Fälle	0	6,28			6,27	4,23	0,1069	0,0223	0,5115	0,0051																																																																																																																																																																																			
		Kontr	0	6,41	6,43	3,54	Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe					Fälle	0	6,85	6,86	2,72	0,0566	0,0088	0,3627	0,0024	Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																																										
Energiedichte	Energie der Ration in NEL/kg TS bei Frischlaktierenden bei individueller Kraftfuttergabe	Fälle	0	6,85	6,86	2,72			0,0566	0,0088	0,3627	0,0024																																																																																																																																																																																			
		Kontr	0	6,97	6,97	3,28	Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen					Fälle	0	1,24	1,23	26,26	1,142	0,371	3,516	0,8167	Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																																																										
Tier-Fressplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Fressplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,24	1,23	26,26			1,142	0,371	3,516	0,8167																																																																																																																																																																																			
		Kontr	0	1,23	1,15	25,24	Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen					Fälle	0	1,40	1,32	37,21	1,647	0,757	3,581	0,2084	Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																																																																										
Tier-Tränkeplatz-Verhältnis	mittleres Tier-Tränkeplatz-Verhältnis der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Laktierende standen	Fälle	0	1,40	1,32	37,21			1,647	0,757	3,581	0,2084																																																																																																																																																																																			
		Kontr	0	1,28	1,16	33,60	Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden					Fälle	0	13,31	13,22	17,30	0,8011	0,6700	0,9578	0,0150	Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																																																																																										
Futtermenge	kg Grobfutter (TS) pro Tier bei Frischlaktierenden	Fälle	0	13,31	13,22	17,30			0,8011	0,6700	0,9578	0,0150																																																																																																																																																																																			
		Kontr	0	14,31	14,20	12,73	Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung					Fälle	0	59,27	59,35	16,61	1,0136	0,9743	1,0544	0,5035	Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																																																																																																										
Rohfasermangel	Verhältnis Grobfutter zur Gesamtration bei Frischlaktierenden (in %); bei aMR: bei Durchschnittsleistung	Fälle	0	59,27	59,35	16,61			1,0136	0,9743	1,0544	0,5035																																																																																																																																																																																			
		Kontr	0	58,19	58,00	12,44	Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten					Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																																																																																																																										
Tier-Liegebox-Verhältnis	mittleres Tier-Liegebox-Verhältnis in untersuchten	Fälle	0	1,03	1,03	19,48	1,4306	0,2119	9,6575	0,7132																																																																																																																																																																																					

Faktor	Variable	Gruppe	fehlend	Mittelwert	Median	CV	OR	LCL	UCL	p-Wert
	Boxenlaufstall-Abteilen, in denen Laktierende standen	Kontr	0	1,01	1,02	16,05				

Variablen mit einem p-Wert < 0,2 sind hellgrau, mit einem p-Wert < 0,05 dunkelgrau markiert. Wenn sich der Zusammenhang in anderer Richtung als vermutet herausgestellt hat, ist die Schrift der Variablen fett und kursiv. Die deskriptive Auswertung erfolgte mittels Originaldaten, während für die einfaktorielle Analyse der Datensatz mit imputierten Werten verwendet wurde. CV=Variationskoeffizient, OR= Odds Ratio, LCL= unteres Konfidenzintervall des Odds Ratio, UCL= oberes Konfidenzintervall des Odds Ratio, p-Wert= P-Wert der logistischen Regression

Tab. 37: Zusammenhang von verschiedenen qualitativen Einflussgrößen und dem Fall-/Kontrollstatus des Betriebes (Ergebnisse des hypothesenprüfenden Ansatzes)

Faktor	Variable-Bezeichnung	Kategorien-Bezeichnung	Fälle		Kontrollen		OR	LCL	UCL	p-Wert	
			N	%	N	%					
Fruchtbarkeit	% der Einzeltiere mit Zysten	kein Tier (Ref.)	70	76,09	37	78,72	1,1629	0,4985	2,7126	0,7270	
		mind. 1 Tier	22	23,91	10	21,28					
Fruchtbarkeit	% der Einzeltiere mit Ovarien ohne Funktion	kein Tier (0%; Ref.)	24	26,09	12	25,53	global	0,9545	0,3490	2,6106	0,9278
		1 Tier (>0%, < 20%)	21	22,83	11	23,40					
		> 1 Tier (>= 20%)	47	51,09	24	51,06					
Eutergesundh.	% Einzeltiere mit verändertem Eutersekret	kein Tier (0%; Ref.)	54	58,70	28	59,57	global	1,4977	0,6182	3,6281	0,3709
		1 Tier (>0% und <20%)	26	28,26	9	19,15					
		mehr als 1 Tier (> 20%)	12	13,04	10	21,28					
Klauenpflege	% der Einzeltiere mit schlechtem Klauenpflegezustand	kein Tier (0%; Ref.)	61	66,30	29	61,70	global	0,5120	0,2135	1,2280	0,1336
		1 Tier (>0% und <20%)	14	15,22	13	27,66					
		mehr als 1 Tier (> 20%)	17	18,48	5	10,64					
Mortellaro	An mindestens einem der untersuchten Beine hochgradiger Mortellaro-Befund	Nein (Ref.)	39	42,39	26	55,32	1,6825	0,8286	3,4163	0,1499	
		ja	53	57,61	21	44,68					
Laufflächen	% aller untersuchten Abteile mit rutschiger oder eher rutschiger Laufflächen, in denen Tiere standen	kein Abteil (0%, Ref.)	42	45,65	20	42,55	global	0,5238	0,1911	1,4359	0,2088
		>0% und < 50%	11	11,96	10	21,28					
		>= 50%	39	42,39	17	36,17					
Laufflächen	Defekte an Spalten bei mind. einem der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile, in denen Tiere standen	Nein (Ref.)	75	81,52	42	89,36	1,9040	0,6555	5,5302	0,2365	
		Ja	17	18,48	5	10,64					
Differentiald.	mind. ein positiver Leberegel-Befund	Keine Probe positiv (Ref.)	70	76,09	38	80,85	1,3270	0,5558	3,1683	0,5241	
		mind. eine Probe positiv	22	23,91	9	19,15					
Differentiald.	mind. eine Kot-Poolprobe kulturell Paratuberkulose positiv	Nein (Ref.)	74	80,43	38	80,85	Aufgrund noch ausstehender Laboruntersuchungen wurde bislang keine logistische Regression berechnet	0,7703	0,2901	2,0449	0,6003
		Ja	6	6,52	1	2,13					
		keine Angabe	12	13,04	8	17,02					

