

**Bedeutung von potentiell toxinogenen *Clostridium* spp. bei  
Faktorenerkrankungen in bayerischen Milchviehbeständen**

von *Johanna Franziska Dietsche*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Bedeutung von potentiell toxinogenen *Clostridium* spp. bei  
Faktorenerkrankungen in bayerischen Milchviehbeständen

von *Johanna Franziska Dietsche*

aus *Karlsruhe*

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
*Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer*

Mitbetreuung durch: *Dr. Moritz Metzner*

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld

Tag der Promotion: 31.01.2015

Meinen Eltern

Mit dem Wissen wächst der Zweifel.

Goethe

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Clostridien.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Botulismus.....	4
1.1.1.	BoNT produzierende Clostridien und ihre Einteilung anhand ihrer Eigenschaften .....	4
1.1.2.	<i>Clostridium botulinum</i> .....	5
1.1.3.	Klinik.....	9
1.1.3.1.	Intoxikation .....	9
1.1.3.2.	Toxininfektion .....	10
1.1.4.	Diagnostik .....	12
1.1.5.	Therapie.....	14
1.1.6.	Immunität und Impfung .....	14
1.1.6.1.	Botulismus.....	14
1.1.6.2.	„Chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus .....	15
1.1.7.	Rechtslage .....	15
1.1.7.1.	Botulismus.....	15
1.1.7.2.	„Chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus .....	16
1.2.	<i>Clostridium perfringens</i> .....	16
1.3.	<i>Clostridium novyi</i> .....	18
1.4.	<i>Clostridium haemolyticum</i> .....	19
1.5.	<i>Clostridium septicum</i> .....	19
1.6.	<i>Clostridium difficile</i> .....	20
<b>2.</b>	<b>Stallparameter und Herdenindices.....</b>	<b>21</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>1.</b>	<b>Studiendesign.....</b>	<b>24</b>
<b>2.</b>	<b>Studienbetriebe.....</b>	<b>25</b>
2.1.	Auswahl der Betriebe für die Studie .....	25
2.2.	Bewerbung der Projekte .....	25
2.3.	Inklusionskriterien für Fall- und Kontrollbetriebe sowie Fall- und Kontrolltiere auf den jeweiligen Betrieben .....	25

---

<b>3.</b>	<b>Fragebögen.....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>Ablauf der Bestandsbesuche und hierbei verwendete Herdenindices.</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>Probenentnahme.....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>Beurteilung der Silagen .....</b>	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>Clostridiendiagnostik .....</b>	<b>31</b>
7.1.	Anzüchtung .....	33
7.2.	Molekularbiologischer Nachweis mittels real-time PCR.....	34
<b>8.</b>	<b>Blutparameter.....</b>	<b>37</b>
<b>9.</b>	<b>Parasitologische Untersuchung.....</b>	<b>37</b>
<b>10.</b>	<b>Datenerfassung und statistische Auswertung .....</b>	<b>38</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>1.</b>	<b>Inklusionskriterien .....</b>	<b>40</b>
<b>2.</b>	<b>Betriebsstruktur und Kennzahlen .....</b>	<b>41</b>
2.1.	Haltung der Kühe und Bewirtschaftung landwirtschaftl. Nutzflächen .....	41
2.2.	Milch: Leistung und Inhaltsstoffe .....	51
2.3.	Fütterungsmanagement .....	55
<b>3.</b>	<b>Tiergesundheit .....</b>	<b>57</b>
3.1.	Herdenindices.....	57
3.2.	Bakteriologische Untersuchung .....	68
3.3.	Parasitologische Untersuchung .....	72
3.4.	Blut- Laborparameter .....	72
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>92</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>110</b>
<b>1.</b>	<b>Fragebögen und Beispielbericht .....</b>	<b>110</b>
<b>2.</b>	<b>Rezepturen zur Anzucht/ für verwendete Methoden .....</b>	<b>124</b>

---

<b>3.</b>	<b>Arbeitsmaterialien und Geräte .....</b>	<b>126</b>
<b>4.</b>	<b>Real- Time PCR.....</b>	<b>127</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>133</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AB	Antibiotikum	LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
BoNT	Botulinum-Neurotoxin	LS	Locomotion Score
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft	LKV	Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V.
BCS	Body condition score	LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
Bpt	Bundesverband praktizierender Tierärzte e.V.	ml	Milliliter
bzw.	beziehungsweise	mg	Milligramm
<i>C. ssp.</i>	<i>Clostridium subspecies</i>	max.	maximal
<i>C. spp.</i>	<i>Clostridium species</i>	min	Minute/n
° C	Grad Celsius	mind.	mindestens
DIN	Deutsches Institut für Normung	mm	Millimeter
DNA	Deoxyribonucleic acid	MLP	Milchleistungsprüfung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MD	Median
et al.	Et alii (dt: und andere)	MW	Mittelwert
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	modif.	modifiziert
EU	Europäische Union	MTD 50	Median toxic dose 50
fg	Femtogramm	NAP	Neurotoxin associated proteins
GE	Gesamteiweiß	ng	Nanogramm
ggf.	gegebenenfalls	Nr.	Nummer
Gr.	Gruppe	PCR	Polymerase Chain Reaction
inkl.	inklusive	pg	Pikogramm
IfSG	Infektionsschutzgesetz	Q 1	Quartil 1
IAC	Interne Amplifikationskontrolle	Q 3	Quartil 3
i.p.	intraperitoneal	RKI	Robert Koch Institut
i.v.	intravenös	rpm	revolutions per minute
KbE	Kolonie bildende Einheit	s. u.	siehe unten
kDa	Kilodalton	s. Tab.	siehe Tabelle
Kg	Kilogramm	SD	Standardabweichung
K-EDTA	Kalium-Ethylendiamintetraacetat	sec	Sekunde/n
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit	TPGY	Tryptose Pepton Glucose Hefe Bouillon
LD <sup>50</sup>	Letale Dosis <sup>50</sup>	Tab.	Tabelle
		TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover

v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
16 S rRNA	16 Svedberg ribosomal ribonucleic acid

## I. EINLEITUNG

Clostridien sind ubiquitär vorkommende Umweltkeime, von denen nur wenige Spezies für Mensch oder Tier pathogen sind. Ihre Bedeutung bei einigen Krankheitsbildern, wie z. B. bei Faktorenerkrankungen in Milchviehbetrieben, ist noch nicht ausreichend geklärt.

Es wird v. a. im Norden von Deutschland immer wieder von ungewöhnlichen Bestandsproblemen berichtet. Diese führen v. a. in Milchviehbetrieben nach chronischem Leiden der Tiere zu erheblichen Ausfällen bis hin zur kompletten Betriebsaufgabe. Im Rahmen von mikrobiologischen Untersuchungen wurden bei Einzeltieren aus betroffenen Herden *Clostridium botulinum* und / oder dessen Toxine nachgewiesen (KRÜGER et al., 2011; KRÜGER et al., 2012).

Auch bei eng mit den Tieren in Kontakt stehenden Personen wurde *C. botulinum* als Auslöser neurologischer Symptome in Betracht gezogen. Der Verdacht, dass *C. botulinum* an einem chronischen Krankheitsgeschehen bei Mensch und Tier beteiligt sein könnte, führte auch in Bayern zu kontroversen Diskussionen, weshalb sowohl Landwirte als auch Verbraucher zunehmend verunsichert waren und nach Aufklärung dieses Phänomens verlangten.

In den Medien gibt es teilweise reißerische Beiträge zu diesem Thema (ANONYMUS, 2010; ANTHES und PETER, 2010; APPUNN, 2011; BUSSE, 2011; HEIN, 2012; KRISTAN, 2012; RUMMEL, 2013; ZÜHLKE, 2013), in der Politik werden Anfragen von Abgeordneten an die Regierung gestellt (HOLZNAGEL, 2004; OSTENDORFF et al., 2011; SCHWEBS, 2011; MAY, 2012; MÜHLBAUER, 2013) und auch die Wissenschaft (BÖHNEL et al., 2001; SCHWAGERICK und BÖHNEL, 2001; BÖHNEL und GESSLER, 2010; KRÜGER et al., 2012; BÖHNEL und GESSLER, 2013) sowie die Landwirtschaft (ANONYMUS, 2011) beschäftigen sich mit diesem Krankheitsbild. Die einen sprechen von einer Tierseuche mit zoonotischem Potenzial und Verweigerung von Entschädigung vonseiten der Behörden, die anderen sprechen von einer Faktorenerkrankung in Problembetrieben. Eine klare Definition des Krankheitsbildes steht bis heute aus. Beschrieben wird bestandsweise gehäuft auftretendes Festliegen, Abmagerung und Leistungsabfall. Zudem wird von Koordinations- (Überkreuzsetzen der Vorderbeine) und Bewegungsstörungen

(ausbleibende Korrektur von unphysiologischen Gliedmaßenstellungen), Muskelatrophie, unsicherem Gang und Schwanken genauso wie Bewegungsunlust und Teilnahmslosigkeit berichtet. Weitere Symptome scheinen eine verzögerte Pupillenreaktion, Schlotterkiefer, visköser Speichel, Schwierigkeiten bei der Wasseraufnahme, verminderter Schwanztonus, Harnabsatzstörungen sowie Durchfall im Wechsel mit Obstipation zu sein (BÖHNEL et al., 2001; KRÜGER, 2010; SCHWAGERICK, 2011; KRÜGER et al., 2012).

Um der Aufforderung nach Aufklärung nachzukommen, wurde bis Mai 2014 im Norden von Deutschland ein Forschungsprojekt zum „chronischen“ Botulismus durchgeführt. Im Süden Deutschlands stehen weitere Nachforschungen zu diesem Themenkomplex noch aus, weshalb das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz vertreten durch das Bayrische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) dieses Forschungsprojekt initiiert hat. Das Ziel der vorliegenden Studie war die bayernweite Erhebung epidemiologischer Daten zum Vorkommen von toxinogenen Clostridien Spezies, insbesondere von *C. botulinum* und seiner möglichen klinischen Auswirkungen, in Milchviehbetrieben.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Clostridien

Die Familie der *Clostridiaceae* ist eine stark heterogene Bakteriengruppe, bei der in den letzten Jahren einige neue Einteilungen der Taxonomie und Nomenklatur vorgenommen wurden. Die Gattung *Clostridium* besteht aus einer Vielzahl obligat anaerober Sporenbildner, von welchen ca. 15 Spezies krankheitserregend sein können: *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. histolyticum*, *C. difficile*, *C. sordellii*, *C. bifermentans*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. spiroforme* und *C. argentinense* (POPOFF und BOUVET, 2013). Von besonderer veterinärmedizinischer Bedeutung sind *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. chauvoei*, *C. septicum* und *C. sordellii* (KAHN, 2010). Ihre Pathogenität entsteht durch die Produktion biologisch aktiver Proteine, auch Toxine genannt (HATHEWAY, 1990; POPOFF und BOUVET, 2013). Durch diese Toxine kommt es zur Entstehung unterschiedlicher Clostridiosen, wobei im Folgenden auf die relevantesten tierpathogenen Clostridien Spezies näher eingegangen wird (Tab. 1).

**Tabelle 1: Eine Übersicht verschiedener Clostridien Spezies mit ihren Haupttoxinen und den dazugehörigen Erkrankungen bei Tieren**

Clostridien Spezies	Haupttoxine	Wichtigste Erkrankungen und Tierarten
<i>C. botulinum</i>	Neurotoxin (Toxovar A-E)	Botulismus (Säugetier und Vogel)
<i>C. butyricum</i>	Neurotoxin (Toxovar E)	
<i>C. baratii</i>	Neurotoxin (Toxovar F)	
<i>C. argentinense</i>	Neurotoxin (Toxovar G)	
<i>C. perfringens</i>	alpha, beta, epsilon, iota	Enterotoxämie und Septikämie (Säugetier und Vogel); Breinierenkrankheit (Schaf), beteiligt an Gasödeminfektionen
<i>C. novyi</i>	alpha, beta, gamma, delta, epsilon	Malignes Ödem II (Säugetier und Vogel); nekrotisierende Hepatitis (Schaf), beteiligt an Gasödeminfektionen
<i>C. haemolyticum</i>		Bazilläre Hämoglobinurie (Wiederkäuer)
<i>C. septicum</i>	alpha, beta, gamma, delta	Pararanschbrand (Säugetier und Vogel); Labmagenpararanschbrand (Schaf)
<i>C. difficile</i>	Toxin A und B	Enteritis (Säugetier)

### 1.1. Botulismus

Das Erscheinungsbild des akuten Botulismus ist bereits seit Anfang des 19. Jahrhunderts bekannt. Der Arzt und Dichter Justinus Kerner beschrieb als erster exakt und vollständig die klinische Symptomatik des Nahrungsmittelbotulismus und führte diesen auf eine „Wurstvergiftung“ zurück (ERBGUTH und NAUMANN, 1999; ERBGUTH und NAUMAN, 2000). Trotz der bereits bekannten Symptome des Botulismus gelang die Isolation des Erregers *C. botulinum* erst viele Jahre später (1897) durch den Belgier Van Ermengem (DICKSON und SHEVKY, 1923; ANONYMUS, 2005).

#### 1.1.1. BoNT produzierende Clostridien und ihre Einteilung anhand ihrer Eigenschaften

Heute werden, basierend auf der 16S rRNA-Gensequenzanalyse, *C. botulinum*, *C. argentinense*, *C. butyricum* und *C. baratii* als Botulinum-Neurotoxin (BoNT) produzierende Clostridien zusammengefasst (ANNIBALLI et al., 2013; POPOFF und BOUVET, 2013).

Auf der Grundlage von phänotypischen, genotypischen und biochemischen Eigenschaften werden die verschiedenen Stämme von *C. botulinum* (und *C.*

*argentinense*) in vier große Gruppen eingeteilt (I - IV), *C. butyricum* und *C. baratii* stellen zwei separate Gruppen dar (HATHEWAY, 1990; KRÜGER, 2010; LINDSTRÖM et al., 2010; ANNIBALLI et al., 2013). Auf Ebene der BoNTe können weiterhin sieben serologisch unterscheidbare Toxovare A - G in den genannten Gruppen abgegrenzt werden (HATHEWAY, 1990; ROLLE und MAYR, 2007). Basierend auf den Aminosäuresequenzen ist eine zusätzliche Untergliederung in diverse Subtypen möglich (SMITH et al., 2005; KALB et al., 2012).

*C. botulinum* der Gruppe I (Toxovare A und proteolytische Stämme von B und F) und II (Toxovare E und saccharolytische Stämme von B und F) sowie *C. butyricum* (Toxovar E) und *C. baratii* (Toxovar F) werden größtenteils mit humanem Botulismus, die Gruppe III (Toxovar C und D) mit Botulismus bei Tieren in Verbindung gebracht. Manche Tiere, z. B. Rinder, sind auch für Typ A, B und E empfänglich (DAHLENBORG et al., 2003; MOELLER et al., 2003; LINDSTRÖM et al., 2010; BÖHNEL und GESSLER, 2012). Bis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen *C. argentinense* (Gruppe IV; Toxovar G) und Wundbotulismus gibt es keine bekannten Fälle, bei denen der Typ G an Ausbrüchen von Botulismus beteiligt war (KAHN, 2010; LINDSTRÖM et al., 2010; TAYLOR et al., 2010).

### 1.1.2. *Clostridium botulinum*

#### **Morphologie**

*C. botulinum* ist peritrich begeißelt und dadurch beweglich. Die vegetativen Formen des grampositiven Stäbchenbakteriums bilden bei ungünstigen Umweltbedingungen Endosporen als Dauerform aus. Diese weisen durch ihre subterminale Lagerung in der Zelle eine „Tennisschlägerform“ auf (ROLLE und MAYR, 2007). Die Sporen lassen das Bakterium relativ unempfindlich gegenüber Umwelteinflüssen sein. Näheres zu den morphologischen Eigenschaften von *C. botulinum* und verwandten Clostridienstämmen ist der Tabelle A3 des Anhang-Verzeichnisses von PREISING (2006) zu entnehmen.