Faktor	Variable-Bezeichnung	Kategorien-Bezeichnung	Fälle		Kontrollen		OR	LCL	UCL	p-Wert
			N	%	N	%				
Differentiald.	mind. ein positiver Lungenwurm-Befund	Nein (Ref.)	65	70,65	37	78,72	1,537	0,670	3,525	0,3104
		Ja	27	29,35	10	21,28				
Differentiald.	mind. ein positiver Magen-Darm-Wurm-Befund	Nein (Ref.)	52	56,52	32	68,09	1,6409	0,7837	3,4357	0,1890
		Ja	40	43,48	15	31,91				
Rohfasermangel	Gab es unter den untersuchten Abteilen eines mit einer durchschnittlichen Wiederkau-intensität unter 60/min?	Nein (Ref.)	71	77,17	34	72,34	0,6807	0,3015	1,5370	0,3546
		Ja	19	20,65	13	27,66				
		Keine Angabe	2	2,17	0	0				
Rohfasermangel	% der Einzeltiere mit schlecht zerkleinertem Kot oder Durchfall	0% bis <= 30% (Ref.)	26	28,26	15	31,91	global			0,5468
		>30% bis <= 60%	45	48,91	25	53,19	1,0385	0,4658	2,3153	0,9265
		>60%	21	22,83	7	14,88	1,7303	0,5961	5,0222	0,3132
Grundfutterqualität	Sensorik: mind. 1 Silage mit hgr Schimmel oder ggr./ hgr. Fäulnis oder ggr./ hgr. Strukturverlust	Nein (Ref.)	33	35,87	23	48,94	1,7134	0,8397	3,4960	0,1389
		Ja	59	64,13	24	51,06				
Grundfutterqualität	Rohasche: mind eine Grassilage mit >8% Rohaschegehalt	Nein (Ref.)	3	3,26	3	6,38	2,0227	0,3921	10,4331	0,4000
		Ja	86	93,48	44	93,62				
		Keine Angabe	3	3,26	0	0				
Grundfutterqualität	Reineiweiß: mind. eine Grassilage mit Reineiweißgehalt < 50%	Nein (Ref.)	21	22,83	5	10,64	0,4025	0,1412	1,1471	0,0885
		Ja	70	76,09	41	87,23				
		Keine Angabe	1	1,09	1	2,13				
Grundfutterqualität	Trockensubstanz: eine Grassilage < 30% oder > 40% oder eine Maissilage < 28% oder > 35%	Nein (Ref.)	64	69,57	33	70,21	1,0312	0,4790	2,2200	0,9374
		Ja	28	30,43	14	29,79				
Grundfutterqualität	pH: eine Grassilage > 4,7 oder eine Maissilage > 4,2	Nein (Ref.)	88	95,65	45	95,74	1,0227	0,1804	5,7970	0,9798
		ja	4	4,35	2	4,26				
Grundfutterqualität	mikrobiologische Bewertung: mind. eine Silage abweichend? (Beurteilung basiert auf	keine abw. Silage (Ref.)	14	15,22	6	29,79	Aufgrund noch ausstehender Bewertungen wurde bislang keine logistische Regression berechnet			
		mind. eine abw. Silage	55	59,78	27	57,45				
		keine Angabe	23	25,00	6	12,77				

Faktor	Variable-Bezeichnung	Kategorien-Bezeichnung	Fälle		Kontrollen		OR	LCL	UCL	p-Wert
			N	%	N	%				
	Bewertungsschema der VDLUFA)									
Futtermenge	Häufigkeiten des Ranschieben des Futters an das Fressgitter bei Frischlaktierenden	>= 5x tägl. (Ref.)	11	11,96	9	19,15				
		4 und 4,5x tägl.	19	20,65	15	31,91	1,0364	0,3412	3,1479	0,9498
		3 und 3,5x tägl.	27	29,35	15	31,91	1,4727	0,4983	4,3528	0,4838
		<= 2,5x tägl.	35	38,04	8	17,02	3,5795	1,1123	11,5188	0,0325
Futtermenge	Häufigkeit des Futter-Vorlegens bei Frischlaktierenden	>=2x tägl. (Ref.)	30	32,61	20	42,55				
		<=1.5x tägl.	62	67,39	27	57,45	1,5309	0,7421	3,1581	0,2491
Kuh-Komfort	Mittlere Prävalenz der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile mit Hochboxen	kein Abteil (0%; Ref.)	14	15,22	15	31,91	global			0,0020
		> 0% und weniger als 100%	23	25,00	19	40,43	1,2970	0,5023	3,3487	0,5910
		alle Abteile (100%)	55	59,78	13	27,66	4,5329	1,7593	11,6797	0,0017
Kuh-Komfort	Mittlere Prävalenz der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile ohne Boxenbelag (Gummimatte oder Einstreu)	kein Abteil (0%; Ref.)	80	86,96	38	80,85				
Kuh-Komfort	Mittlere Prävalenz der untersuchten Boxenlaufstall-Abteile ohne Einstreu	mind 1 Abteil (> 0%)	12	13,04	9	19,15	0,6333	0,2458	1,6320	0,3443
		kein Abteil (0%; Ref.)	50	54,35	32	68,09				
Klauenpflege	Häufigkeit der Bestandsklauenpflege	mind 1 Abteil (> 0%)	42	45,65	15	31,91	1,7918	0,8567	3,7474	0,1213
		monatlich bis vierteljährlich (Ref.)	7	7,61	5	10,64	global			0,3474
		halbjährlich; >halbjährlich /jährlich	55	59,78	22	46,81	1,7857	0,5118	6,2303	0,3631
Boxenmaße	Durchschnittliche Breite der Liegeboxen größer oder gleich 120 cm?	/unregelm.	30	32,61	20	42,55	1,0714	0,2980	3,8518	0,9158
		Nein (Ref.)	91	98,91	47	100	Aufgrund zu gering besetzter Kategorie ausgeschlossen			
Boxenmaße	Durchschnittliche Höhe des Nackenriegels der Liegeboxen größer oder gleich 115 cm?	Ja	1	1,09	0	0				
		Nein (Ref.)	47	51,09	21	44,68				
Boxenmaße	Durchschnittliche schräge Länge vom Nackenriegel zum Bugbrett größer oder gleich 195 cm?	Ja	45	48,91	26	55,32	0,7733	0,3819	1,5659	0,4752
		Nein (Ref.)	19	20,65	11	23,40				
		Ja	73	79,35	36	76,60	1,1740	0,5053	2,7277	0,7092