#### **Toxingene**

Die einzelnen *C. botulinum* Stämme produzieren normalerweise nur einen Neurotoxintyp, wobei die genetische Information dafür als Einzelkopie an einem Ort im Genom vorliegt. Es gibt aber auch Stämme von *C. botulinum*, welche zwei

verschiedene BoNTe produzieren können z. B. BoNT / A – BoNT / B (AB Stamm). Diese bivalenten Stämme, bei denen die Toxine meistens auch in unterschiedlichen Mengen produziert werden, haben ihre Toxin-Informationen hingegen an zwei verschiedenen Orten im Genom gespeichert. Die Genloci variieren je nach Typ und können auf Chromosomen oder extrachromosomal auf Phagen oder Plasmiden liegen (HILL et al., 2009; POPOFF und BOUVET, 2013). Es gibt Stämme von *C. botulinum* Typ C und D, die durch Kultivierung ihre toxinogenen Eigenschaften verlieren können (OGUMA, 1976; ROLLE und MAYR, 2007). Ebenso ist eine Umwandlung mancher *C. botulinum* Stämme in eine andere Clostridien Spezies möglich, denn der Hauptunterschied zwischen *C. botulinum* Typ C und D und *C. novyi* stellt das produzierte Toxin dar. Daher kann durch eine Infektion mit einem bestimmten Phagen ein nicht toxinogener Stamm von *C. botulinum* Typ C in eine andere toxinogene Spezies, *C. novyi* Typ A, umgewandelt werden. Eine Rückumwandlung durch eine erneute Infektion mit einem Phagen von *C. botulinum* ist ebenfalls möglich (EKLUND et al., 1974).

## **Toxine**

### Botulinum-Neurotoxin (BoNT)

Nach oraler Aufnahme wird das BoNT im Dünndarm resorbiert und gelangt hämatogen zu den peripheren Nerven, welche es durch die Blockade der Acetylcholin Ausschüttung hemmt und somit eine schlaffe Lähmung hervorruft (BRAUN, 2006; ANNIBALLI et al., 2013). Das geruchs- und geschmacksneutrale BoNT wird von den Bakterien während des vegetativen Wachstums als inaktive Einzelstrang - Polypeptidkette (150 kDa) synthetisiert (LINDSTRÖM et al., 2010; ANNIBALLI et al., 2013). Durch endogene (proteolytische Stämme) und exogene (nicht proteolytische Stämme) Proteasen wird das Polypeptid in die aktive zweikettige Form gespalten (ANNIBALLI et al., 2013). Dadurch entsteht das aktivierte Neurotoxin (BoNT), das auf molekularer Ebene aus einer schweren (100 kDa) und einer leichten (50 kDa) Kette besteht, welche mittels einer Disulfidbrücke verbunden sind (NANTEL, 2002; NIGAM und NIGAM, 2010). Dieser Komplex wird als Progenitor-Toxin bezeichnet und besteht aus dem Neurotoxin und mehreren nicht-toxischen Komponenten (NAPs), die das Toxin bei der Magen-Passage schützen (SHARMA et al., 2003). Die NAPs bestehen aus einer nichttoxischen nichthämagglutinierenden (NTNH) Einheit und mehreren hämagglutinierenden Bestandteilen (HAs), wobei sich die

Struktur und die beteiligten Proteine je nach Subtyp unterscheiden (RODLOFF und KRÜGER, 2012). Weitere Einzelheiten zur Wirkungsweise des BoNT sind der Dissertation PREISING (2006) unter 2.1.2.1.4 „Pharmakologie und Wirkung“ zu entnehmen.

Das BoNT ist gegenüber physikalischen, chemischen und umweltbedingten Einflüssen sensibel: Es kann nach einer Minute bei 85 °C oder fünf Minuten bei 80 °C zerstört werden. Genauso erfolgt eine nahezu vollständige Inaktivierung des Toxins durch Zusatz von Chlor zum Trinkwasser (drei Milligramm Chlor pro Liter). Ebenfalls findet ein witterungsabhängiger Zerfall von aerosolisiertem Toxin von ein bis vier Prozent pro Minute statt.

### C2 Toxin, C3 Toxin und Clostridiolysin S

Für den Abschnitt der weiteren Toxine von *C. botulinum* wird auf die Dissertation von ENGELS (2012) Kapitel 2.1.2.2 verwiesen.

### **Toxizität**

BoNT produzierende Clostridien stellen nicht nur die größte Anzahl sondern auch die potentesten in der Natur vorkommenden Gifte her (POPOFF und BOUVET, 2013), weshalb *C. botulinum* als Kampfstoff zur Kategorie A der CDC-Einteilung gezählt wird (NEUMEISTER et al., 2009; KALB et al., 2012). Ein Gramm BoNT würde für den Tod von 10 Millionen Menschen ausreichen (ANONYMUS, 2012).

Die MTD 50 (median toxic dose) für Kühe liegt bei 0,388 ng / kg. Es wird angenommen, dass Rinder, bezogen auf das Kilogramm Körpergewicht, 12,88 mal sensitiver gegenüber *C. botulinum* Typ C Neurotoxin sind als Mäuse (MOELLER et al., 2003). Die letale Dosis ist abhängig vom Toxintyp, der Verabreichungsart und der Tierart (GILL, 1982).

### **Vorkommen und Verbreitung**

Clostridien sind ubiquitär vorkommende Bodenerreger (ANONYMUS, 2012), die eine wichtige Rolle in der Ökologie bei der Erneuerung von Biomasse einnehmen (POPOFF und BOUVET, 2013). Man findet *C. botulinum* (sowie alle nachfolgenden Clostridien Spezies) aber nicht nur in der Umwelt z. B. im Erdboden oder Sediment von Wasser sondern auch im Gastrointestinaltrakt gesunder Menschen und Tiere (ROLLE und MAYR, 2007; KRÜGER, 2010;

LINDSTRÖM et al., 2010; OZMEN et al., 2013).

Die bei ungünstigen Umweltbedingungen ausgebildeten Endosporen werden über Wasser, Staub und Pflanzenmaterial verbreitet (KRÜGER, 2010; OZMEN et al., 2013). Die geographische Verbreitung und das Wirtsspektrum hängen stark von den einzelnen Toxovaren ab. So ist z. B. *C. botulinum* Typ C in Europa, Nord- und Südamerika, Russland, Australien und Südafrika verbreitet und bevorzugt Wasservogel, Rinder, Nerze und Pferde als Wirte. Der Toxintyp D ist in Südafrika und Australien (selten Europa, Russland und Amerika) beim Rind verbreitet und der Toxintyp B in den USA, Nord- und Mitteleuropa beim Menschen, Pferd, Rind und Huhn (SELBITZ, 1992).

Es gibt keinen Hinweis darauf, dass BoNT in Fleisch oder Milch vorkommt (BMEL, 2011). Bei einer Kontamination von Milch mit BoNT wird durch die Pasteurisierung 99,99 % des Toxins inaktiviert und es dürfte somit keine Gefahr für den Verbraucher bestehen (WEINGART et al., 2010). Anders verhält es sich mit der Sporenelimination bei der Standardpasteurisierung, die bei diesem Vorgang nicht abgetötet werden. Dies bedeutet, dass jede überlebende Spore wieder auskeimen, sich vermehren und BoNT produzieren kann, sobald sie z. B. aus der gekühlten Umgebung verbracht wird (LINDSTRÖM et al., 2010).

### **Tenazität und Wachstumsbedingungen**

*C. botulinum* ist ein obligat anaerobes Bakterium, das sich nur in sauerstofffreiem Milieu vermehren kann (NEUMEISTER et al., 2009). Geeignete Umwelt- und Wachstumsbedingungen von *C. botulinum* variieren je nach Gruppenzugehörigkeit. Die minimalste Wachstumstemperatur liegt bei 3 °C (Gr. II), die optimalen Wachstumstemperaturen bewegen sich zwischen 26 °C (Gr. II) und 45 °C (*C. baratii*). Der minimale pH-Wert liegt zwischen 4,4 (Gr. I) und 5,6 (Gr. III), der minimale aW-Wert zwischen 0,94 (Gr. I) und 0,98 (Gr. III).

Die Endosporen sind sehr resistent und können bis zu 30 Jahre überleben (BRAUN, 2006). Ihre Hitzeresistenz reicht von 85 °C (Gr. II) bis 121 °C (Gr. I) (COLLINS und EAST, 1998; LINDSTRÖM et al., 2010). Inaktiviert werden sie in saurem Milieu oder unter Druck bei feuchter Hitze von 120 °C für 30 Minuten (RKI, 2007, 2013 überarbeitet).

## **Intoxikationsquellen**

Die Hauptursache für Botulismus in unseren Breiten ist bei Wiederkäuern die Aufnahme präformierter Toxine mit dem Futter (z. B. Silage) oder Wasser. Das BoNT wird entweder in Kadavern, welche das Futter verunreinigen, oder in Silage (Heulage) selbst unter günstigen Bedingungen (BRAUN, 2006; KAHN, 2010; FLI, 2011) durch *C. botulinum* gebildet. So entsteht durch eine mangelhafte Futterwerbung oder Silierung, z. B. durch die Kontamination mit Erde, gemeinsam mit der anaeroben Umgebung der Silage ein ideales Medium für die Vermehrung und Toxinproduktion von *C. botulinum* (NOTERMANS et al., 1979; KELCH et al., 2000; KAHN, 2010). Es werden auch Zusammenhänge mit der Ausbringung von Geflügelmist / -einstreu mit Kadaverteilen auf Viehweiden beschrieben (BRAUN, 2006; ROLLE und MAYR, 2007; KAHN, 2010; LINDSTRÖM et al., 2010; ANNIBALLI et al., 2013). In den Tropen wird die Vergiftung vor allem durch Osteophagie aufgrund von Phosphormangel hervorgerufen. Die Tiere fressen die Knochen oder Teile der Kadaver, welche präformierte BoNTe enthalten (KAHN, 2010; FLI, 2011).

### **1.1.3. Klinik**

Klinische Symptome werden i. d. R. durch die Aufnahme von BoNT verursacht. Neben der Intoxikation sind auch Formen von Toxininfektionen beschrieben.

#### **1.1.3.1. Intoxikation**

Nahrungsmittelbotulismus stellt in Deutschland die häufigste Form beim Menschen dar und tritt akut nach dem Verzehr von BoNT enthaltenden Lebensmitteln auf. Der Eintrag in die Nahrungskette kommt meist durch hausgemachte Fleisch- und Gemüsekonserven zustande (ANONYMUS, 2012). Nicht nur beim Menschen sondern auch bei Tieren ist die Intoxikation die häufigste Form von Botulismus, wobei das Krankheitsbild von Toxovar, Toxindosis und tierartlichen Besonderheiten abhängig ist (SELBITZ, 1992). Unter den Pflanzenfressern erkranken Rinder generell am häufigsten (SELBITZ, 1992; ROLLE und MAYR, 2007). Die Hauptursache für diese Erkrankung in unseren Breiten ist bei Wiederkäuern, wie bereits beschrieben, die Aufnahme präformierter Toxine mit dem Futter (z. B. Silage) oder Wasser.

Gekennzeichnet ist Botulismus bei allen Tierarten durch eine fortschreitende, schlaffe Lähmung der Muskulatur, häufig mit tödlichem Ausgang. Er tritt bei

Rindern sporadisch als Stallenzootie auf, ist nicht ansteckend und die Tiere sind fieberfrei (BRAUN, 2006). Betroffene Tiere weisen erste klinische Anzeichen nach einer Inkubationszeit von 1 bis 17 Tagen nach Aufnahme von BoNT auf (OZMEN et al., 2013). Bei der rasch von kaudal nach kranial fortschreitenden allgemeinen Muskellähmung treten folgende weitere Symptome auf: Milchleistungsabfall, Muskelzittern, je nach Toxintyp teilweise Durchfall und Unruhe (STÖBER, 2006). Weitere Anzeichen können Apathie, Kau- und Schlingbeschwerden sein, wobei die meist auftretende Dysphagie durch schlaffe Lähmung der Zungen-, Backen- und Schlundmuskulatur ausgelöst wird (BRAUN, 2006). In fortgeschrittenem Stadium kann die Zunge ganz heraushängen (STÖBER, 2006). Aufgrund der Lähmungen speicheln die Tiere, kauen langsam und verlieren aufgenommenes Futter und Wasser wieder (BRAUN, 2006). Später folgt „Wickelkauen“, die Futter- und Wasseraufnahme persistiert zunehmend und betroffene Tiere dehydrieren. Klinisch kann man bei erkrankten Kühen neben Mydriasis und Ptosis (STÖBER, 2006; OZMEN et al., 2013) auch herabhängende Ohren beobachten. Das Aufstehen fällt betroffenen Tieren schwer, die Schwanzspannung ist herabgesetzt, die Harnentleerung sistiert und die Pansenmotorik stagniert teilweise (STÖBER, 2006). Betroffene Tiere liegen sukzessive fest und sterben durch Atemlähmung (BRAUN, 2006; STÖBER, 2006; ANNIBALLI et al., 2013). Im Blut können eine Hämokonzentration und eine metabolische Azidose festgestellt werden (BRAUN, 2006; STÖBER, 2006).

#### **1.1.3.2. Toxininfektion**

Diese Form von Botulismus entsteht im Gegensatz zur Intoxikation, bei der präformierte BoNTe aufgenommen werden, durch eine im Wirtsorganismus stattfindende Vermehrung von *C. botulinum* und dessen Toxinproduktion.

Wundbotulismus konnte bei Tieren bisher nur in Ausnahmefällen belegt werden (SELBITZ, 1992; ROLLE und MAYR, 2007) und kommt auch beim Menschen selten vor. In den letzten Jahren wird diese Form jedoch zunehmend bei Drogenabhängigen beobachtet. Durch Kontamination von Wunden und der darauf folgenden lokalen Infektion, können sich die Erreger unter anaeroben Bedingungen vermehren und Toxine produzieren, was zu einer systemischen Intoxikation führt (MASELLI, 1998; NEUMEISTER et al., 2009; ANONYMUS, 2012).

Das Shaker Foal Syndrom wird auch als eine Art des Wundbotulismus beim Pferd

angesehen. Prädisponierende Lokalisationen für eine Toxinbildung im Tier sind gastrointestinale Ulzera, Nekroseherde in der Leber, Nabel- oder Lungenabszesse sowie Hautwunden (WILKINS und PALMER, 2003; KAHN, 2010).

Säuglingsbotulismus ist weltweit die häufigste gemeldete Form von Botulismus beim Menschen. Sie tritt bei Säuglingen bis zu einem Jahr auf, wobei es nach oraler Aufnahme von Sporen (z. B. in Honig) zu einer enteralen Kolonisierung und dadurch zu einer kontinuierlichen Toxinproduktion mit nachfolgender Resorption kommt (ARNON, 1998; FLI, 2011; ANONYMUS, 2012).

Der gleiche Krankheitsablauf wie beim Säuglingsbotulismus tritt beim sehr selten vorkommenden Intestinalen Botulismus des Erwachsenen auf. Durch längere Gabe eines Breitspektrumantibiotikums oder infolge einer Darmoperation kann die natürliche gastrointestinale Flora zerstört und somit die Konkurrenz von *C. botulinum* geschwächt werden, was dessen Wachstum ermöglichen kann (LINDSTRÖM und KORKEALA, 2006; ANONYMUS, 2012).

Ob bei der Equine grass sickness *C. botulinum* in irgendeiner Form beteiligt ist, wird seit langem kontrovers diskutiert. Gekennzeichnet ist die am häufigsten in Großbritannien vorkommende Erkrankung durch eine meist tödliche gastrointestinale Dysfunktion aufgrund einer Degeneration des autonomen Nervensystems (BÖHNEL et al., 2003; KAHN, 2010). Vermuteter Auslöser der Erkrankung ist ebenfalls das Wachstum und die BoNT Produktion von *C. botulinum* im Darm der Tiere (HUNTER et al., 1999).