Faktor	Variable-Bezeichnung	Kategorien-Bezeichnung	Fälle		Kontrollen		OR	LCL	UCL	p-Wert		
			N	%	N	%						
Laufflächen	Mittlere Prävalenz der untersuchten Abteile mit eher dreckigen oder dreckigen Laufflächen	0% bis < 50% (Ref.)	14	15,22	14	29,79	global	2,1764	0,8525	5,5567	0,1275	
		>= 50% bis < 100%	37	40,22	17	36,17						0,1039
		100% der Abteile	41	44,56	16	34,04						0,0496
Liegeflächen	Mittlere Prävalenz der untersuchten Abteile mit eher dreckigen oder dreckigen Liegeflächen	kein Abteil (0%; Ref.)	28	30,43	25	53,19	global	2,1916	0,9049	5,3075	0,0821	
		> 0% und weniger als 50%	27	29,35	11	23,40						0,0150
		50% und mehr	37	40,22	11	23,40						0,0150
Rohfasermangel	Anteil an Rohfaser < 16% bei aMR bzw < 18% bei TMR; bei Frischlaktierenden	Nein (Ref.)	40	43,48	16	34,04	0,6710	0,3231	1,3933	0,2845		
Rohfasermangel	Anteil strukt. Rohfaser an Gesamt-Rohfaser < 66%, bei Frischlaktierenden	Ja	52	56,62	31	65,96						
Rohfasermangel	Anteil strukt. Rohfaser an Gesamt-Rohfaser < 66%, bei Frischlaktierenden	Nein (Ref.)	45	48,91	16	34,04	0,5391	0,2601	1,1174	0,0966		
Rohfasermangel	Anteil strukt. Rohfaser an Gesamt-Rohfaser < 66%, bei Frischlaktierenden	Ja	47	51,09	31	65,96						

Es wurden alle Kategorien einzeln gegen die Referenz (Ref.) getestet, bei mehr als 2 Kategorien ist ein globaler p-Wert angegeben. Variablen mit einem p-Wert < 0,2 sind grau hinterlegt. Wenn sich der Zusammenhang in anderer Richtung als vermutet herausgestellt hat, ist die Schrift der Variablen fett und kursiv. Die deskriptive Auswertung erfolgte mittels Originaldaten, während für die einfaktorische Analyse der Datensatz mit imputierten Werten verwendet wurde. Bei mehr als 2 Kategorien wurde zusätzlich ein globaler P-Wert für die Variable angegeben. CV=Variationskoeffizient, OR= Odds Ratio, LCL= unteres Konfidenzintervall des Odds Ratio, UCL= oberes Konfidenzintervall des Odds Ratio, p-Wert= P-Wert der logistischen Regression

Teil 2: Mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärsubstrat

1. Einleitung

Biogasanlagen sind in den vergangenen Jahren zunehmend Gegenstand des seuchenhygienischen Interesses geworden. Ursache hierfür ist die mögliche Anreicherung pathogener Clostridien und insbesondere von Neurotoxin- bildenden *Clostridium botulinum*-Stämmen, die über die Gärreste der Biogasanlagen in die Umwelt ausgebracht werden können.

In Anlehnung an die bereits im Jahr 2011 durchgeführte Studie zur Untersuchung der mikrobiologischen Zusammensetzung von Gärsubstraten und Gärresten aus Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung seuchenhygienisch relevanter Keime und anderer Infektionserreger wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut Gärsubstrate und Gärreste aus niedersächsischen Biogasanlagen untersucht.

2. Zielstellung

Die Untersuchungen wurden wie in der ersten Studie in Zusammenarbeit mit dem RIPAC-LABOR Potsdam-Golm durchgeführt. Ziel der Studie war die qualitative und quantitative bakteriologische und mykologische Untersuchung von Gärsubstraten und Gärrückständen hinsichtlich des aeroben und anaeroben Gesamtkeimgehaltes, des Auftretens hygienisch relevanter Keime sowie ausgewählter pathogener Erreger unter besonderer Berücksichtigung pathogener Clostridien insbesondere Neurotoxin-bildender *Clostridium botulinum*-Stämme. Dabei sollten in Erweiterung der ersten Studie insbesondere solche Biogasanlagen untersucht werden, in denen in substantziellen Mengen Hühnertrockenkot mit als Gärsubstrat eingesetzt wird.

3. Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial stammte aus insgesamt 10 niedersächsischen Biogasanlagen. In 5 dieser Anlagen wurde Hühnertrockenkot/Hühnermist neben Energiepflanzen sowie Gülle als Gärsubstrat eingesetzt (Anlagen C1 – C5). Zu den übrigen 5 als Kontrolle dienenden Anlagen zählten 3 Anlagen, in denen überwiegend Energiepflanzen eingesetzt wurden (Anlage A1 – A3) und 2 Anlagen, in denen ein hoher Anteil an Gülle verwendet wurde (Anlagen B1 – B2). Von jeder Anlage wurden an vier aufeinander folgenden Tagen jeweils 4 repräsentative Proben der Gärsubstrate und der Gärreste entnommen. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme auf 4°C gekühlt und über die TiHo Hannover an das RIPAC-LABOR weitergeleitet. Alle Proben sind innerhalb eines Monats nach der Entnahme bearbeitet worden. Die Lagerung der Proben erfolgte in der Zwischenzeit bei 4-8°C.

4. Untersuchungsmethodik

4.1 Anzüchtungsverfahren

In jeder Probe wurde eine Bestimmung der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahl vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde das Untersuchungsmaterial in 10er Potenzen bis 10^{-6} verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden vier Columbia-Agarplatten mit 7 % Schafblutzusatz mit je 0,1 ml beimpft und jeweils zwei Platten 48 Stunden bei 37 °C aerob bzw. anaerob bebrütet.

Zudem wurde von jeder Verdünnungsstufe zum direkten Nachweis von Enterobakterien eine Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agarplatte nach Gassner, eine Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)- sowie Brilliance *Salmonella*-Agarplatte und zum Nachweis von Hefen sowie Schimmelpilzen eine Sabouraud-Dextroseagarplatte mit Zusatz von Chloramphenicol beimpft, 48 h bei 37 °C bzw. 96 h bei 30 °C bebrütet.

Da *Clostridium (Cl.) perfringens*-Sporen nicht bzw. nur selten direkt auf Anaerobieragarplatten auskeimen, ist von jeder Verdünnungsstufe zusätzlich 1 ml in eine Leber-Bouillon (Oxoid) verimpft und anschließend bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrütet worden. Nach 24 h erfolgten Ausstriche auf zwei Columbia-Schafblutagarplatten, die mit Neomycin und Gentamycin supplementiert worden waren (48 h, 37 °C, anaerob). Zusätzlich wurde von jeder Verdünnungsstufe 1 ml Anreicherungsmedium in verflüssigten Hochschicht-Eisensulfitar nach Angelotti gegeben und 48 h bei 37 °C bebrütet, wobei sulfitreduzierende *Clostridium* spp. eine Schwarzfärbung verursachen. Zum Nachweis von Salmonellen wurden zusätzlich 1 g Untersuchungsmaterial im Verhältnis von 1:10 in eine Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Anreicherungsbouillon (Oxoid) gegeben, für die Dauer von 18-24 h bei 37 °C angereichert und danach auf XLD- und Brilliance *Salmonella*-Agar fraktioniert ausgestrichen. Außerdem wurde aus der Anreicherung 1 ml in eine zweite Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Anreicherungsbouillon im Verhältnis 1:10 gegeben, über Nacht angereichert und danach wie bei der ersten Anreicherung auf XLD- und Brilliance *Salmonella*-Agar fraktioniert angelegt. Diese sogenannte „fraktionierte Anreicherung“ wurde insgesamt 3x über 3 Tage fortgeführt.

4.2 Nachweis Neurotoxin-bildender *Clostridium-botulinum*-Stämme

Die Bearbeitung der Proben und die Durchführung der Toxinversuche erfolgte entsprechend der Empfehlung des Friedrich-Löffler-Instituts zum „Nachweis von *Clostridium botulinum*-Neurotoxin“ (siehe „Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle“, 2/2013). Von jeder Gärsubstrat- und Gärrestprobe wurden 2 g Untersuchungsmaterial in ein die Toxinbildung von *Clostridium botulinum* förderndes Spezialmedium (cooked meat-medium) verimpft und 7 Tage anaerob bei 30 °C bebrütet. Danach ist der Überstand bei 9.500 x g zentrifugiert, sterilfiltriert (0,22 µm) und im Mäuseletalitäts- und Neutralisationstest hinsichtlich des Vorkommens von spezifischen Neurotoxinen der *Clostridium botulinum*-Typen A-F geprüft worden.

4.3 Ablesen der Platten und Isolierung relevanter Keime

Entsprechend den bei Keimzahlbestimmungen üblichen Untersuchungsmethoden erfolgte die Auszählung der Kolonien nur von Platten, auf denen der Keimgehalt $\geq 10 \leq 200$ KBE/Platte betrug. Zum Zweck des Ablesens wurde die Mikroflora der Oberflächenkulturen mit dem Auflichtmikroskop bei 3-15facher Vergrößerung durchmustert und beurteilt. Die verschiedenen Kolonietypen wurden gezählt, so dass sie quantitativ bewertet werden konnten.

4.4 Differenzierung der isolierten Kulturen

Die Differenzierung der isolierten Bakterien erfolgte auf der Grundlage phänotypischer und morphologischer Eigenschaften sowie mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **T**ime **O**f **F**light **M**ass **S**pectrometry). Für die Durchführung der Differenzierung mittels MALDI-TOF-Verfahren stand ein SHIMADZU-AXIMA-Confidence-Gerät zur Verfügung. Von jeder Probe wurden 5-20 Stämme je nach Keimspektrum mittels MALDI-Verfahren differenziert bzw. bestätigt. Von *Clostridium perfringens*-Stämmen wurde wegen der spezifischen phänotypischen Wuchsform in der Regel keine Bestätigung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie vorgenommen. Die Feststellung der *Cl. perfringens* spezifischen Gene für α -, β 1-, ϵ - und j-Toxin und damit die Bestimmung der Toxintypen A-E erfolgte mittels PCR nach Meer und Songer (1997). Zusätzlich wurde eine Untersuchung auf β 2-Toxin (*cpb2*) und *netB*-Toxinen mittels PCR nach Gibert *et al.* (1997) und Keyburn *et al.* (2008) vorgenommen. Zur Prüfung des α -Toxinbildungsvermögens wurden die *Cl. perfringens*-Stämme unmittelbar nach Öffnung der Anaerobiertöpfe in Leber-Bouillon verimpft,

8 – 12h bei 37 °C bebrütet, anschließend im Verhältnis 1:1 in Maltose-Kalb-Fleischbouillon nach Nishida und Nakagawara verimpft und 18 h bei 37 °C bebrütet. Danach wurde der α -Toxintiter in einem Eigelbmedium mit Zusatz von 50 % CaCl_2 -Lösung (2 %) (Lezithovitellin-Test) im Verdünnungsverfahren bestimmt.