Der postulierte „chronische“ oder „viszerale“ Botulismus soll ebenfalls eine Art Toxininfektion darstellen. Nach Aufnahme der Sporen von *C. botulinum* soll es zur Auskeimung und Ansiedlung des Erregers mit einer kontinuierlichen Toxinproduktion in den unteren Darmabschnitten kommen. Diese BoNTe sollen in kleinsten Mengen resorbiert werden, wodurch es zu folgenden chronischen Symptomen bei Kühen, v. a. im peripartalen Zeitraum, kommen kann: Bestandsweise gehäufte Milchleistungsabfall, Festliegen und Abmagerung der Tiere. Zudem wird von Koordinations- (Überkreuzsetzen der Vorderbeine) und Bewegungsstörungen, Muskelatrophie, unsicherem Gang und Schwanken genauso wie von Bewegungsunlust und Teilnahmslosigkeit berichtet. Die Tiere zeigen einen Schlotterkiefer, speicheln, haben Schwierigkeiten bei der Wasseraufnahme, einen verminderten Schwanztonus, Harnabsatzstörungen sowie Durchfall im Wechsel mit Obstipation (BÖHNEL et al., 2001; KRÜGER, 2010;

SCHWAGERICK, 2011; KRÜGER et al., 2012). Als potentielle Risikofaktoren für diese „Erkrankung“ sind u. a. das Biozid Glyphosat z. B. Roundup® (KRÜGER, SHEHATA et al., 2013) sowie Gärreste und Rückstände aus Biogasanlagen (BÖHNEL und GESSLER, 2010; HELLWIG, 2010; BÖHNEL und GESSLER, 2012) im Gespräch. Für weitere Einzelheiten wird auf die Dissertation von BECHTER (2014) Kapitel II 3.5 verwiesen.

#### **1.1.4. Diagnostik**

Die Diagnostik des Botulismus umfasst den Erreger- und Toxinnachweis. Sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin ist diese schwierig, weshalb sich die Diagnosestellung größtenteils auf das klinische Bild und den Ausschluss von Differentialdiagnosen stützt. Es fehlen pathologisch-anatomische Veränderungen (ROLLE und MAYR, 2007) und der Erreger und / oder Toxinnachweis ist sowohl in klinischen Proben als auch in Futterproben oft nicht möglich. Das Toxin ist nicht gleichmäßig im Futter verteilt und schon kleinste Mengen reichen für eine Intoxikation aus. Außerdem gilt der Nachweis aus Umweltproben, Organproben oder Darminhalt nicht als beweisend für eine Diagnosestellung. Je nach Methode und Toxingehalt dauert der Nachweis acht Stunden bis fünf Tage und mehr. Eine humane, klinische Probe gilt laut DIN 10 102 als diagnostisch bestätigt, wenn entweder das Toxin mittels Maus-Bioassay nachgewiesen oder im kulturellen Nachweis toxinbildendes *C. botulinum* angezüchtet werden kann (RKI, 2007, 2013 überarbeitet; FLI, 2011). Für Proben betroffener Tiere gibt es keine separaten Bestimmungen, weshalb das Vorgehen von der Humanmedizin abgeleitet wird. Somit orientiert sich die Methodenempfehlung des Friedrich-Löffler-Instituts (FLI) für den Maus-Bioassay mit Tier- und Silageproben größtenteils an der Methode L 06.00-26 „Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen“ der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (FLI, 2012).

#### **Erregernachweis**

Der klassische kulturelle Nachweis von *C. botulinum* ist unter Laborbedingungen anspruchsvoll, wobei die anaerobe Anzucht direkt auf festen oder mit vorheriger Anreicherung in flüssigen Nährmedien erfolgen kann. Es werden eine Reihe nichtselektiver Flüssigmedien wie z. B. TPGY Medium für die Anreicherung von *C. botulinum*, genauso wie z. B. Eigelb-Laktose Agar (E.L.A.) als festes Nährmedium eingesetzt. Die Inkubationszeit von 1 - 7 Tagen und die optimale

Temperatur zwischen 26 und 30 °C oder 35 und 37 °C variiert je nach Nachweismethode und Toxintyp. Einer ersten Differenzierung auf E.L.A. folgt die Isolierung des mutmaßlichen Erregers. Daraufhin können eine Identifizierung anhand der morphologischen Kriterien, eine weitere biochemische Differenzierung (in Reinkultur mithilfe von kommerziellen Testkits wie z. B. der „bunten Reihe“) oder molekularbiologische Nachweise folgen (LINDSTRÖM und KORKEALA, 2006).

Am besten geeignet davon, jedoch ohne Aussagekraft über die Lebens- bzw. Vermehrungsfähigkeit eines Mikroorganismus (BUSCH, 2007), ist die real-time Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR), die zu den wichtigsten Nachweismethoden der Molekularbiologie zählt. Bei diesem Verfahren wird die DNA *in vitro*, mit Echtzeitanalyse und Quantifizierung der DNA-Amplifikate mittels Fluoreszenz, vervielfältigt. Es wurden einige Single- und Multiplex- real-time PCRs für den Nachweis von *C. botulinum* entwickelt, die auf der Detektion von *bont* (BoNT) - Genen, allenfalls in Kombination mit einem Nachweis des *ntnh*-Gens, beruhen (FACH et al., 2009; HILL et al., 2009; KIRCHNER et al., 2010). Das *ntnh*-Gen kodiert für eine Einheit der nichttoxischen Komponenten des BoNT, welche das Toxin bei der Magenpassage schützen (s. 1.1.2). Die real-time PCR ist als Screening- Verfahren für die schnelle Detektion von *C. botulinum* gut geeignet, das Ergebnis ist aber mittels klassisch-kulturellen Verfahren zu bestätigen.

### **Toxinnachweis**

Weltweit gilt der Maus-Bioassay als die empfindlichste und zuverlässigste Nachweismethode für biologisch aktives BoNT und ist daher Goldstandard. Er wird in der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB (BMEL, 2005) beschrieben. Das Toxin kann in einem ersten Schritt direkt und indirekt (Toxinbildungsvermögen) nachgewiesen werden, in einem weiteren Schritt wird der Serotyp bestimmt (FLI, 2011). Für jede Untersuchung einer verdächtigen Probe wird laut DIN-Norm 10 102 (§ 64 LFGB, L 06.00-26) eine große Anzahl an Mäusen benötigt (BMEL, 2005).

Einzelheiten zum Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA), Lateral Flow Assay (LFA) und Endopeptidase-Assay sind der Dissertation von ENGELS (2012) Kapitel 2.2.3 zu entnehmen.

## **Sensitivität und Spezifität der real-time PCRs für den Nachweis von *C. botulinum***

Für Lebensmitteluntersuchungen liegt die Sensitivität der PCR für den Nachweis von *C. botulinum* Typ A, B, E und F Reinkulturen, abhängig vom Toxintyp, zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KBE / ml Anreicherung (TPGY- Bouillon) (MESSELHÄUSSER, ZUCKER, ZIEGLER et al., 2007). Die Korrelation mit dem Maus-Bioassay erreicht 95,6 % (FACH et al., 1995). Bei Untersuchungen von Lebensmitteln und Darminhalt von Tieren ergaben sich für *C. botulinum* Typ C und D die Nachweisgrenzen von 10 bis  $10^3$  Bakterien im Reaktionsvolumen und eine Korrelation mit dem Maus-Bioassay von 89,4 %. Ein Grund für die Differenzen in der Sensitivität der einzelnen Clostridien-Typen könnte die unterschiedlichen Lokalisationen der BoNT-Gene sein (FACH et al., 1996).

Die Spezifität liegt für die jeweils nachzuweisenden Sequenzen von *C. botulinum* Typ A, B, E und F bei 100 % (ANONYMUS, 2006).

### **1.1.5. Therapie**

Beim Botulismus basiert die Therapie auf einer symptomatischen Behandlung der Tiere und dem Ausschalten der Toxinquelle. Die Gabe von polyvalentem Antitoxin sowie die Impfung bereits erkrankter Tiere sind stark umstritten (BRAUN, 2006; ANNIBALLI et al., 2013; OZMEN et al., 2013). TAYLOR et al. bezweifeln eine signifikante Kreuzreaktivität der Antitoxine zwischen den einzelnen Serotypen (2010).

### **1.1.6. Immunität und Impfung**

#### **1.1.6.1. Akuter Botulismus**

Es ist nicht bekannt, ob der Aufbau einer Immunität gegen BoNT möglich ist. Abgeleitet aus Tierexperimenten wird angenommen, dass die toxische Dosis niedriger ist als die immunogene und somit bei einem natürlichen Ausbruch (niedrige Dosis des nativen Proteins und keine hohe immunogene Dosis des Toxoids) eine Immunität oft ausbleibt (RKI, 2007, 2013 überarbeitet). Nach der Impfung mit Botulismus Toxoiden wird beschrieben, dass bei einem folgenden Ausbruch ein adäquater Schutz der Tiere gewährleistet werden kann (STEINMAN et al., 2006) und dass die Impfung der effizienteste Weg ist, um Botulismus-Ausbrüche zu kontrollieren (BROWN et al., 1999; CUNHA et al.,

2014). In Deutschland ist derzeit kein Impfstoff gegen Botulismus zugelassen, im Einzelfall kann jedoch eine Ausnahmegenehmigung beim Veterinäramt erwirkt werden. Bis zum 31.12.2014 sind laut § 43 des neuen Tiergesundheitsgesetzes (BMEL, 2013) die Vorschriften nach § 17 c des alten Tierseuchengesetzes (BMEL, 2004) noch anzuwenden. Ab dem 01.01.2015 gilt analog dazu § 11 des Tiergesundheitsgesetzes sowie weiterhin die Tierimpfstoff-Verordnung (BMEL, 2006). Infolgedessen kann nach Genehmigung mit der Botulism Vaccine<sup>®</sup> (Onderstepoort Biological Products, RSA) oder Ultravac<sup>®</sup> Botulinum (Zoetis / Pfizer Animal Health, Australien) gegen *C. botulinum* Typ C und D geimpft werden. Es kann daraufhin ein signifikanter Anstieg des Antikörpertiters beobachtet werden und die Belastung mit BoNT und Sporen im Kot wird signifikant reduziert (KRÜGER, SKAU et al., 2013).

#### **1.1.6.2. „Chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus**

Bestände, in welchen von „chronischem“ oder „viszeralem“ Botulismus ausgegangen wird, können ebenfalls eine Ausnahmegenehmigung erwirken (BMEL, 2004, 2006, 2013) und gegen Botulismus impfen. Teilweise werden diese Bestände auch mit dem zugelassenen Covexin 8 oder 10<sup>®</sup> (Zoetis Deutschland GmbH) oder Bravoxin 10<sup>®</sup> (Intervet Deutschland GmbH) vakziniert, auch wenn beide Impfstoffe nur Toxoide von *C. perfringens* Typ A, B, C und D, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. tetani*, *C. sordellii*, *C. haemolyticum* sowie eine inaktivierte *C. chauvoei* Vollkultur enthalten (CLAUSEN, 2010; KRÜGER et al., 2011). Es wird keine Besserung der klinischen Erscheinung aber eine Elimination der Erregerausscheidung von *C. botulinum* beschrieben (KRÜGER et al., 2011). Ein signifikanter Anstieg des Antikörpertiters nach der Impfung ist bei *C. perfringens*, *C. novyi* und *C. sordellii* nachgewiesen (WOOLUMS et al., 2011). Berichten zufolge wird nach der Impfung teilweise zuerst eine Verschlechterung des Zustandes, manchmal auch Abgänge beobachtet. Laut CLAUSEN (2010) sind die Nebenwirkungen abhängig von der Vorbelastung mit BoNT.

#### **1.1.7. Rechtslage**

##### **1.1.7.1. Akuter Botulismus**

Bei Krankheitsverdacht, Erkrankung oder Tod ist Botulismus beim Menschen gemäß § 6 Infektionsschutzgesetz meldepflichtig, genauso gemäß § 7 der direkte oder indirekte Nachweis, soweit die Nachweise auf eine akute Infektion hindeuten

(BMEL, 2000; RKI, 2007, 2013 überarbeitet). Jährlich werden dem Robert-Koch-Institut rund 20 Fälle von Lebensmittelbotulismus gemeldet (BFR, 2005). Im Jahre 2003 wurde die Erkrankung Botulismus von der EU als Zoonose eingestuft (EU, 2003). Anders verhält es sich beim Tier. Da in Deutschland Botulismus bei Rindern weder melde- noch anzeigepflichtig ist, gibt es keine genauen Fallzahlen, er tritt jedoch relativ selten auf (FLI, 2011). Auf einer Deutschlandkarte zusammengefasst, nach Aussage der Autoren jedoch nicht repräsentativ, sind die bearbeiteten Proben zu Botulismus bei Rindern zwischen 1996 und 2010 von BÖHNEL und GESSLER (2012) dargestellt.

#### **1.1.7.2. „Chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus**

Die Faktenlage zum „chronischen“ oder „viszeralen“ Botulismus ist äußerst dünn, das Krankheitsbild sehr unspezifisch und ausreichende Erkenntnisse zu Epidemiologie, Diagnostik und Bekämpfung fehlen. Auch sind weder eine Übertragbarkeit (oder die Gefahr einer Übertragbarkeit) laut § 2 des Tiergesundheitsgesetzes (BMEL, 2013), noch die rasche Verbreitung als Infektionskrankheit nach dem heutigen Kenntnisstand gegeben. Es scheint sich eher um ein einzelbetriebliches Phänomen zu handeln. In anderen Staaten gibt es bisher keine Hinweise auf „chronischen“ Botulismus (BMEL, 2011).

#### **1.2. *Clostridium perfringens***

*C. perfringens* stellt ebenfalls eine pathogene Clostridien Spezies dar und produziert die in Tab. 2 dargestellten Haupttoxine (major toxins), sowie Nebentoxine (minor toxins) mit hämolytischen und enzymatischen Eigenschaften u. a. das Enterotoxin (cpe). Letzteres wird während der Sporulation gebildet, ist hitzelabil (ANONYMUS, 2005; POPOFF und BOUVET, 2013) und ist für die gastrointestinalen Erkrankungen verantwortlich (HATHEWAY, 1990; SONGER, 1996; PETIT et al., 1999). Am häufigsten vorkommend ist der Toxintyp A, wohingegen nur wenige Prozent der *C. perfringens* Isolate cpe-Gene besitzen. Der Verlauf der Allgemein- und Darmerkrankungen (Tab. 2) ist meist perakut bis akut und kann alle Altersgruppen betreffen, v. a. aber Jungtiere (DIRKSEN et al., 2006). Da *C. perfringens* Bestandteil der normalen Darmflora ist, sind die Differenzierung der einzelnen Toxintypen und der Nachweis der Toxingene, die auf einem Chromosom oder Plasmid liegen, für eine Diagnose wichtig. Die verdächtigen Proben werden mithilfe von mikro- und molekularbiologischen Methoden untersucht. Es finden eine Anzucht auf Selektivmedien und die

Durchführung verschiedener real-time PCRs statt, wobei die Nachweisgrenze für die einzelnen Gene bei 500 fg / PCR Ansatz liegt und v. a. zur Differenzierung der Isolate eingesetzt wird (MESSELHÄUSSER, ZUCKER, ELMER-ENGLHARD et al., 2007). Die geraden, unbeweglichen Stäbchenbakterien bilden zentral liegende Sporen aus, wachsen bei Temperaturen zwischen 20 und 50 °C und zeigen beim Wachstum auf Blutagar häufig eine Doppelzonenhämolysen (HATHEWAY, 1990).

**Tabelle 2: Haupttoxine der verschiedenen Toxovaren von *C. perfringens* und ihre Bedeutung (modifiziert nach PETIT et al., 1999; DIRKSEN et al., 2006)**

Toxovar	Haupttoxine					Genotyp	Veterinärmedizinische Bedeutung	Wirkung
	$\alpha$	$\beta$	$\epsilon$	$\iota$	$\tau$			
A	x					cpa cpa, cpe cpa, cpb2 cpa, cpb2, cpe	Gasgangrän; Septikämie; Durchfall (F, Ferkel usw.); Nekrotisierende Enteritis (Geflügel)	Hämolyse, Nekrose
B	x	x	x			cpa, cpb1, etx cpa, cpb1, etx, cpe	Dysenterie L; hämorrh. Enteritis K, F; Enterotoxämie Schaf	$\beta$ : Darmschleimhautnekrose
C	x	x				cpa, cpb1 cpa, cpb1, cpe cpa, cpb2, cpa, cpb2, cpe cpa, cpb1, cpb2, cpa, cpb1, cpb2, cpe	Nekrotisierende Enteritis L, K, F; Enterotoxämie S	$\beta$ : Darmschleimhautnekrose
D	x			x		cpa, etx cpa, etx, cpe	Enterotoxämie L, S, K, Z; Breinierenkrankheit S	$\epsilon$ : Erhöhung der Gefäßpermeabilität
E	x				x	cpa, iap, ipb, cpa, iap, ipb, (cpe) <sup>x</sup> Cpa, iap	Enterotoxämie K	Diarrhoe, Hautnekrose

K = Kalb; F = Fohlen; L = Lamm, S = Schaf; Z = Ziege; (cpe)<sup>x</sup> = stilles Gen

cpa =  $\alpha$ -Toxinogen; cpb1 =  $\beta$ 1-Toxinogen; cpb2 =  $\beta$ 2-Toxinogen; etx =  $\epsilon$ -Toxinogen; iap = ia-Toxinogen; ipb = ib-Toxinogen; cpe = Enterotoxinogen

Zur Prophylaxe kann eine Mutterschutzimpfung durchgeführt werden. Eine klinische Erkrankung muss symptomatisch und antibiotisch therapiert werden. Des Weiteren können bei einer Mischinfektion mit Clostridien Spezies die bereits

unter 1.1.6.2 beschriebenen Impfstoffe Covexin 8 oder 10<sup>®</sup> (Zoetis Deutschland GmbH) oder Bravoxin 10<sup>®</sup> (Intervet Deutschland GmbH) zur Prophylaxe aber auch zur Therapie eingesetzt werden. Dasselbe gilt für die nachfolgenden Clostridien Spezies.

### 1.3. *Clostridium novyi*

Von *C. novyi* sind heute drei Toxovare bekannt, wobei die Einteilung auf der Produktion der verschiedenen Toxine beruht. *C. novyi* Typ A bildet alpha, gamma, delta und epsilon Toxine, Typ B produziert alpha, beta, zeta, eta und theta Toxine und Typ C wird als apathogen betrachtet. Die einzelnen Toxovare werden anhand der letalen alpha und beta Toxine unterschieden, wobei das erstere eine erhöhte Kapillarpermeabilität und Nekrose, das letztere Hämolyse und Nekrose bewirkt (HATHEWAY, 1990).

Erkrankungen mit einer Beteiligung von *C. novyi* sind akut, weisen eine hohe Mortalitätsrate auf (KAHN, 2010) und können beim Tier wie folgt eingeteilt werden: Typ A kann als Monoinfektion das maligne Ödem II, eine Wundinfektionskrankheit, hervorrufen. Bei Säugetieren und Vögeln entwickeln sich hierbei ausgedehnte Ödeme bei größtenteils fehlender Gasentwicklung (ROLLE und MAYR, 2007). Ebenfalls beteiligt ist dieser Erreger an der Erkrankung „bighead“ beim jungen Schafbock (KAHN, 2010) und verschiedenen Gasödeminfektionen. Typ B ist für die nekrotisierende Hepatitis des Schafes (selten des Rindes und anderer Säugetiere) verantwortlich. Die Infektionsquelle hierfür ist häufig die fäkale Kontamination des Futters durch infizierte Tiere. Der Erreger vermehrt sich in den durch wandernde Leberegel hervorgerufenen Nekroseherden der Leber, wobei durch die produzierten Toxine eine tödliche Intoxikation entsteht. Diese Erkrankung ist nicht kontagiös, kann aber enzootisch, am häufigsten bei gut entwickelten Schafen, auftreten. Ob *C. novyi* auch am „sudden death syndrom“ beim Rind und Schwein eine Rolle spielt, ist fraglich. Die Diagnose der nekrotisierenden Hepatitis ist anhand der Leberpathologie und dem Bakteriennachweis möglich (ROLLE und MAYR, 2007; KAHN, 2010). *C. novyi* ist ein bewegliches, gramvariables Stäbchenbakterium. Es braucht strikt anaerobe Wachstumsbedingungen und ist schwierig anzuzüchten. Die Sporen überleben eine Erwärmung auf 100 °C über fünf Minuten (HATHEWAY, 1990).

Bei der Erkrankung „bighead“ kann eine antibiotische Therapie durchgeführt werden (KAHN, 2010), bei der nekrotisierenden Hepatitis ist sie hingegen

aussichtslos. Prophylaktisch können bei letzterem eine Impfung vor Weideanstrieb und eine Parasitenbekämpfung in Form von Faszoliziden helfen (ROLLE und MAYR, 2007).

#### **1.4. *Clostridium haemolyticum***

*C. haemolyticum* war früher als *C. novyi* Typ D eingeteilt. Es produziert das beta sowie eta und theta Toxin. Das beta Toxin ist wie bei *C. novyi* für Hämolyse und Nekrose verantwortlich (HATHEWAY, 1990; STÖBER, 2006).

Als Erkrankung tritt die bazilläre Hämoglobinurie beim Wiederkäuer v. a. bei Rindern, teilweise auch Schafen auf. Sie kommt vorwiegend in feuchten Niederungen, z. B. subtropischen Gebieten aber auch in Großbritannien und Irland vor (ROLLE und MAYR, 2007). Über vereinzelte Bakteriennachweise aus Schleswig-Holstein wird berichtet (STEMME, 2011). Die Infektion ist akut, meist tödlich verlaufend und enzootisch auftretend. Die klinischen Hauptsymptome sind Fieber, Ikterus, Niedergeschlagenheit, Anämie und, aufgrund der Zerstörung zirkulierender Erythrozyten durch das beta-Toxin, Hämoglobinurie.

Eine Verdachtsdiagnose kann anhand der Laborbefunde, des klinischen Bildes und den postmortalen Funden gestellt werden. Das streng anaerob lebende Stäbchenbakterium kann zentral liegende Sporen ausbilden, welche in den Knochen von an bazillärer Hämoglobinurie verendeten Rindern für zwei Jahre überdauern können. Auch kann es bis zu 30 Minuten bei 95 °C überleben (STÖBER, 2006).

Essentiell für einen Therapieerfolg ist eine frühe Behandlung mit hochdosiertem Antibiotikum und Antitoxin-Serum. Hilfreich können auch eine Bluttransfusion, Flüssigkeitstherapie und die Gabe von Spurenelementen zur Förderung der Blutregeneration sein. Prophylaktisch kann ebenfalls eine Impfung durchgeführt werden (STÖBER, 2006; KAHN, 2010).

#### **1.5. *Clostridium septicum***

*C. septicum* und *C. chauvoei* sind ähnliche Organismen und daher bezüglich ihrer physiologischen und toxinogenen Eigenschaften schwer zu differenzieren. Sie sind beide eher sauerstofftolerant und einfach anzüchtbar (HATHEWAY, 1990). *C. septicum* produziert einige toxische Produkte, wobei das hämolytisch und nekrotisch wirkende alpha-Toxin (letales Toxin) im Vordergrund steht (SONGER, 1996).

*C. septicum* kann an der Wundinfektion Pararanschbrand (malignes Ödem) beteiligt sein, die bei allen Tierarten und Altersklassen weltweit vorkommt. Sie ist eine akut entstehende fatale Toxämie (KAHN, 2010), gekennzeichnet durch schnell fortschreitende subkutane Schwellungen und später ein generalisiertes Ödem (HATHEWAY, 1990). Diese Erkrankung tritt beim Rind in Deutschland nur sporadisch auf und ist tierseuchenrechtlich nicht speziell geregelt (STEMME, 2011).

Des Weiteren ist *C. septicum* auch der Erreger vom Labmagenpararanschbrand („bradsot“ oder „braxy“) beim Schaf. Es handelt sich um eine hämorrhagisch-nekrotisierende Labmagenentzündung, die häufig einen Großteil der Herde betrifft, aber nicht kontagiös ist. Die Sporen werden oral mit dem Futter aufgenommen und keimen aus. Durch eine Prädisposition, z. B. die Aufnahme von gefrorenem Futter (ROLLE und MAYR, 2007), dringen die Erreger über die Labmagenschleimhaut ein, vermehren sich und es kommt zu einer Bakteriämie und Toxämie (HATHEWAY, 1990). Auch andere Gasödem-Erreger können am Geschehen beteiligt sein (HATHEWAY, 1990; SONGER, 1996; KAHN, 2010). Der Verlauf ist akut und die Mortalitätsrate hoch. Labmagenpararanschbrand scheint größtenteils auf europäische Schafe begrenzt zu sein, die gefrorenes Futter fressen.

Eine Diagnose des Labmagenpararanschbrands kann anhand eines Immunfluoreszenztests mit Gewebeabstrichen erfolgen, ist aber nur innerhalb der ersten 24 Stunden aussagekräftig, da sich der Erreger *post mortem* im Darmtrakt vermehrt. Genauso ist eine Spezies Identifizierung und Differenzierung mithilfe einer PCR möglich (KAHN, 2010). Ein Therapieversuch ist meist schon zu spät, eine prophylaktische Impfung möglich (ROLLE und MAYR, 2007).

### 1.6. *Clostridium difficile*

Das Bakterium kann im Meeressediment, Sand, Erde, als nosokomialer Keim im Krankenhaus und im Kot verschiedener Tierarten nachgewiesen werden (SONGER, 1996). Die toxinogenen Stämme von *C. difficile* produzieren zwei potentiell tödliche Protein-Toxine. Das Enterotoxin (Toxin A) verursacht Hypersekretion und Gewebeschäden wohingegen das Zytotoxin (Toxin B), das deutlich weniger potent ist, Entzündung und Nekrose hervorruft (LYERLY et al., 1988; HATHEWAY, 1990; KAHN, 2010; POPOFF und BOUVET, 2013). *C. difficile* löst beim Menschen größtenteils nach Vorschädigung der normalen

Darmflora (i. d. R. durch Antibiotika) Darmerkrankungen (z. B. pseudomembranöse Kolitis) aus, wobei schwer verlaufende Infektionen gemäß § 6 IfSG meldepflichtig sind (RKI, 2007). Das Bakterium ist auch für Durchfall und Enteritiden bei einer Vielzahl von Tierspezies, unter anderem bei Kälbern, verantwortlich (KAHN, 2010; POPOFF und BOUVET, 2013).

Eine Diagnose kann gestützt werden durch die kürzliche Gabe von Antibiotikum und gestellt werden durch diagnostische Tests. Aus Kotproben ist eine direkte Toxindetektion mittels ELISA, genauso wie die Identifizierung der Toxingene mithilfe einer real-time PCR möglich (KAHN, 2010). Auch die Kultivierung und bei positivem Testergebnis die anschließende Typisierung des Stammes (z. B. mittels PCR) stellt eine Möglichkeit dar (RKI, 2007). Der Erreger spricht häufig auf eine Antibiotikum-Therapie an (SONGER, 1996).

## **2. Stallparameter und Herdenindices**

Die Gesundheit einer Milchviehherde wird multifaktoriell beeinflusst, unter anderem durch eine Vielzahl an Stallparametern. Da dies einen sehr umfangreichen Themenkomplex umfasst, soll im Folgenden nur kurz auf einzelne wichtige Parameter und ihre Auswirkungen eingegangen werden. Im weiteren Verlauf werden Herdenindices beschrieben, die als Indikatoren für diese Einflussgrößen dienen können.

Klauenerkrankungen stellen zusammen mit Mastitiden und Fruchtbarkeitsstörungen die Gesundheitsprobleme mit den größten wirtschaftlichen Einbußen dar (BRUIJNIS et al., 2010). Lahme Tiere liegen deutlich mehr, was eine Assoziation mit Liegeschäden und Eutererkrankungen hervorruft (NUSS und WEIDMANN, 2013). Diese Tiere sinken in der Rangordnung, nehmen weniger Futter auf und magern ab, sie sind anfälliger für Fruchtbarkeitsstörungen, ihre Milchleistung nimmt ab, sie entwickeln Mastitiden und Stoffwechselerkrankungen und weisen eine verkürzte Nutzungsdauer auf (GASTEINER, 2005; EFSA, 2009). Die European Food Safety Authority schlägt eine maximale Prävalenz von 10 % wahrnehmbar lahmer Kühe im Betrieb vor. Es besteht ein Zusammenhang zwischen infektiösen Klauenerkrankungen und nassen, verschmutzten Haltungsbedingungen (PHILIPOT et al., 1994). Die Stallhygiene kann u. a. mittels einer Verschmutzungsbonitur erfasst und quantifiziert werden (COOK und REINEMANN, 2007). Die

Gliedmaßensauberkeit wird durch das Stalldesign, die Häufigkeit der Laufgangreinigung, die Belegungsdichte, die Liegezeiten und somit durch den Kuhkomfort maßgeblich beeinflusst (COOK, 2002). Bei einem erschwerten Aufsteh- und Abliegevorgang durch unkomfortable Liegeboxen oder infolge Lahmheiten finden Kot- und Harnabsatz im Liegen statt (BOGNER und GRAUVOGEL, 1984). Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Verschmutzung des Euters und einer mittleren Neuinfektionsrate des Euters innerhalb von sechs Monaten. Die Infektion der Milchdrüse mit pathogenen Umwelterregern stellt in den Vereinigten Staaten das größte Problem bei Eutererkrankungen dar (COOK und REINEMANN, 2007). Die Eutergesundheit kann, mit begrenzter Aussagekraft, anhand der Tankmilchzellzahl beurteilt werden. Betriebe ohne Euterprobleme sollten < 150 000 Zellen / ml Milch im Jahresmittel haben (DE KRUIF et al., 2013). Der Kuhkomfort hat einen entscheidenden Einfluss auf das Liegeverhalten und Wohlergehen der Tiere. „Liegebereiche sollten ein verletzungsfreies Ablegen, Ruhen und Aufstehen ermöglichen“ (KANSWOHL, 2008). Durch schmerzfreies, komfortables und somit längeres Liegen wird auch die Milchleistung positiv beeinflusst. Eine liegende Kuh hat eine deutlich höhere Euterdurchblutung als ein stehendes Tier (METCALF et al., 1992). Einen ebenfalls wichtigen Einfluss auf die Milchleistung hat die Versorgung mit ausreichend und qualitativ gutem Wasser. Um einen Liter Milch zu produzieren benötigt eine Kuh abhängig von der Umgebungstemperatur ca. drei bis vier Liter Wasser, wobei etwa ein Drittel der täglichen Wasserration kurz nach dem Melken aufgenommen wird (RINDERHALTUNG, 2007; DE KRUIF et al., 2013). Daher kann sich eine Überbelegung an den Tränken negativ auf die Milchleistung auswirken.

Weitere Faktoren für den Erhalt der Leistung stellen die Futterqualität, Menge und wiederkäuergerechte Zusammensetzung der Ration sowie eine ausreichende Möglichkeit zum Ruhen dar. Bei einer Überbelegung der Fressplätze ist nicht jedem Tier ausreichend Gelegenheit zu einer ausreichenden Futteraufnahme gegeben. Laut Tierschutzleitlinie für Milchkühe muss grundsätzlich für jedes Tier mind. ein Fressplatz zur Verfügung stehen, wobei unter bestimmten Bedingungen davon abgewichen werden kann (RINDERHALTUNG, 2007). Die Gestaltung des Fressplatzes ist für die Gesundheit der Tiere und die gesamt aufgenommene Futtermenge ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Damit es rangniederen Kühen möglich ist genügend Grundfutter aufzunehmen und ggf. Leerplätze zu

ranghöheren Tieren zu lassen, sind sogar überzählige Fressplätze von Vorteil. Hochleistungskühe nehmen bei einer *ad libitum* Fütterung ca. 12 mal am Tag für 25 Minuten Grundfutter auf (RINDERHALTUNG, 2007). Als Herdentiere neigen Kühe dazu, ihr Verhalten zu synchronisieren, sobald ihnen die Möglichkeit dazu gegeben wird (BARTH, 2011).