4.5 Quantitative Auswertungen

Alle quantitativen Auswertungen werden in koloniebildenden Einheiten pro g bzw. ml (KBE/ml) angegeben. Die Ergebnisse wurden hauptsächlich durch das Koloniezählverfahren von ausplattierten zuvor in Dezimalstufen verdünnten Proben gewonnen. Da sich Clostridiensporen in der Regel nicht durch direktes Kultivieren auf Festnährböden nachweisen lassen, wurden zusätzlich Dezimalstufen der Proben mittels Anreicherungsverfahren untersucht. Daraus ergeben sich Ergebnisse die nur in Dezimalstufen angegeben werden können (z.B. >100 <1000 KBE/ml). Daraus ergeben sich wiederum Ergebnisse, die als „zusätzliche maximale Keimzahl (KZ) nach Anreicherung“ im Ergebnisteil bezeichnet sind.

5. Untersuchungsergebnisse

5.1 Gesamtkeimzahlen in Rohstoff- und Gärrestproben

In Tabelle 1 sind die durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen (GKZ) aller Anlagen in Kolonie bildenden Einheiten pro g (KBE) angegeben. Die aerobe GKZ beinhaltet alle aerob und mikroaerophil kultivierbaren Keime, während die anaerobe GKZ ausschließlich aus Anaerobiern besteht. Pro Anlage wurden je vier Proben der Gärsubstrate und der Gärreste untersucht.

Tabelle 1: Gemittelte Gesamtkeimzahlen der 10 Biogasanlagen (KBE/g)

Mittelwert_GKZ	Gärrest			Gärsubstrat		
	aerob	anaerob	gesamt	aerob	anaerob	gesamt
Anlage 1	2,07E+07	1,54E+04	2,07E+07	6,68E+06	9,99E+06	1,67E+07
Anlage 2	2,86E+07	8,95E+05	2,95E+07	6,34E+07	3,70E+07	1,00E+08
Anlage 3	3,56E+07	1,86E+06	3,75E+07	1,47E+07	4,73E+04	1,48E+07
Anlage 4	6,89E+06	4,63E+05	7,35E+06	4,23E+07	1,34E+05	4,24E+07
Anlage 5	8,58E+06	6,24E+05	9,20E+06	1,24E+07	6,99E+03	1,24E+07
Anlage 6	1,43E+07	7,17E+06	2,15E+07	1,62E+07	2,20E+04	1,63E+07
Anlage 7	6,29E+06	1,02E+06	7,31E+06	4,87E+06	1,23E+06	6,10E+06
Anlage 8	4,43E+06	1,47E+05	4,57E+06	9,65E+06	8,49E+03	9,66E+06
Anlage 9	4,45E+06	1,36E+04	4,46E+06	2,93E+07	4,88E+07	7,82E+07
Anlage 10	3,00E+06	3,04E+04	3,03E+06	1,90E+06	7,55E+04	1,98E+06
Mittelwert aller Anlagen	1,33E+07	1,22E+06	1,45E+07	2,01E+07	9,73E+06	2,99E+07

In Tabelle 2 sind die Gesamtkeimzahlen der verschiedenen Anlagentypen A, B und C zusammengefasst (vergl. Tabelle 1).

Tabelle 2: Gemittelte Gesamtkeimzahlen bei den Anlagentypen A, B und C (KBE/g)

Mittelwert_GKZ	Gärrest			Gärsubstrat		
	aerob	anaerob	gesamt	aerob	anaerob	gesamt
Anlagentyp A	2,83E+07	9,22E+05	2,92E+07	2,83E+07	1,57E+07	4,40E+07
Anlagentyp B	7,73E+06	5,43E+05	8,28E+06	2,73E+07	7,03E+04	2,74E+07
Anlagentyp C	6,49E+06	1,68E+06	8,17E+06	1,24E+07	1,00E+07	7,13E+07
Mittelwert aller Anlagentypen	1,42E+07	1,05E+06	1,52E+07	2,27E+07	8,60E+06	4,76E+07

Während der Gesamtkeimgehalt an aeroben und anaeroben Keimen in den Gärsubstraten unabhängig vom Anlagentyp zwischen ca. 1 – 5E+07 KBE/g Inhalt lag, waren die mittleren Keimgehalte an anaeroben Keimen in den Gärresten bei ansonsten nicht verschiedenen Keimgehalten um etwa 1 Zehnerpotenz niedriger.

5.2 Keimspektrum und seine Nachweishäufigkeit

Aus den 80 Proben wurden insgesamt 857 Bakterien und Schimmelpilze identifiziert, wobei mehrere identische Spezies aus einer Probe stets einfach gezählt wurden. 682 Keime konnten bekannten Spezies oder zumindest Gattungen zugeordnet werden und 175 Keime wurden als unbekannt eingestuft. In den untersuchten Proben wurden 108 verschiedene Keime nachgewiesen (Tabelle 4). Tabelle 3 zeigt die 15 am häufigsten gefundenen Mikroorganismen.

Tab. 3: Die 15 am häufigsten nachgewiesenen Mikroorganismen

Genus Spezies	Gärsubstrate		Gärreste		Gesamt	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
<i>Clostridium perfringens</i>	32	9,17%	38	11,18%	70	10,16%
<i>Proteus mirabilis</i>	27	7,74%	20	5,88%	47	6,82%
<i>Streptococcus bovis/equinus</i>	26	7,45%	36	10,59%	62	9,00%
<i>Bacillus licheniformis</i>	26	7,45%	24	7,06%	50	7,26%
<i>Bacillus pumilus</i>	19	5,44%	18	5,29%	37	5,37%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19	5,44%	7	2,06%	26	3,77%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	17	4,87%	9	2,65%	26	3,77%
<i>Escherichia coli</i>	14	4,01%	7	2,06%	21	3,05%
<i>Bacillus spp.</i>	12	3,44%	14	4,12%	26	3,77%
<i>Clostridium bif fermentans</i>	9	2,58%	12	3,53%	21	3,05%
<i>Issatchenkia orientalis</i>	8	2,29%	3	0,88%	11	1,60%
<i>Clostridium butyricum</i>	6	1,72%	13	3,82%	19	2,76%
<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	6	1,72%	4	1,18%	10	1,45%
<i>Bacillus cereus</i>	5	1,43%	5	1,47%	10	1,45%
<i>Geotrichum candidum/klabahii</i>	5	1,43%	1	0,29%	6	0,87%
<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i>	5	1,43%	5	1,47%	10	1,45%