Ob eine qualitativ und quantitativ gute Fütterung als Voraussetzung zum Erhalt der Leistung gegeben ist, kann anhand des Ernährungszustandes des einzelnen Tieres beurteilt werden. Messbar ist dieser z. B. durch den BCS oder die Rückenfettdicke. Das Scoren der Körperkondition der Kühe ist eine subjektive Methode, um die Körperreserven des Einzeltieres qualitativ zu erfassen (EDMONSON et al., 1989). Es wird die Gesundheit der Herde mit der gegebenen Leistung und der verfütterten Ration wiedergespiegelt. Sowohl die starke Überkonditionierung als auch Unterkonditionierung ziehen gesundheitliche Probleme nach sich. Bei zu mageren Tieren sind die Fruchtbarkeit und Milchleistung deutlich herabgesetzt, bei verfetteten Tieren kommt es durch verringerte Futterraufnahme im peripartalen Zeitraum zu einer starken Beanspruchung der Körperreserven, was nach deren Erschöpfung ebenfalls häufig mit Stoffwechsel- und Fruchtbarkeitsstörungen sowie Lahmheiten einhergeht (HEUWIESER und MANSFELD, 1992). Wie bereits erwähnt spielt auch die ausreichende Möglichkeit zu Liegen beim Erhalt der Leistung eine Rolle. Damit alle Tiere gleichzeitig ungestört ruhen können, muss bei Neubauten für jedes Tier mindestens eine Liegebox zur Verfügung stehen (RINDERHALTUNG, 2007). Unabhängig vom Grad der Überbelegung ist ein signifikanter Rückgang des Liegens bei rangniederen Kühen während der Nacht zu beobachten (COOK et al., 2004). Eine Milchkuh versucht 50 - 60 % ihrer täglichen Zeit mit Liegen zu verbringen, was wichtig für die Erholung und den Erhalt ihrer Leistung ist (NUSS und WEIDMANN, 2013).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Studiendesign

Das Projekt wurde der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.3-112-12 angezeigt.

Die Felduntersuchungen wurden als Fall-Kontroll-Studie aufgebaut, um einer möglichen Beziehung zwischen dem Nachweis von *C. botulinum* und dem chronischen Krankheitsgeschehen auf den Höfen nachzugehen. Es haben 31 Betriebe teilgenommen, davon 21 Fall- und 10 Kontrollbetriebe. Die Untersuchungen wurden auf Betriebsebene sowie auf Einzeltierebene durchgeführt. Die Tieranzahl wird in Tab. 3 dargestellt. Die Höfe wurden bayernweit zwischen Februar und November 2013 besucht.

**Tabelle 3: Anzahl der näher untersuchten und beprobten Tiere auf Fall- und Kontrollbetrieben**

Fallbetriebe (n = 21)		Kontrollbetriebe (n = 10)	
Falltiere	Kontrolltiere	Falltiere	Kontrolltiere
93	93	49	49
186		98	
284			

Finanziert wurde das Projekt durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (ehemals Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit) vertreten durch das LGL.

Das Projekt fand in Kooperation mit dem Forschungsprojekt 2810HS005 zum Themenkomplex "Bedeutung von *C. botulinum* bei chronischen Krankheitsgeschehen" (nachfolgend „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ genannt) der Stiftung Tierärztliche Hochschule (TiHo) Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Martina Hoedemaker (Leiterin der Klinik für Rinder) statt. Vom „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ wurden die Falldefinitionen eines verdächtigen Betriebes sowie eines verdächtigen Tieres, größtenteils das Vorgehen auf dem Betrieb, die Fragebögen zur Erfassung der Betriebsdaten und Aufzeichnungen der eigenen Untersuchungen, sowie die Online Datenbank

übernommen.

## **2. Studienbetriebe**

### **2.1. Auswahl der Betriebe für die Studie**

Diesem Projekt vorangegangen war die Dissertation BECHTER (2014) in welcher 104 Milchviehherden betreuende Tierarztpraxen aus Bayern im Rahmen einer Umfrage zum Auftreten von Bestandsproblemen mit möglicher Beteiligung von *Clostridium botulinum* telefonisch interviewt wurden. Wenn die von den Tierärzten benannten Landwirte die Inklusionskriterien unserer Studie (als Fall- oder Kontrollbetrieb) erfüllten und an einer umfangreichen Bestandsanalyse Interesse hatten, wurde ein Bestandsbesuch durchgeführt.

### **2.2. Bewerbung der Projekte**

Die Dissertationsprojekte von M. Bechter (BECHTER, 2014) und das hier beschriebene wurden, verbunden mit einem Aufruf zur Teilnahme an die Tierärzte in Bayern, im bpt Mitteilungsblatt (Ausgabe Nr. 4/2012) des bpt Landesverband Bayern e.V. vorgestellt. Im „Bayerischen Wochenblatt“ (Heft 9 / 2013) wurde ein Artikel mit dem Titel „Clostridien-Studie“ veröffentlicht, worin interessierte Landwirte ebenfalls aufgefordert wurden, sich über ihren Hoftierarzt mit der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München in Verbindung zu setzen. Des Weiteren wurden bei Fortbildungen für Tierärzte Informationsflyer an praktizierende Tierärzte in Bayern verteilt und bei den Bayerischen Tierärztetagen in Rosenheim (09.05.-12.05.2013) stellte Frau Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer das Gesamtprojekt vor und rief ebenfalls zur Teilnahme an den Studien auf.

### **2.3. Inklusionskriterien für Fall- und Kontrollbetriebe sowie Fall- und Kontrolltiere auf den jeweiligen Betrieben**

Um vergleichbare Aussagen möglichst für ganz Deutschland treffen zu können, wurde das Studiendesign unserer Studie, dem des „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ soweit wie möglich angepasst.

Die Untersuchungen fanden sowohl auf Betriebsebene (Fall- und Kontrollbetriebe) als auch auf Einzeltierebene (Fall- und Kontrolltiere) statt, da in fast jedem Betrieb klinisch unauffällige und chronisch kranke Tiere vorkommen.

Die Fallbetriebe mussten - analog zu den Betrieben des „Botulismus-

Verbundprojekt TiHo“ - mindestens drei der folgenden fünf Inklusionskriterien für eine Teilnahme erfüllen: Milchleistungsrückgang der Herde um mehr als 15 % über mindestens drei aufeinanderfolgende Monate, über fünf Prozent Todesfälle oder euthanasierte Kühe in den letzten 12 Monaten, eine Abgangsrate (ohne Verkauf von Zuchttieren) von mehr als 35 % in den letzten 12 Monaten, milchfieberartiges Festliegen bei mehr als 10 % der Milchkühe in den letzten 12 Monaten und eine erhöhte Krankheitsrate allgemein (subjektiver Eindruck des Landwirtes). Kontrollbetriebe durften keines dieser Kriterien erfüllen.

Alle Studienbetriebe mussten in Bayern liegen, seit mindestens 12 Monaten an der monatlichen Milchleistungsprüfung (MLP) des Landeskuratoriums der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e. V. (LKV) teilnehmen und mindestens 20 Milchkühe im Bestand haben.

Die Betriebe wurden je nach Impfstatus in drei Kategorien eingeteilt: Kategorie eins umfasste Fallbetriebe, die nicht gegen *Clostridium* spp. geimpft hatten, Kategorie zwei Fallbetriebe, die nicht gegen *C. botulinum*, aber gegen andere *Clostridium* spp. geimpft hatten und Betriebe der Kategorie drei stellten Kontrollbetriebe dar, die allgemein nicht gegen *Clostridium* spp. geimpft haben durften. Kategorie eins und zwei wurden, außer bei den bakteriologischen Untersuchungen, zusammengefasst, da es nur einen Betrieb in Kategorie zwei gab.

Die Einteilung in Verdachts- und Kontrolltiere ( $n = 10$  % der klinisch auffälligsten (maximal jedoch fünf) Tiere einer Herde und die 10 % der klinisch unauffälligsten (maximal jedoch fünf) Tiere) erfolgte ebenfalls nach genauen Einschlusskriterien.

Die Falltiere mussten die beiden Hauptkriterien erfüllen:

- Habitus chronisch krank
- Abmagerung (BCS von  $< 2,5$  bei Schwarzbunten und Braunvieh Kühen,  $< 3$  bei Fleckvieh Kühen)

Mindestens eines der folgenden beim „chronischen“ oder „viszeralen“ Botulismus (SCHWAGERICK und BÖHNEL, 2001) beschriebenen Symptome musste ebenfalls erfüllt werden, damit eine Kuh als Falltier galt:

- Leistungsminderung im Herdenvergleich (Milchleistungsabfall des

Einzelieres > 20 % im Vergleich zu den anderen Milchkühen im gleichen Laktationsstadium im Stall)

- Lahmheit mit einem Lahmheitsscore  $\geq 3$
- Vorliegen einer Parese, einer Paralyse oder einer Ataxie
- Durchfall oder Verstopfung
- Verhaltensänderung (träge), Gehschwäche
- Sensorische Störung (reduzierter Lidreflex, reduzierter Ohrabwehrreflex, herabgesetzte Hautreflexe)
- Dyspnoe
- Kreislaufinsuffizienz (positiver Venenpuls)
- Bulbärparalyse oder / -parese
- Klauenrehe
- Aufgezogener Bauch

Um als Kontrolltier in die Studie einzugehen, durfte keines der oben genannten Symptome vorliegen und der Locomotion score musste eins betragen.

Vor dem Besuch beim Landwirt wurde eine Liste aller Milchkühe erstellt, in welcher die Milchleistung der einzelnen Kuh im Vergleich zu den anderen Kühen im gleichen Laktationsstadium und Laktationsnummer geprüft wurde. Die Grenzwerte für die Milchinhaltsstoffe sowie Milchzellzahl wurden DE KRUIF et al. (2013) entnommen.

### 3. Fragebögen

Die Fragebögen zur Erfassung der Betriebsdaten und Aufzeichnungen der eigenen Untersuchungen wurden vom „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ (Forschungsprojekt 2810HS005: "Bedeutung von *C. botulinum* bei chronischen Krankheitsgeschehen") übernommen. Eigens verfasst wurden die abweichenden Fragebögen bezüglich der Anbindehaltung (s. Anhang), welche im „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ nicht berücksichtigt wurde. Beim einmaligen Bestandsbesuch wurden mit dem Betriebsleiter standardisiert die Fragebögen „Betrieb“, „Standort“, „Stall“, „Melkanlage“ oder „Melkroboter“, „Abteil“,

„Laktationsgruppe“ und „Silage“ durchgearbeitet.

#### **4. Ablauf der Bestandsbesuche und hierbei verwendete Herdenindices**

Alle Bestandsbesuche wurden von der zuständigen Doktorandin des Projektes, einem/r weiteren Doktorand/in der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung und meistens ein bis zwei Studierenden durchgeführt.

Es fand eine kurze Betriebsbegehung mit Erstellung einer Skizze zur Lage der Gebäude auf dem Hof sowie der Abteile im Stall statt. Danach wurden bei allen Milchkühen („Abteil Bonitierung“) die Herdenindices (s. u.) ermittelt und in diesem Rahmen potentielle Fall- und Kontrolltiere ausgewählt und mit Viehmarker gekennzeichnet. Anschließend wurden die Untersuchungsbögen „eigene Untersuchung im Abteil“ und „Probenahme / Sensorik Silage“ ausgefüllt, wobei u. a. das Haltungssystem (inklusive Vermessung von vier Boxen in jedem Abteil) und visuell die Stallhygiene beurteilt wurden. Die verwendeten Richtwerte für die Boxenmaße im Laufstall stammten größtenteils von DE KRUIF et al. (2013), die Maße für den Kopfraum von KNIERIM und WINCKLER (2002), wobei die Werte von unserer Studie modifiziert wurden. Für den wandständigen Kopfraum wurde der Wert  $\geq 88$  cm und für den gegenständigen Kopfraum  $\geq 50$  cm verwendet.

Die gewählten Richtwerte für die Wasserversorgung durch Trogränken stammen aus den Planungshilfen für den Rinderstallbau mit Anforderungen, Funktionsmaßen und Empfehlungen von Aulendorf (EILERS, Stand 25.04.2013) sowie den Tierschutzleitlinien für Milchkuhhaltung (RINDERHALTUNG, 2007), die Werte für Schalenränken wurden von unserer Studie nach den oben genannten Quellen modifiziert. Für die Trogränke wurden Werte von 10 cm / Tier und für die Schalenränken 10 Tiere / Tränke verwendet. Für die Kontrolle auf Überbelegung wurde ein Tier-Fressplatzverhältnis von 1:1 (DE KRUIF et al., 2013) und ein Tier-Liegeplatzverhältnis, welches mit 1:1 akzeptabel ist (KNIERIM und WINCKLER, 2002; RINDERHALTUNG, 2007), festgelegt.

Von allen Milchkühen wurden die Ohrmarken- oder Transpondernummern erfasst und die Körperkondition (BCS) nach dem Score von EDMONSON et al. (1989) bestimmt. Die Tiere wurden anhand der Beurteilungsskala von 1 (sehr mager) bis 5 (sehr fett) mit Zwischenschritten von 0,25 beurteilt und unter Berücksichtigung

der Rasse und des Laktationsstadiums in unter-, normal- und überkonditioniert eingeteilt (HEUWIESER und MANSFELD, 1992). Als weiterer Index wurde bei allen Kühen im Laufstall der Bewegungsscore (Locomotion Score) nach SPRECHER et al. (1997) mit der Scala von 1 (nicht lahm) bis 5 (hochgradig lahm) anhand des Gangbildes und der Rückenlinie erhoben. Die Zielwerte der einzelnen Lahmheitsstadien wurden der Quelle von DE KRUIF et al. (2013) entnommen. In der Anbindehaltung wurde der Locomotion Score durch die Parameter „Trippeln und / oder Entlastung“ (ja / nein) ersetzt. Zusätzlich wurde von jeder Kuh der Habitus vermerkt. Auf einer Scala von 1 (unauffällig) bis 5 (Hautverletzung, Entzündung, Schwellung, mit zusätzlicher Gelenkbeteiligung) wurden an einer festgelegten Anzahl Kühe (Herdengröße 25 – Stichprobenanzahl 17; Herdengröße 50 – Stichprobenanzahl 22; Herdengröße 100 – Stichprobenanzahl 25; Herdengröße > 100 – Stichprobenanzahl 25 % der Herde) die hervorstehenden Knochenpunkte unter Berücksichtigung von Hautveränderungen und entzündlichen Prozessen an den Knie-, Sprung- und Karpalgelenken sowie den Hüfthockern, Rücken, Nacken und seitlicher Bauchwand beurteilt (REUBOLD, 2003). Die Scores 1 - 3 sollten > 90 % und die Scores 4 - 5 < 10 % betragen (DE KRUIF et al., 2007). Der Hygienescore wurde anhand des Verschmutzungsgrades von Euter, Beinen und Flanke nach COOK und REINEMANN (2007) bewertet. Die Scala reichte von 1 (sehr sauber) bis 4 (sehr schmutzig), wobei die Referenzwerte für Score 3 + 4 ebenfalls von COOK und REINEMANN (2007) stammten.

Die vorselektierten Kühe wurden nochmals auf ihre Symptome hin überprüft und in einer Rangliste geordnet. Daraus wurde die vorgegebene Anzahl an Fall- und Kontrolltieren ausgewählt und klinisch, einschließlich einer ausführlichen neurologischen Untersuchung, standardisiert untersucht. Für jede der vier bis zehn Milchkühe wurde der Untersuchungsbogen „Einzeltierbogen“ ausgefüllt. Im Weiteren wurden von diesen Tieren Blut-, Pansensaft- und Kotproben entnommen. Am Ende jedes Bestandsbesuches wurde der Bogen „Eindruck Betrieb“ ausgefüllt. Nach den betriebsindividuellen Auswertungen wurden v. a. die auffälligen Ergebnisse (Herdenscoring, Abteilmwertung, MLP Daten, Einzeltieruntersuchungen) in einem Bericht für den Landwirt und den zuständigen Hoftierarzt zusammengefasst und einzelne kurze Empfehlungen vermerkt (Beispiel s. Anhang).

## 5. Probenentnahme

Alle Proben wurden am Tag des Bestandsbesuches entnommen und bis zum Zeitpunkt der Untersuchung bei sieben °C im Kühlschrank gelagert. Die Aufbereitung der Proben für die bakteriologische, parasitologische sowie hämatologische und blutchemische Untersuchung fand zeitnah nach dem Bestandsbesuch statt und war spätestens am fünften Tag nach der Entnahme abgeschlossen. Zur weiteren Untersuchung auf *C. botulinum* am RKI wurden Anteile aller Proben bei minus 20 °C asserviert.

### Kot

Der Kot wurde mit einem Rektalhandschuh aus dem Rektum der Kuh entnommen und in Urinbechern (125 ml, Fa. AMPri GmbH, Stelle) aufbewahrt.

### Blut

Das Blut wurde mit einer Einmalkanüle (18 G x 1 ½, Fa. BD Microlance, Heidelberg), wenn möglich, aus der Schwanzvene (*Vena caudalis mediana*) entnommen. In den übrigen Fällen wurde das Blut mit einer Einmalkanüle (14 G x 2 ½ (2,1 mm x 60 mm, Fa. Kruuse, Dänemark) aus der äußeren Drosselvene (*Vena jugularis externa*) entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten wie von DIRKSEN et al. (1990) beschrieben. Es wurden jeweils zwei Serumröhrchen (Monovette 9 mL, Fa. SarstedtAG, Nümbrecht), ein EDTA Röhrchen (2 ml 55x12mm, Fa. Sarstedt AG, Nümbrecht) und ein Blutgasröhrchen (Monovette 2 ml LH, Sarstedt AG, Nümbrecht) befüllt. Die Lagerung bis zur Verarbeitung fand bei sieben °C statt. Das Serumröhrchen wurde mit dem Rotixa 50 RS (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) zentrifugiert (3363 x g, 10 min) und anschließend abpipetiert.

Die hämatologische und blutchemische Untersuchung fand im eigenen Labor der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München statt.

### Pansensaft

Der Pansensaft wurde mit dem RUMINATOR (Pansensaft-Entnahme-Gerät nach Prof. Dr. Geishauser, FaVuxx, Guelph) entnommen und ebenfalls in Urinbechern (125 ml, AMPri GmbH, Stelle) aufbewahrt. Nach der Gewinnung wurde

umgehend eine Messung des Pansen-pH Werts (pH- Messgerät-Set testo 206-pH2, Testo AG, Lenzkirch) vorgenommen.

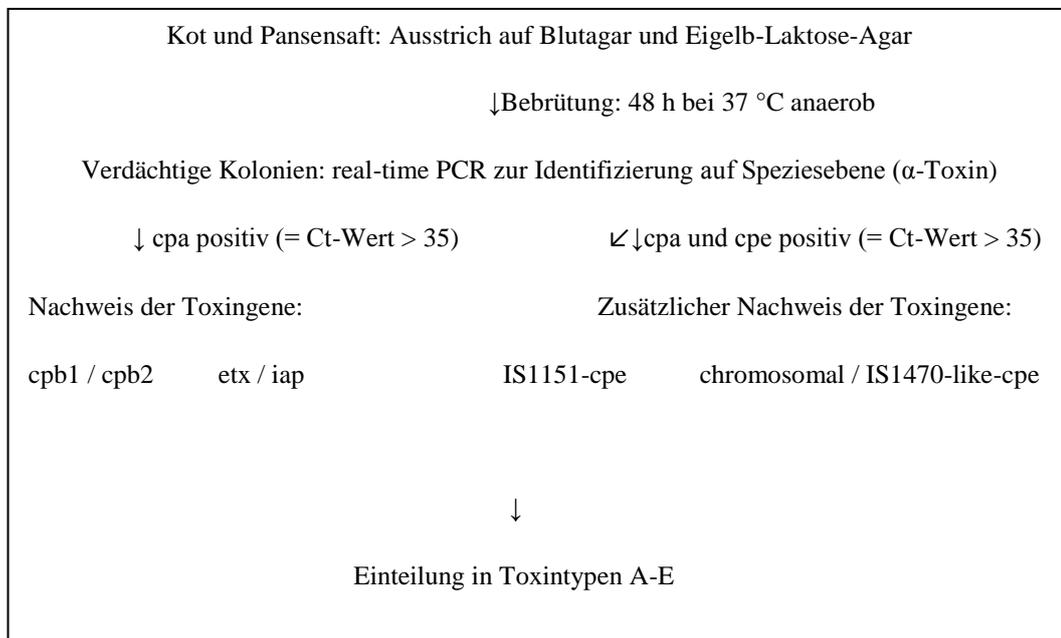
## 6. Beurteilung der Silagen

Die Qualität der offenen Mais- und Grassilagen (einzeln oder als Sandwichsilage) wurde wie folgt klassifiziert: Wenn mindestens zwei der vier Kriterien Farbveränderung, Schimmelbefall, Fäulnis, Erdbeimengungen mindestens mit geringgradig verändert beurteilt wurden, wurde die Silage als „schlecht“ beurteilt. Damit ein Betrieb den Status „schlechte Silagequalität“ bekam, musste mindestens eine der beurteilten Silagen mit „schlecht“ beurteilt worden sein.

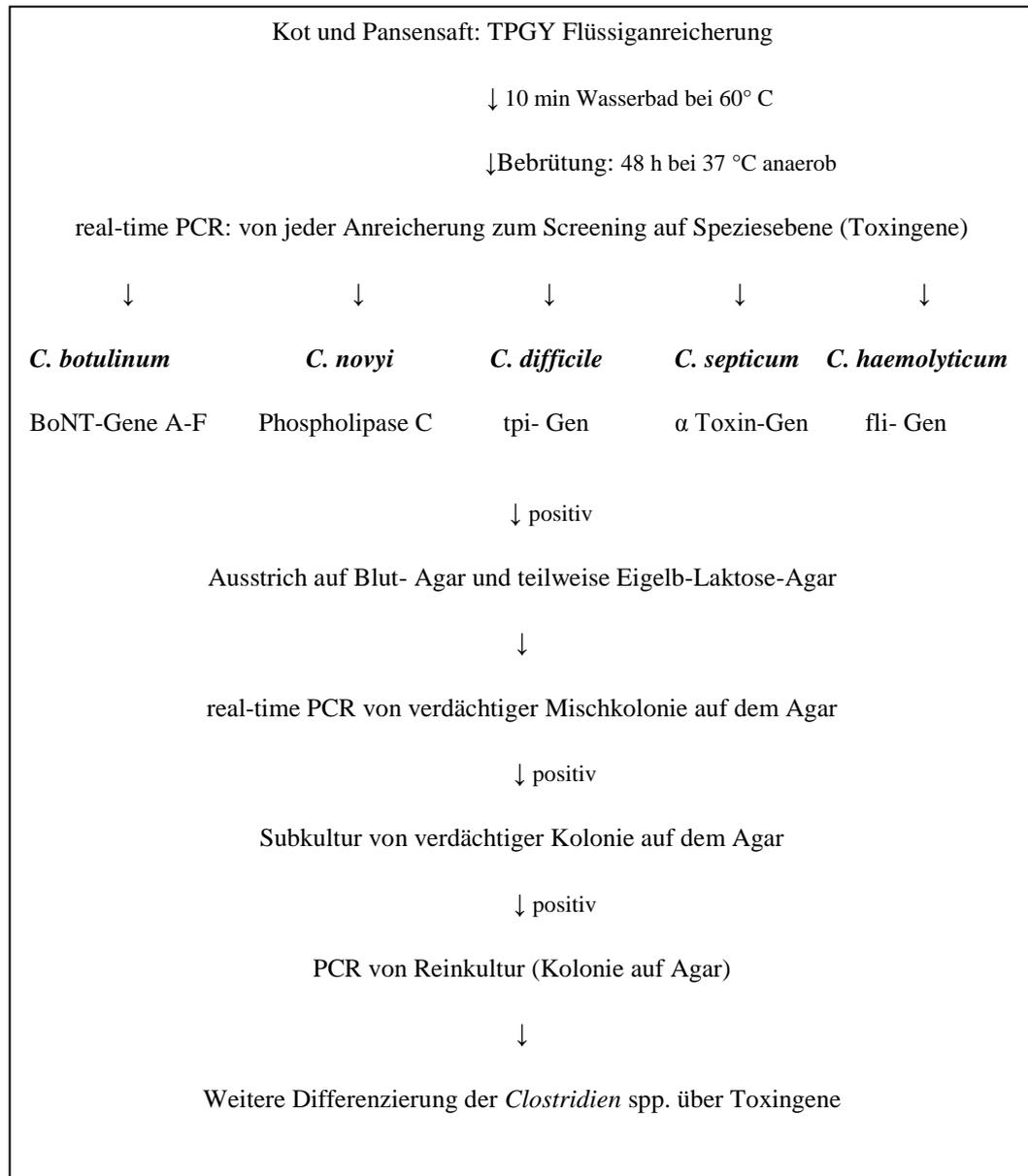
## 7. Clostridiendiagnostik

In Abbildung eins und zwei werden die Nachweis-Verfahren der einzelnen Clostridien Spezies schematisch dargestellt, welche in dieser Studie untersucht wurden.

### Abbildung 1: Nachweis von *C. perfringens* (Screening und klassisches kulturelles Verfahren)



**Abbildung 2: Nachweis von *C. botulinum*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. difficile* und *C. septicum* (Screening und klassisches kulturelles Verfahren)**



Die Diagnostik wurde im Labor für Lebensmittelmikrobiologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim durchgeführt (s. Kap. 7.1 und 7.2).

Nachuntersuchungen von positiven real-time PCR Ergebnissen des LGLs erfolgten zeitnah am Robert-Koch-Institut (RKI). Die Proben wurden nochmals auf *C. botulinum* bzw. BoNT, wie nachfolgend beschrieben, untersucht:

1. Diagnostischer Nachweis im Tier: Serum auf BoNT untersucht (Maus-Bioassay)
2. Kot- und Pansensaftproben nach anaerober Kultivierung in

Kochfleischmedium (CMM) mittels real-time PCR auf *C. botulinum* untersucht

3. nach anaerober Anzucht ausgewählte Kolonien, die morphologisch auf Clostridien hindeuteten, isoliert und ebenfalls auf BoNT Gene bzw. *C. botulinum* untersucht. Die Typisierung der Isolate erfolgte anhand der 16S rRNA Sequenz

Nach Versuchsende wurden im nächsten Schritt sämtliche Proben nochmals am RKI ohne vorherige Kultivierung mittels eines in-house entwickelten Sandwich-ELISAs auf die BoNTe A, B, C, D, E und F untersucht sowie mit dem MALDI-TOF Verfahren getestet. Die Ergebnisse stehen noch aus und sind daher nicht Teil dieser Studie.

## **7.1. Anzuchtung**

### **Selektivmedien zur Anzucht von Clostridien Spezies**

#### **Eigelb-Laktose-Agar**

Für die semiquantitative Bestimmung der *Clostridium* spp., insbesondere *C. botulinum*, *C. perfringens* und *C. septicum*, wurden die Kot- und Pansensaftproben mit dem „Drei-Ösenausstrich“ auf Eigelb-Laktose-Agar (Heipha DIAGNOSTIKA, Eppelheim) ausgestrichen und 48 Stunden bei 37 °C anaerob bebrütet. Danach wurden die Kulturen hinsichtlich des Wachstums von Clostridien verdächtigen Bakterien beurteilt.

#### **TPGY Flüssiganreicherung**

Die TPGY Flüssiganreicherung wurde unter sterilen Bedingungen in der Nährbodenküche des LGL Oberschleißheim hergestellt (Rezeptur s. Anhang). Zu den 90 mL Anreicherung wurden 10 g Kot- bzw. Pansensaftproben zugegeben und zur Sporenaktivierung für 10 min bei 60 °C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde die Flüssiganreicherung 48 Stunden bei 37 °C anaerob bebrütet. Bei einem positiven Ergebnis in der real-time PCR folgte eine kulturelle Anzuchtung des Erregers zur Isolatgewinnung.

#### **Anzuchtung von physiologischen Darm- und Pansenbakterien**

Sämtliche im Folgenden beschriebene Agarmedien wurden unter sterilen, standardisierten Bedingungen in der Nährbodenküche des LGL Oberschleißheim

hergestellt (Rezepturen s. Anhang). Das Ausstreichen der Proben zur semiquantitativen Bestimmung der Keime (Kontaktplattenverfahren) fand im Labor für Veterinärbakteriologie des LGL Oberschleißheim statt. Sowohl Kot- als auch Pansensaftproben wurden auf Blutagar ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C aerob und anaerob bebrütet. Anschließend wurde jeweils die mesophile Gesamtflora bestimmt.

Mithilfe des Ausstriches auf Gassner-Agar, der ebenfalls für 24 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet wurde, fand die Bestimmung der coliformen Keime, v. a. *E. coli* im Kot statt.

Zur Bestimmung der Enterokokkenflora wurden die Kotproben auf Slanetz-Bartley-Agar ausgestrichen und für 48 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet.

Die Laktobazillenflora im Kot wurde nach dem Ausstreichen und 48 - stündigem anaerobem Bebrüten bei 25 °C auf MRS-Agar bestimmt.

## **7.2. Molekularbiologischer Nachweis mittels real-time PCR**

### **DNA-Extraktion**

Um die DNA von *C. perfringens* zu extrahieren, wurden die Bakterienzellen thermisch lysiert. Hierfür wurde Koloniematerial (max. eine ganze Einzelkolonie) vom Eigelb-Laktose Agar abgenommen und in 300 µl 0,1 x TE Puffer suspendiert. Anschließend fand bei 95 °C 15 Minuten lang eine Erhitzung im Thermomixer (Mischfrequenz 700 rpm / min) statt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Suspension abzentrifugiert (14. 000 x g, 1 min) und vom Überstand 5 µl als Template für die real-time PCR verwendet.

Für die restlichen untersuchten *Clostridium* spp. wurde das QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet und die DNA-Extraktion automatisiert mit dem QIAcube (QIAGEN GmbH, Hilden) durchgeführt. Dieses Kit stellt aufgrund sicherer Handhabung den Standard für die Isolierung der DNA aus Kotproben menschlichen und tierischen Ursprungs dar (DRIDI et al., 2009). Es wurde jeweils ein ml Kot- oder Pansensaftanreicherung verwendet. Die Schritte lassen sich in Lyse des Materials im ASL Puffer, Adsorption der Verunreinigungen durch die Inhibit EX Matrix und anschließende Reinigung der DNA mithilfe von QIAamp Mini Spin Säulen unterteilen.

### Gemeinsame Schritte der verwendeten real-time PCRs

Die Methoden der real-time PCR sowie die Ansätze, Primer und Sonden wurden basierend auf den Methoden nach ZIEGLER (2013) am LGL Oberschleißheim durchgeführt.

Um einen Hemmeffekt auszuschließen, wurde im ersten Lauf der real-time PCRs jeweils eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) eingesetzt. Diese basierte auf dem pUC 19 Plasmid (s. Anhang). Des Weiteren wurde bei jedem Lauf eine Positivkontrolle (extrahierte Clostridien-DNA) und eine Negativkontrolle (DNA freies Wasser) verwendet und die Ergebnisse nur nach erfolgreich bestätigtem Lauf gewertet.

Alle Komponenten wurden zusammengefügt und im Doppelansatz in eine 96-Wellplatte pipettiert. Nach der Zentrifugation (10000 x g, 1 min) folgte die Amplifikation im real-time Cycler (Mx3000P oder Mx3005P) und die Auswertung der Fluoreszenzsignale mit gerätespezifischer Software (MxPro ET QPCR Software, Agilent Technologies, USA). Bei allen real-time PCRs wurde mit einem Two-Step Temperatur-Zeit-Profil gearbeitet (Tab. 4) und TaqMan-Sonden verwendet. Es wurden 45 Zyklen durchgeführt. Bei einem Ct-Wert > 35 (PCR Zyklus, bei welchem die Fluoreszenzintensität über den Schwellenwert tritt), wurde das Ergebnis als positiv gewertet.

**Tabelle 4: Two-Step Temperatur-Zeit-Profil**

Prozess	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierungsschritt	95 °C	15 sec
Anlagerung und Synthese	55 °C	60 sec

### Real-time PCR zum Nachweis von *C. botulinum* ((MESSELHÄUSSER, ZUCKER, ZIEGLER et al., 2007) und in-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)

Zum Nachweis der BoNT-Gene BoNT A, BoNT B, BoNT E und BoNT F wurde ein Pentaplex-PCR System und zum Nachweis der BoNT-Gene BoNT C und BoNT D ein Duplex-PCR-System verwendet. Die jeweiligen Sequenzen der Primer und Sonden sowie die Komponenten für den Pentaplex- und Duplex Ansatz sind im Anhang aufgeführt.