Tabelle 4: Alle in den 80 Proben nachgewiesenen Keime in abfallender Nachweisrate (Basis: 682 Differenzierungen)

Genus Spezies	Gärsubstrate		Gärreste		Gesamt	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
<i>Clostridium perfringens</i>	32	9,17%	38	11,18%	70	10,16%
<i>Proteus mirabilis</i>	27	7,74%	20	5,88%	47	6,82%
<i>Streptococcus bovis/equinus</i>	26	7,45%	36	10,59%	62	9,00%
<i>Bacillus licheniformis</i>	26	7,45%	24	7,06%	50	7,26%
<i>Bacillus pumilus</i>	19	5,44%	18	5,29%	37	5,37%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19	5,44%	7	2,06%	26	3,77%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	17	4,87%	9	2,65%	26	3,77%
<i>Escherichia coli</i>	14	4,01%	7	2,06%	21	3,05%
<i>Bacillus spp.</i>	12	3,44%	14	4,12%	26	3,77%
<i>Clostridium bifermentans</i>	9	2,58%	12	3,53%	21	3,05%
<i>Issatchenkia orientalis</i>	8	2,29%	3	0,88%	11	1,60%
<i>Clostridium butyricum</i>	6	1,72%	13	3,82%	19	2,76%
<i>Globicatella sulfidifaciens</i>	6	1,72%	4	1,18%	10	1,45%
<i>Bacillus cereus</i>	5	1,43%	5	1,47%	10	1,45%
<i>Geotrichum candidum/kelehnii</i>	5	1,43%	1	0,29%	6	0,87%
<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i>	5	1,43%	5	1,47%	10	1,45%
<i>Clostridium sporogenes</i>	5	1,43%	9	2,65%	14	2,03%
<i>Enterococcus faecium</i>	4	1,15%			4	0,58%
<i>Staphylococcus carnosus</i>	4	1,15%			4	0,58%
<i>Lactobacillus brevis</i>	4	1,15%			4	0,58%
<i>Lactobacillus pentosus/paraplantarum/plantarum</i>	4	1,15%			4	0,58%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	3	0,86%			3	0,44%
<i>Proteus penneri/vulgaris</i>	3	0,86%	4	1,18%	7	1,02%
<i>Proteus spp.</i>	3	0,86%	2	0,59%	5	0,73%
<i>Pichia fermentans</i>	3	0,86%			3	0,44%
<i>Streptococcus spp.</i>	3	0,86%	3	0,88%	6	0,87%
<i>Providencia rettgeri</i>	3	0,86%	1	0,29%	4	0,58%
<i>Citrobacter spp.</i>	3	0,86%	2	0,59%	5	0,73%
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	3	0,86%	3	0,88%	6	0,87%
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	0,57%	2	0,59%	4	0,58%
<i>Clostridium D13-0312-1-1-9</i>	2	0,57%			2	0,29%
<i>Clostridium sordellii</i>	2	0,57%	9	2,65%	11	1,60%
<i>Clostridium D11-0088-1-1-16</i>	2	0,57%	4	1,18%	6	0,87%
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	2	0,57%	1	0,29%	3	0,44%
<i>Pseudomonas D11-0773-54-1-1</i>	2	0,57%	7	2,06%	9	1,31%
<i>Myroides odoratimimus</i>	2	0,57%			2	0,29%
<i>Lactobacillus salivarius</i>	2	0,57%	1	0,29%	3	0,44%
<i>Streptomyces albus</i>	2	0,57%	1	0,29%	3	0,44%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0,57%	1	0,29%	3	0,44%
<i>Enterococcus cecorum</i>	2	0,57%	1	0,29%	3	0,44%
<i>Riemerella M2878</i>	2	0,57%	1	0,29%	3	0,44%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0,57%			2	0,29%
<i>Achromobacter spp.</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Aerosphaera spp.</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0,29%	5	1,47%	6	0,87%
<i>Bordetella petrii</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Candida tropicalis</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Citrobacter cloacae</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Clostridium D12-1413-1-1-3</i>	1	0,29%	5	1,47%	6	0,87%

Fortsetzung Tabelle 4: Alle in den 80 Proben nachgewiesenen Keime in abfallender Nachweisrate (Basis: 682 Differenzierungen)

Genus Spezies	Gärsubstrate		Gärreste		Gesamt	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
<i>Clostridium glycolicum</i>	1	0,29%	4	1,18%	5	0,73%
<i>Clostridium limosum</i>	1	0,29%	3	0,88%	4	0,58%
<i>Clostridium sartagoforme</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Clostridium tertium</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Enterobacter spp.</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Enterococcus hirae</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Fusobacterium varium</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Geotrichum capitatum</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Lactobacillus buchneri/parabuchneri</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Lactobacillus sakei</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Lactobacillus spp.</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Microbacterium lacticum</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Mucor circinelloides</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Nocardiosis alba</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Providencia rustigianii</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Pseudallescheria angusta/boydii Komplex</i>	1	0,29%	4	1,18%	5	0,73%
<i>Pseudomonas alcaligenes/pseudalcaligenes</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Pseudomonas citronellolis/delhiensis</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Pseudomonas monteilii/mosselii/plecoglossida</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Pseudomonas pseudalcaligenes</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Pseudomonas spp.</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Serratia rubidae</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,29%	1	0,29%	2	0,29%
<i>Vagococcus fluvialis</i>	1	0,29%			1	0,15%
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>			4	1,18%	4	0,58%
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>			3	0,88%	3	0,44%
<i>Clostridium D13-0312-1-1-9</i>			3	0,88%	3	0,44%
<i>Paenibacillus macerans</i>			3	0,88%	3	0,44%
<i>Paenibacillus spp.</i>			3	0,88%	3	0,44%
<i>Bacteroides coprosuis</i>			2	0,59%	2	0,29%
<i>Clostridium cochlearium</i>			2	0,59%	2	0,29%
<i>Clostridium tetani</i>			2	0,59%	2	0,29%
<i>Myroides odoratus</i>			2	0,59%	2	0,29%
<i>Pseudomonas D11-0706-13-1-1</i>			2	0,59%	2	0,29%
<i>Taylorella equigenitalis</i>			2	0,59%	2	0,29%
<i>Aneurinibacillus spp.</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Cellulomonas uda</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Citrobacter freundii</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Enterococcus durans</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Hafnia alvei</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Hydrogenophaga spp.</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Lactococcus raffinolactis</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Paenibacillus motobuensis</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Providencia alcalifaciens</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Solibacillus silvestris</i>			1	0,29%	1	0,15%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			1	0,29%	1	0,15%