**Real-time PCR zum Nachweis von *C. perfringens* nach MESSELHÄUSER, ZUCKER, ELMER-ENGLHARD et al. (2007)**

Mithilfe eines Triplex-PCR Systems wurde *C. perfringens* anhand des speziesspezifischen  $\alpha$ -Toxins (*cpa*-Gen), auf Speziesebene identifiziert. Dieser Dreifachansatz wies die Toxingene *cpa* und *cpe* nach und beinhaltete zusätzlich die IAC. Die Komponenten für diesen Ansatz sind ebenfalls im Anhang aufgeführt.

Wenn der Speziesnachweis gelang, wurden zwei weitere Duplex-PCR-Systeme genutzt, um die Toxingene *cpb1* und *cpb2*, sowie *etx* und *iap* nachzuweisen. Dies ermöglichte die Typisierung von *C. perfringens* anhand der Toxingene *cpa*, *cpe*, *cpb1*, *cpb2*, *etx* und *iap* in die Toxintypen A bis E. Die Komponenten für den Duplex-Ansatz sind im Anhang aufgeführt.

Wenn der Nachweis des Toxins *cpe* gelang, wurden zur weiteren Differenzierung des Gens eine einfache real-time PCR zum Nachweis von *IS1151-cpe* und ein weiteres Duplex-PCR-System zum Nachweis der Genotypen *chromosomal* und *IS1470-like-cpe* angewandt. Im Anhang finden sich die Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis der *C. perfringens*-Toxingene.

**Real-time PCR zum Nachweis von *C. novyi* (in-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)**

Zum Nachweis der speziesspezifischen Phospholipase C und des *C. novyi*  $\alpha$ -Toxins wurde ein Triplex-PCR System angewandt. Im Anhang sind die Sequenzen der Primer und Sonden sowie der Triplex-Ansatz für den Nachweis der *C. novyi*-Gene gelistet.

**Real-time PCR zum Nachweis von *C. difficile*, *C. septicum* und *C. haemolyticum* (in-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)**

Zum Nachweis der *Clostridium* spp. wurde ein Quadriplex-PCR System angewandt. Im Anhang sind die Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis verschiedener speziesspezifischer Clostridien-Gene, sowie die Komponenten des Ansatzes gelistet.

## 8. Blutparameter

### Hämatologie

Bei jedem Versuchstier wurde der Glutartest durchgeführt. Hierzu wurden die gleichen Volumina EDTA-Blut und Testflüssigkeit (1ml) (Rezeptur s. Anhang) in einem Röhrchen durch Schwenken gründlich vermischt und die Reaktion minütlich überprüft. Der Test wurde beendet, sobald eine Gelbildung erkennbar war, spätestens jedoch nach 15 Minuten.

Der Hämoglobingehalt im Blut wurde mithilfe des Hämatologie-Systems pocH-100iV (Sysmex GmbH, Norderstedt) gemessen. Dazu wurde das Reagenz pocH-pack LVD zum Blut zugegeben, die Erythrozyten somit lysiert und die Absorption des roten Pigments (Hämoglobin) photometrisch gemessen.

### Blutchemie

Die Gesamtproteinkonzentration wurde bei jeder Kuh mit der Standardmethode, der sogenannten Biuret-Reaktion, analysiert. Zur Durchführung und photometrischen Messung wurde der Cobas c 311 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Schweiz) genutzt.

Die Selenversorgung der Tiere wurde indirekt durch die Bestimmung der Aktivität des Enzyms Glutathionperoxidase (GPX) in den Erythrozyten abgeschätzt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 41) mit 2000 µl Diluent und 50 µl Probe hergestellt und die Extinktion (Enzym) mit dem Cobas c 311 Analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Schweiz) gemessen. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde der gemessene Wert durch den bereits ermittelten Hämoglobingehalt geteilt.

## 9. Parasitologische Untersuchung

Um Magen-Darm-Würmer (*Strongylidae*, *Trichostrongylidae*, *Nematodirus*, *Strongyloides*, *Trichuris*, *Capillaria* und *Ascarididae*), Kokzidien (*Eimeria* und *Cystoisospora*), Bandwürmer (*Taeniidae*, *Moniezia*, *Anoplocephala*), Egel (*Fasciola*, *Dicrocoelium*, *Paramphistomum*) und *Giardia*-Zysten im Kot von Rindern nachzuweisen, wurde die Flotationsmethode gemäß QSA-O-0521-02 des LGL Oberschleißheim angewandt. Zu diesem Zweck wurde eine walnussgroße Kotmenge mit 10 ml Kaliumazetat-Lösung (Mischverhältnis siehe Anhang; auf

eine Dichte von  $S = 1,35$  eingestellt) zu einer Suspension vermischt, homogenisiert und für fünf Minuten bei  $900 \times g$  zentrifugiert. Dabei lag ein Deckgläschen auf dem Röhrchen. Da die Parasiteneier, Protozoenoozysten und -sporozysten leichter als die Flüssigkeit waren, sammelten sie sich an der Oberfläche und konnten so mithilfe eines Lichtmikroskops direkt auf dem Deckgläschen beurteilt werden.

## 10. Datenerfassung und statistische Auswertung

Die gesammelten Daten wurden in die Online Datenbank des „Botulismus-Verbundprojekts TiHo“ eingegeben, als Microsoft Office Excel 2007 Tabellen exportiert und in SPSS (Version 21, IBM, USA) deskriptiv und mithilfe von „weiterführenden“ Tests ausgewertet.

Die Auswertung geschah einerseits durch die Gegenüberstellung von Ergebnissen aus Fall- und Kontrollbetrieben, bei den mikrobiologischen Untersuchungen auch Fall- und Kontrolltieren. Die Laborparameter (Glutartest, Gesamteiweiß, Hämoglobin und Glutathionperoxidase-Aktivität) wurden eruiert und mit klinikinternen Grenzwerten verglichen. Daten wurden visuell mittels Boxplots oder Histogrammen auf Normalverteilung überprüft. Für nicht-normalverteilte Daten wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Unterschiede in kontinuierlichen Daten zwischen Fall- und Kontrollbetrieben wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Kategorische Daten wurden mittels Häufigkeitsverteilung und Chi-Quadrat-Test verglichen. Für normalverteilte Daten wurde der T-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von  $< 0,05$  gewertet.

In den Auswertungen wurden je nachdem Median (MD), 1. Quartil (Q 1) und 3. Quartil (Q 3) oder Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben.

Für die Auswertung der Energiebilanz über die Milch wurde je Betrieb monatlich (letzten 12 Monate vor Bestandsbesuch) auf Herdenebene mithilfe der MLP-Daten ein Schnittpunkt des Fett- / Eiweiß-Quotienten mit einer Geraden bei 35 kg Milch mittels Bovi-Concept-FW (Metzner-Software; Weichs) berechnet und anschließend pro Betrieb (aus 12 Werten) ein arithmetischer Mittelwert errechnet. Die weitere Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

Die Abhängigkeit der Milchmenge (in kg) von den Parametern Fall-

---

Kontrollbetrieb, Haltungsform, Laktationsnummer und Tage in Milch, wurde zusätzlich mittels eines gemischten Modells mit SAS (Proc Mixed) überprüft (Version 9.4, SAS Institute Inc., USA), wobei für wiederholte Messungen innerhalb eines Tieres korrigiert wurde und der Betrieb als zufällige Variable aufgenommen wurde.

## IV. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden 1099 Kühe auf Fallbetrieben und 621 Kühe auf Kontrollbetrieben in die Studienuntersuchungen einbezogen.

### 1. Inklusionskriterien

Mindestens drei der fünf Inklusionskriterien (Tab. 5) mussten erfüllt werden, um in die Kategorie Fallbetrieb aufgenommen zu werden. Die Kriterien „hohe Todesrate“ (90,5 %) und „milchfieberartiges Festliegen“ (85,7 %) kamen in den Kombinationen am häufigsten vor, darauf folgte eine „hohe Abgangsrate“ (80,9 %), eine „erhöhte Krankheitsrate allgemein“ (76,2 %) und am seltensten trat ein „Milchleistungsabfall“ (14,3 %) auf.

**Tabelle 5: Häufigkeit der Kombinationen für die erfüllten Inklusionskriterien der Fallbetriebe**

Kombination der Inklusionskriterien	Fallbetriebe (n = 21)	Prozent
2 – 4 – 5	3	14,3 %
2 – 3 – 4 – 5	6	28,6 %
3 – 4 – 5	2	9,5 %
1 – 2 – 3 – 4 – 5	2	9,5 %
1 – 2 – 4	1	4,8 %
2 – 3 – 5	3	14,3 %
2 - 3 – 4	4	19,0 %

- 1) Milchleistungsrückgang der Herde um mehr als 15 % über mindestens drei aufeinanderfolgende Monate
- 2) > 5 % Todesfälle oder euthanasierte Kühe in den letzten 12 Monaten
- 3) Abgangsrate (ohne Verkauf von Zuchttieren) von mehr als 35 % in den letzten 12 Monaten
- 4) Milchfieberartiges Festliegen bei mehr als 10 % der Milchkühe in den letzten 12 Monaten
- 5) erhöhte Krankheitsrate allgemein (subjektiver Eindruck des Landwirtes)

Um als Falltier kategorisiert worden zu sein, musste zusätzlich zu den Hauptkriterien „Abmagerung“ und „Habitus chronisch krank“ ein weiteres der unter III 2.3. aufgeführten Kriterien erfüllt werden. Am häufigsten wurde sowohl in Fall- als auch in Kontrollbetrieben bei Verdachtstieren das Zusatzkriterium „höhergradige Lahmheit“ gefunden (Tab. 6).

**Tabelle 6: Häufigkeit der bei der Selektion der Falltiere gefundenen zusätzlichen Symptome (Mehrfachnennungen möglich)**

<b>Zusatzkriterium</b>	<b>Fallbetriebe</b> (n = 21; 93 Falltiere)	<b>Kontrollbetriebe</b> (n = 10; 49 Falltiere)
Leistungsminderung im Herdenvergleich	32 (25,6 %)	14 (21,2 %)
Höhergrd. Lahmheit ( $\geq 3$ )	66 (52,8 %)	39 (59,1 %)
Paresen/ Paralysen/ Ataxien	1 (0,8 %)	0
Durchfall/ Verstopfung	2 (1,6 %)	1 (1,5 %)
Verhaltensänderung	4 (3,2 %)	0
Sensorische Störung	0	0
Dyspnoe	2 (1,6 %)	2 (3,0 %)
Kreislaufinsuffizienz	0	0
Bulbärparalyse	0	0
Klauenrehe	4 (3,2 %)	4 (6,1 %)
Aufzogener Bauch	14 (11,2 %)	6 (9,1 %)

## **2. Betriebsstruktur und Kennzahlen**

### **2.1. Haltung der Kühe und Bewirtschaftung landwirtschaftl. Nutzflächen**

Sowohl in Fall- als auch in Kontrollbetrieben wurden meistens Fleckvieh Kühe gehalten. Knapp ein Drittel der Landwirte hielten ihre Kühe in Anbindehaltung (Tab. 7).

**Tabelle 7: Verteilung der Kuhrasen nach Haltungssystem in den 31 Milchviehbetrieben**

Rasse	Fallbetriebe				Kontrollbetriebe			
	Anbindehaltung (n = 7)		Laufstall (n = 14)		Anbindehaltung (n = 2)		Laufstall (n = 8)	
	Anzahl Betriebe	%	Anzahl Betriebe	%	Anzahl Betriebe	%	Anzahl Betriebe	%
Fleckvieh	6	85,7	10	71,4	2	100	5	62,5
Fleckvieh + Kreuzungen	1	14,3	1	7,1	0	0	2	25,0
HF	0	0	2	14,3	0	0	0	0
Schwarzbunt + Rotbunt oder Braunvieh	0	0	1	7,1	0	0	1	12,5
p = 0,604 (Chi-Quadrat Test)								
<b>Haltungs- system</b>	33,3 %		66,7 %		20 %		80 %	
p = 0,445 (Chi-Quadrat Test)								

Über die Hälfte der Fallbetriebe hatten Tiefboxen, wohingegen  $\frac{3}{4}$  der Kontrollbetriebe Hochboxen in ihren Ställen eingebaut hatten (Tab. 8).

Alle Betriebe wurden unabhängig von der Haltungsform der Kühe konventionell bewirtschaftet.

**Tabelle 8: Boxenarten in Laufställen**

Boxenart je Betrieb	Fallbetriebe (n = 14)	Kontrollbetriebe (n = 8)
Hochbox	35,7 %	75 %
Tiefbox	57,1 %	25 %
Durchgehende Strohfäche	7,1 %	0 %
p = 0,192 (Chi-Quadrat Test)		

Die durchschnittliche Herdengröße lag in den Fallbetrieben etwas tiefer als in den Kontrollbetrieben und die Betriebe mit Anbindehaltung hielten ca. halb so viele Kühe wie in den Laufstallbetrieben (Tab. 9).

**Tabelle 9: Mittlere Herdengrößen (laktierende und trockenstehende Kühe)**

Haltungsform	Fallbetriebe (n = 21)	Kontrollbetriebe (n = 10)	p-Wert Mann-Whitney-U- Test
Anbindehaltung	34,0 Kühe	37,5 Kühe	0,376
Laufstall	67,6 Kühe	70,8 Kühe	0,374

Das Durchschnittsalter lag in Fallbetrieben geringgradig höher als in den Kontrollbetrieben (Tab. 10). Bei Kühen in Anbindehaltung belief es sich auf fünf, im Laufstall auf 4,7 Jahre.

**Tabelle 10: Mittleres Alter der laktierenden Kühe**

Durchschnittliches Alter der Kühe	Fallbetriebe (n = 21)	Kontrollbetriebe (n = 10)	p-Wert Mann-Whitney-U- Test
	4,9 Jahre	4,6 Jahre	0,167

Auf Fall- und Kontrollbetrieben wurden pro Abteil jeweils vier Boxen vermessen (2 wandständige; 2 gegenständige). Der arithmetische Mittelwert dieser vier Ausmessungen ergab einen Wert für jedes Maß eines Abteils. Die einzelnen Parameter hatten bei den Fallbetrieben größtenteils etwas höhere Werte als bei den Kontrollbetrieben, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (Tab.11).

Die Boxenmaße sowohl für Fall- als auch für Kontrollbetriebe lagen größtenteils unterhalb der verwendeten Referenzwerte, es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollbetrieben. (Tab 12).

**Tabelle 11: Boxenmaße in den Abteilen der Laufstall-Betriebe**

Boxenmaße in cm	Fallbetriebe (n = 14 mit 30 Abteilen)			Kontrollbetriebe (n = 8 mit 17 Abteilen)			p -Wert Mann-Whitney-U Test
	MD	Q 1	Q 3	MD	Q 1	Q 3	
Länge der Liegefläche	192,0	186,8	197,5	189,8	184,8	195,3	0,466
Boxenlänge (inkl. Kopfraum) wandständig	253,0	245,0	269,0	248,0	234,8	259,0	0,140
Boxenlänge (inkl. Kopfraum) gegenständig	248,8	233,5	275,1	237,5	209,5	269,3	0,157
Länge der Kopffreiheit wandständig	66,5	54,6	76,9	60,0	50,0	68,0	0,364
Länge der Kopffreiheit gegenständig	58,0	45,3	85,0	72,5	26,8	77,0	0,755
Boxenbreite	126,0	116,8	130,0	119,0	115,0	127,0	0,147
Nackenriegelhöhe	117,5	107,5	128,0	124,0	114,0	134,5	0,186
Bugbretthöhe	18,5	14,0	24,3	25,0	19,3	32,0	0,062
Schräge Länge des Nackenriegels	203,0	193,0	211,3	201,5	195,8	220,0	0,588
Kotkantenhöhe	29,5	20,8	33,0	22,6	17,5	25,0	0,063

**Tabelle 12: Vergleich der erhobenen Boxenmaße im Laufstall mit Referenzwerten aus der Literatur**

Boxenmaße in cm	Referenzwerte in cm	Fallbetriebe (n = 14 mit 30 Abteilen)			Kontrollbetriebe (n = 8 mit 17 Abteilen)			p -Wert Chi-Quadrat-Test
		Unterhalb des Referenzwertes in %	Im Bereich des Referenzwertes in %	Oberhalb des Referenzwertes in %	Unterhalb des Referenzwertes in %	Im Bereich des Referenzwertes in %	Oberhalb des Referenzwertes in %	
Liegefläche <sup>2)</sup>	180-190	34,2	23,7	42,1	26,3	36,8	36,8	0,572
Boxenlänge wandständig <sup>2)</sup>	260-280	68,4	28,9	2,6	84,2	10,5	5,3	0,278
Boxenlänge gegenständig <sup>2)</sup>	230-240	57,9	7,9	34,2	73,7	10,5	15,8	0,345
Kopffreiheit wandständig <sup>1)</sup>	≥ 88	94,7	5,3		94,7	5,3		1,000
Kopffreiheit gegenständig <sup>1)</sup>	≥ 50	68,4	31,6		63,2	36,8		0,691
Boxenbreite <sup>2)</sup>	≥120	52,6	47,4		63,2	36,8		0,450
Nackenriegelhöhe <sup>2)</sup>	115-120	57,9	13,2	28,9	50,0	11,1	38,9	0,758
Bugschwelle <sup>2)</sup>	10	50,0	0	50,0	26,3	5,3	68,4	0,108
Kotkante <sup>2)</sup>	20	42,1	5,3	52,6	52,6	5,3	42,1	0,743

<sup>1)</sup> Referenzwerte modifiziert nach KNIERIM und WINCKLER (2002); <sup>2)</sup> Referenzwerte nach DE KRUIF et al. (2013)

**Tabelle 13: Intervall der Klauenpflege auf den Betrieben**

Kategorie	Monatlich einzelne Kühe	½ jährlich alle Kühe	> ½ jährlich alle Kühe	Unregelmäßig alle Kühe
<b>Fallbetriebe</b> (n = 21)	0 %	66,7 %	28,6 %	4,8 %
<b>Kontrollbetriebe</b> (n = 10)	10,0 %	80,0 %	0 %	10,0 %
p = 0,144 (Chi-Quadrat Test)				

Die Landwirte von Kontrollbetrieben betrieben häufiger Klauenpflege bei ihren Kühen als die Landwirte der Fallbetriebe, wobei jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied bestand (Tab. 13).