5.3 *Clostridium spp.*

Insgesamt gelang in den Gärsubstraten und Gärresten der Biogasanlagen der Nachweis von 12 bekannten *Clostridium spp.* sowie zusätzlich der Nachweis von 3 nicht beschriebenen Arten (Tabelle 5). Hinsichtlich der prozentualen Verteilung der verschiedenen *Clostridium spp.* war auffällig, dass im Vergleich mit den Anlagen A1-A3 in den Anlagen B1 und B2 sowie C1-C5 ein deutlich höherer Anteil von *Clostridium perfringens* in den Gärsubstraten nachweisbar war. In diesen beiden Anlagentypen betrug der Anteil von *Clostridium perfringens* in den Gärsubstraten mehr als 50%. In den Anlagen A1-A3 war dieser Anteil mit unter 40% deutlich niedriger. In allen drei Anlagentypen war der Anteil von *Clostridium perfringens* in den Gärresten gegenüber den Gärsubstraten reduziert.

Tabelle 5: Vergleich des Spektrums und der Nachweisraten der *Clostridia spp.* in Rohstoff- und Gärückstandsproben in Prozent

Genus spezies	Gärsubstrate		Gärreste	
	Anzahl [n]	Häufigkeit	Anzahl [n]	Häufigkeit
<i>Clostridium bifermentans</i>	9	22,50%	12	30,00%
<i>Clostridium butyricum</i>	6	15,00%	13	32,50%
<i>Clostridium cochlearium</i>	0	0	2	5,00%
<i>Clostridium D11-0088-1-1-16</i>	2	5,00%	4	10,00%
<i>Clostridium D12-1413-1-1-3</i>	1	2,50%	5	12,50%
<i>Clostridium D13-0312-1-1-9</i>	2	5,00%	3	7,50%
<i>Clostridium glycolicum</i>	1	2,50%	4	10,00%
<i>Clostridium limosum</i>	1	2,50%	3	7,50%
<i>Clostridium perfringens</i>	32	80,00%	38	95,00%
<i>Clostridium sordellii</i>	2	5,00%	9	22,50%
<i>Clostridium sporogenes</i>	5	12,50%	9	22,50%
<i>Clostridium tertium</i>	0	0	1	2,50%
<i>Clostridium tetani</i>	1	2,50%	2	5,00%
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	0	0	4	10,00%
<i>Clostridium sartagoforme</i>	1	2,50%	0	0

5.4 Toxinprüfung von *Clostridium-perfringens*-Stämmen

Insgesamt wurden 66 *Clostridium perfringens*-Stämme hinsichtlich des Toxinbildungsvermögens untersucht, davon wurden 31 Isolate aus Gärsubstraten und 35 Isolate aus Gärresten angezüchtet (Tabelle 6). Alle 66 Stämme konnten mittels Multiplex-PCR dem Toxintypen A zugeordnet werden, was bedeutet, dass keine der Majortoxine Beta 1, Epsilon oder Iota nachgewiesen werden konnten. Die α -Toxinbildung wurde zudem quantitativ im Lezithovittelinase-Test (LV) geprüft. Dabei sind

Stämme mit hoher α -Toxinbildung von mindestens 32 Naglereinheiten (NE) pro ml als toxisch einzustufen und können an Enteritiden beteiligt sein und die Nekrotisierende Enteritis verursachen. Zusätzlich wurden ausgewählte Minortoxingene nachgewiesen. Das Beta2-Toxigen (*cpb2*) wird mit der Saugferkelenteritis in Verbindung gebracht, während das *netB*-Toxigen als Auslöser der Nekrotisierenden Enteritis des Geflügels diskutiert wird (Keyburn et al. 2008).

Tabelle 6: Vorkommen u. Toxizität von *Cl. perfringens* in Rohstoffen und in Gärresten der Biogasanlagentypen A, B und C.

Anlagen-Typ	Proben/Material	Positive Proben	Cl. perfr. positiv in %	Zahl der Isolate ¹⁾	Multiplex PCR Majorletale Toxine						α -Toxin Nagler-Einheiten (NE)		
					α -Toxin	β 1-Toxin	β 2-Toxin	NetB-Toxin	ϵ -Toxin	I-Toxin	≤ 4 NE	8-16 NE	≥ 32 NE
A ₁ -A ₃	Substrate	9	75	8	8	0	0	0	0	0	4	1	3
	Gärreste	10	83	8	8	0	1	1	0	0	3	3	2
B ₁ -B ₂	Substrate	8	100	8	8	0	0	0	0	0	4	2	2
	Gärreste	8	100	7	7	0	0	0	0	0	3	2	2
C ₁ -C ₅	Substrate	15	80	15	15	0	3	3	0	0	11	4	-
	Gärreste	20	100	20	20	0	4	1	0	0	11	8	1
Σ	Substrate	32	83	31	31	0	3	3	0	0	19	7	5
	Gärreste	38	88	35	35	0	5	2	0	0	17	13	5

1) Ergebnisse mittels PCR

5.5 Neurotoxin von *Clostridium botulinum*

Die kulturelle Untersuchung auf *Clostridium botulinum* ergab mit den oben beschriebenen Untersuchungsmethoden ausschließlich negative Befunde, das heißt, es konnten aus keiner der 80 Proben weder in der anaeroben Direktkultur noch im Anreicherungsverfahren *Clostridium botulinum*-Neurotoxinbildende Stämme angezüchtet werden.

Der direkte Toxinnachweis und die Anreicherung von Neurotoxin durch Verimpfung der Rohstoff- und Gärrückstandsproben in ein die Toxinbildung von *Clostridium botulinum* förderndes Spezialmedium (Cooked meat-Medium) ergab ebenfalls ausschließlich negative Befunde im Mäusebioassay, wobei unspezifische Toxinkonzentrationen von < 10 DIm (Dosis letalis minima für ca. 25g schwere Mäuse) als negativ bewertet wurden.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen keinen Hinweis auf das Vorhandensein oder die Anreicherung von *Clostridium botulinum* und/oder seinem Neurotoxin in den untersuchten 80 Proben.

5.6 Salmonellen

Bei der Untersuchung auf Salmonellen mittels dreifach fraktionierter Anreicherung wurde in der ersten Probe der Gärsubstrate *Salmonella enterica ssp. enterica* nachgewiesen. Die übrigen Gärsubstrate waren negativ.

5.7 Sonstige Erreger von Infektionskrankheiten

Neben der Analyse von pathogenen Clostridien wurde mit den Standardkultivierungsverfahren auch auf bekannte pathogene Erreger untersucht. Folgende Erreger wurden gefunden bzw. sind geprüft worden (Tabelle 7 und 4).

Tabelle 7: Übersicht des Vorkommens pathogener Keime in Gärresten ohne *Clostridium spp.*

Erreger	Häufigkeit	Ätiologische Bewertung
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7	S2 Erreger - klinisch relevant, spezifischer Erreger bei Tieren
<i>Enterococcus cecorum</i>	1	S2 Erreger – veterinär-pathogen, spezifischer Erreger bei Geflügel
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	S2 Erreger - klinisch relevant, hygienisch relevanter Indikatorkeim
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Kein Nachweis	S2 Erreger - klinisch relevant, Zoonoseerreger
<i>Escherichia coli</i>	7	S2 Erreger - klinisch relevant, Zoonoseerreger, hygienisch relevanter Indikatorkeim
EHEC	Kein Nachweis	S2 Erreger - klinisch relevant, Zoonoseerreger
<i>Listeria spp.</i>	Kein Nachweis	S2 Erreger - klinisch relevant, Zoonoseerreger
<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	Kein Nachweis	S2 Erreger – veterinär-pathogen, spezifischer Erreger bei Geflügel
<i>Riemerella anatipestifer</i>	Kein Nachweis	S2 Erreger – veterinär-pathogen, spezifischer Erreger bei Geflügel
<i>Salmonella enterica</i>	Kein Nachweis	S2 Erreger - klinisch relevant, Zoonoseerreger
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kein Nachweis	S2 Erreger - klinisch relevant, Zoonoseerreger
<i>Streptococcus bovis/equinus</i>	36	S2 Erreger – veterinär-pathogen, Erkrankungen bei Tieren
<i>Taylorella equigenitalis</i>	2	S2 Erreger – veterinär-pathogen, Erkrankungen bei Tieren
<i>Yersinia spp.</i> ¹⁾	Keine Nachweis	S2 Erreger - klinisch relevant, Zoonoseerreger

¹⁾ es erfolgte keine selektive Kultivierung

6. Zusammenfassung / Schlussfolgerungen

Die Daten der vorliegenden Studie bestätigen vom Grundsatz die Befunde der ersten Studie hinsichtlich der Keimdichte und des Keimspektrums in den Gärsubstraten und Gärresten. Auffällig war, dass sich in den Proben aus den Anlagen, in denen Ausscheidungen aus Geflügelbetrieben eingesetzt wurden, keine gerichteten Unterschiede in Keimdichte und -spektrum ergaben. Dabei war

ebenso in Übereinstimmung mit der vorangegangenen Studie die Keimdichte in den Gärresten niedriger, was vor allem durch einen geringeren Gehalt an anaeroben Keimen vermittelt wurde.

In der Gemeinschaft der *Clostridien* konnten 15 verschiedene identifizierte und 3 neue bisher nicht beschriebene Arten nachgewiesen werden. Unter den bekannten Arten waren mit dem positiven Nachweis von *Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, *Cl. sordellii* und *Cl. sporogenes* auch verschiedene Spezies, die als Ursache spezifischer Infektionen in Frage kommen.

Die Gärsubstrate wiesen in allen Anlagen höhere Clostridienkonzentrationen als in den Gärresten auf. Das spricht gegen eine Anreicherung von hygienisch relevanten bzw. pathogenen *Clostridium spp.* in den Gärresten. Dass ausschließlich in den Gärresten *Cl. tetani* (2mal) festgestellt werden konnte, könnte durch nachträgliche Kontamination der Gärreste in den Silos durch vorangegangene positive Produkte bedingt sein.

Insgesamt wurden 66 *Cl. perfringens* – Stämme (Tabelle 6) hinsichtlich ihres Toxinbildungsvermögens geprüft. Alle Stämme konnten dem Toxintyp A zugeordnet werden. Eine spezifisch veterinärhygienisch / ätiologisch relevante Rolle kommt dabei den 8 Kulturen mit β 2-Toxinbildungsvermögen (3x Gärsubstrate, 2 Gärreste), den 5 Isolaten mit NetB-Toxinbildungsvermögen (3x Gärsubstrate, 2x Gärreste), den 20 Isolaten mit mittelgradigem α -Toxinbildungsvermögen (7x Gärsubstrate, 13x Gärreste) sowie den 10 Isolaten mit hochgradigem α -Toxinbildungsvermögen (je 5x Gärsubstrate und Gärreste) zu.

Die Untersuchung auf Neurotoxin bildende *Clostridium spp.*-Stämme ergab sowohl bei den Gärsubstratproben als auch Gärrestproben im Mausbioassay ausschließlich negative Befunde. Das heisst, die getesteten Biogasanlagen waren erfreulicherweise frei von Neurotoxin bildenden *Cl. botulinum*- Stämmen, wobei das ausgewählte Untersuchungsverfahren ca. 4 Keime/g eines aktiven Neurotoxinbildners nachweisen kann.

Abschließend bleibt festzustellen, dass auch aus dieser Studie ein mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen nicht abzuleiten ist und dass sich auch keine Hinweise für die Anreicherung von potenziell pathogenen Keimen während des Fermentationsprozesses ergeben haben.



Prof. Dr. Gerhard Breves