Nach den Referenzwerten von DE KRUIF et al. (2013) sollten 70 % der Kühe lahmheitsfrei gehen, was weder von den Fall- noch von den Kontrollbetrieben erreicht wurde. Es gingen 51,0 % der Laufstallkühe in den Fallbetrieben und 44,8 % der Tiere in den Kontrollbetrieben lahm. Die Kühe der Fallbetriebe gingen statistisch signifikant stärker lahm als die Kühe der Kontrollbetriebe. Der mediane Score für Fallbetriebe lag bei 2 und für Kontrollbetriebe bei 1 (Tab 14).

Zwischen Fall- und Kontrollbetrieben war die Verteilung der unterschiedlichen Intervalle der Klauenpflege auf die Lahmheitsscore-Kategorien jeweils signifikant. Bei halbjähriger Klauenpflege gesondert betrachtet, war der Anteil an Tieren mit Score 3 – 5 in Fallbetrieben signifikant höher als in Kontrollbetrieben ( $p > 0,001$ ; Chi-Quadrat-Test). Bei der gesonderten Betrachtung der unregelmäßigen Klauenpflege bestand hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Lahmheitsgrades ( $p = 0,430$ ; Chi-Quadrat-Test) zwischen Fall- und Kontrollbetrieben (Tab. 15).

Pro Betrieb gab es meist mehrere Abteile, weshalb sich die folgenden Auswertungen auf die einzelnen Fallbetrieb-Abteile und Kontrollbetrieb-Abteile beziehen. In den Abteilen der Fallbetriebe waren die **Fressplätze**, bezogen auf die vorhandene Kuhanzahl, bei 53,4 % ausreichend, bei 46,6 % der Abteile gab es mehr Kühe als Fressplätze. Betrachtete man jedoch den Mittelwert auf Bestandsebene, so waren durchschnittlich 88,8 % der Abteile auf den Fallbetrieben mit genügend Fressplätzen ausgestattet. In den Kontrollbetrieben waren die Fressplätze bei 62,5 % der Abteile ausreichend, wobei der Mittelwert für alle Kontrollbetrieb-Abteile zusammen bei 94,1 % ausreichender Fressplätze lag. Die angebotenen **Liegeplätze**, bezogen auf die Anzahl Kühe in den jeweiligen Abteilen, waren in 60,1 % der Abteile in Fallbetrieben ausreichend, der Mittelwert für die ausreichende Liegeplatzanzahl lag bei 92,1 %. In den Kontrollbetrieben waren die angebotenen Liegeplätze für 30,8 % der Abteile ausreichend, der Mittelwert für die ausreichende Liegeplatzanzahl lag mit 84,6 % tiefer als bei den Fallbetrieben. In den Laufstallabteilen der Fallbetriebe war die **Wasserversorgung** der Tiere in 39,3 % (Mittelwert für ausreichende Wasserversorgung 65,6 %) und in den Abteilen der Kontrollbetrieben in 31,3 % (Mittelwert für ausreichende Wasserversorgung 72,2 %) ausreichend (Tab. 17). Auf die Verhältnisse Kuh/ Tränkeplatz, Kuh/ Fressplatz und Kuh/ Liegeplatz in den Abteilen wird in Tab. 16 eingegangen.

---

Insgesamt hatten wenige Betriebe eine eigene Biogasanlage, wobei etwas mehr Fall- als Kontrollbetriebe eine Biogasanlage betrieben oder Biogas-Output zur Düngung aller Flächen verwendeten. Das Herbizid Glyphosat wurde in  $2/3$  der Fall- und Kontrollbetriebe benutzt.

In über der Hälfte der Fall- und Kontrollbetriebe war der Kuhstall als Warmstall konzipiert (Tab. 18).

**Tabelle 14: Häufigkeit der einzelnen Bewegungsscores bei laktierenden und trockenstehenden Kühen auf den Betrieben mit Laufstallhaltung**

Score <sup>1)</sup>	Fallbetriebe (n = 14; 855 Kühe)						Kontrollbetriebe (n = 8; 518 Kühe)					
	Gesamt (n)	1	2	3	4	5	Gesamt (n)	1	2	3	4	5
Häufigkeit (Anzahl Tiere)	855	419	277	112	40	7	518	286	167	53	12	0
Prozent	100	49,0	32,4	13,1	4,7	0,8	100	55,2	32,2	10,2	2,3	0
Referenzwerte in Prozent <sup>2</sup>		70	< 20	< 10	0	0		70	< 20	< 10	0	0
			> 90	< 10	0			> 90	< 10	0		
p = <b>0,009</b> (Chi- Quadrat)												

<sup>1)</sup>Locomotion Score nach SPRECHER et al. (1997), <sup>2)</sup>Referenzwerte nach DE KRUIF et al. (2013)

**Tabelle 15: Verteilung der Kühe auf die beiden Lahmheitsscore-Kategorien<sup>1)</sup> 1 + 2 und 3 - 5 in Fall- und Kontrollbetrieben mit Laufstall in Bezug zum Intervall der Klauenpflege**

Locomotion Score	Intervall der Klauenpflege in Fallbetrieben (n = 14; 855 Kühe)					Intervall der Klauenpflege in Kontrollbetrieben (n = 8; 519 Kühe)					p-Wert Chi- Quadrat
	Monatlich einzelne Kühe	¼ jährlich alle Kühe	½ jährlich alle Kühe <sup>2)</sup>	> 1/2 jährlich alle Kühe	Unregelmäßig alle Kühe <sup>3)</sup>	Monatlich einzelne Kühe	¼ jährlich alle Kühe	½ jährlich alle Kühe <sup>2)</sup>	> 1/2 jährlich alle Kühe	Unregelmäßig alle Kühe <sup>3)</sup>	
1 + 2	0	0	628 (81,5 %)	38 (82,6 %)	30 (78,9 %)	30 (71,4 %)	0	356 (89,7 %)	0	67 (83,8 %)	< <b>0,001</b>
3 - 5	0	0	143 (18,5 %)	8 (17,4 %)	8 (21,1 %)	12 (28,6 %)	0	41 (10,3 %)	0	12 (15 %)	< <b>0,001</b>
Gesamtzahl Kühe	0	0	771 (100 %)	46 (100 %)	38 (100 %)	42 (100 %)	0	397 (100 %)	0	80 (100 %)	

<sup>1)</sup> Lahmheitsscore nach SPRECHER et al. (1997)

<sup>2)</sup> Gesonderte Betrachtung der halbjährlichen Klauenpflege auf Fall- und Kontrollbetrieben: p > 0,001; Chi-Quadrat-Test

<sup>3)</sup> Gesonderte Betrachtung der unregelmäßigen Klauenpflege auf Fall- und Kontrollbetrieben: p = 0,430; Chi-Quadrat-Test

**Tabelle 16: Verhältnisse Kuh/ Tränkeplatz, Kuh/ Fressplatz und Kuh/ Liegeplatz in den Abteilen der Laufställe in Fall- und Kontrollbetrieben**

Verhältnis von:	Parameter	Fallbetriebe (n = 14)		Kontrollbetriebe (n = 8)		p-Wert Mann-Whitney-U Test
		Laktierend (15 Abteile)	Trockenstehend (13 Abteile)	Laktierend (9 Abteile)	Trockenstehend (7 Abteile)	
Kuh/Tränkeplatz <sup>1)</sup>	MD	2,0	0,8	2,0	0,7	0,449
	Q1	1,0	0,5	1,6	0,4	
	Q3	2,8	2,1	2,2	1,1	
Kuh/ Fressplatz <sup>2)</sup>	MD	1,1	0,9	1,1	0,8	0,277
	Q1	1,0	0,6	1,0	0,7	
	Q3	1,3	1,3	1,2	0,8	
Kuh/ Liegeplatz	MD	1,0	0,8	1,1	1,1	0,073
	Q1	0,9	0,6	0,9	1,0	
	Q3	1,2	1,2	1,3	2,9	

<sup>1)</sup> Die gewählten Richtwerte für die Wasserversorgung durch Trogränken stammen aus den Planungshilfen für den Rinder-Stallbau mit Anforderungen, Funktionsmaßen und Empfehlungen von Aulendorf (EILERS, Stand 25.04.2013) sowie den Tierschutzleitlinien für Milchkuhhaltung (RINDERHALTUNG, 2007), die Werte für Schalenränken wurden nach oben genannten Quellen modifiziert. Für die Trogränke wurde ein Wert von 10 cm/Tier und die Schalenränke 10 Tiere/ Tränke verwendet. Wenn in einem Abteil Trog- und Schalenränken verwendet wurden, wurde die Anzahl an Tränkeplätze für Trog- und Schalenränken einzeln berechnet und addiert.

<sup>2)</sup> Teilweise waren Fressplätze mit Abtrennung und Futtertische ohne Fressplatzabtrennung gemischt in einem Abteil zu finden. Dann wurde für den Fressbereich mit den fehlenden Abtrennungen der Richtwert von **75 cm/ Tier** verwendet und somit so viele weitere Fressplätze berechnet, wie anhand der Richtwerte vorhanden waren (RINDERHALTUNG, 2007; DE KRUIF et al., 2013)

**Tabelle 17: Ausreichende Wasserversorgung, Fress- und Liegeplätze in Prozent in den Abteilen der Laufstallbetriebe bezogen auf Richtwerte**

Parameter	Fallbetriebe (n = 21; 28 Abteile)	Kontrollbetriebe (n = 10; 16 Abteile)
	MW	MW
Ausreichende Wasserversorgung bezogen auf die vorhandene Kuhanzahl in den Abteilen in % <sup>1)</sup>	65,6	72,2
Ausreichende Fressplätze bezogen auf die vorhandene Kuhanzahl in den Abteilen in % <sup>2)</sup>	88,8	94,1
Ausreichende Liegeplätze bezogen auf die vorhandene Kuhanzahl in den Abteilen in % <sup>2)</sup>	92,1	84,6

<sup>1)</sup> Die gewählten Richtwerte für die Wasserversorgung durch Trogränken stammen aus den Planungshilfen für den Rinder-Stallbau mit Anforderungen, Funktionsmaßen und Empfehlungen von Aulendorf (EILERS, Stand 25.04.2013) sowie den Tierschutzleitlinien für Milchkühhaltung (RINDERHALTUNG, 2007), die Werte für Schalenränken wurden nach oben genannten Quellen modifiziert. Für die Trogränke wurden 10 cm / Tier und die Schalenränke 10 Tiere / Tränke verwendet.

<sup>2)</sup> Für das Tier-Fressplatzverhältnis wurde der Zielwert 1:1 (DE KRUIF et al., 2013), beim Tier-Liegeplatzverhältnis wurde ebenfalls 1:1 verwendet (RINDERHALTUNG, 2007)

**Tabelle 18: Biogasanlage, Düngung und Stallart der Betriebe**

Parameter	Fallbetriebe (n = 21)	Kontrollbetriebe (n = 10)	p-Wert (Chi-Quadrat)
Eigene Biogasanlage	15,0 % <sup>1)</sup>	10,0 %	0,704
Nutzung Biogas-Output zur Düngung aller Flächen	28,6 %	20,0 %	0,790
Nutzung Glyphosat auf landwirtschaftlichen Flächen	66,7 %	66,7 % <sup>2)</sup>	1,000
Stallart (Warmstall)	61,9 %	60,0 %	0,919

<sup>1)</sup> bei einem Fallbetrieb konnte diese Frage nicht ausgewertet werden, daher hier n = 20 statt 21; <sup>2)</sup> bei einem Kontrollbetrieb konnte diese Frage nicht ausgewertet werden, daher hier n = 9 statt 10

## 2.2. Milch: Leistung und Inhaltsstoffe

Die Jahresmilchleistung der Fleckvieh Kühe und Kreuzungen aus Fallbetrieben lag etwas tiefer als die der Kontrollbetriebe, es bestand aber kein statistisch signifikanter Unterschied (Tab. 19).

Für die Jahresmilchleistung der Betriebe mit Schwarzbunten Kühen und Kreuzungen daraus, teilweise gemischt mit Rotbunten oder Braunvieh Kühen wurde ebenfalls pro Betrieb ein arithmetischer Mittelwert berechnet, welcher bei den Fallbetrieben ( $n = 3$ ) bei 8426 kg, 7931 kg und 9520 kg Milch lag. Der Kontrollbetrieb erzielte 6426 kg Milch für 2012.

Die durchschnittliche Jahresmilchleistung aller Fallbetriebe zusammen belief sich auf 7509 kg und die durchschnittliche Jahresleistung aller Kontrollbetriebe auf 7337 kg Milch.

Der MilCHFettgehalt, der Milcheiweißgehalt und deren Quotient lagen in allen Fallbetrieben zusammen etwas höher als in den Kontrollbetrieben (statistisch signifikant) (Tab. 20).

Bei der Berechnung des Schnittpunktes der Geraden des Fett- / Eiweiß-Quotienten mit 35 kg Milch ergab sich kein Unterschied zwischen Fall- und Kontrollbetrieben (Tab. 21).

### **Fallbetriebe mit dem Inklusionskriterium Milchleistungsabfall über mindestens drei aufeinanderfolgende Monate**

Dieses Inklusionskriterium erfüllten drei Fallbetriebe. Für jeden dieser Betriebe wurde für die Milchleistung im Jahr 2012 ebenfalls ein arithmetischer Mittelwert berechnet. Zwei der betroffenen Betriebe hielten Schwarzbunte Kühe und Kreuzungen daraus, teilweise gemischt mit Rotbunten oder Braunvieh Kühen. Die durchschnittliche Jahresmilchleistung für diese Betriebe (vor Beginn des Milchleistungsabfalls) ergab folgende Werte:

Betrieb 1 erzielte eine Jahresmilchleistung von 7931 kg (Schwarzbunt) und hatte einen Milchleistungsabfall um 26,1 %; Betrieb 2 erzielte 9520 kg Milch (Schwarzbunt) und hatte einen Milchleistungsabfall um 15,3 % und Betrieb 3 erzielte 7529 kg Milch (Fleckvieh) und hatte einen Milchleistungsabfall um 21,5 %.

### **Überprüfung der Milchleistungsdaten mithilfe eines mixed model (SAS)**

Die Milchmenge (in kg) hing signifikant von der Haltungsform ( $p = 0,008$ ), der Laktationsnummer ( $p < 0,001$ ) und der Tage in Milch (logarithmiert;  $p < 0,001$ ) ab, nicht jedoch von der Betriebsart (Fall- oder Kontrollbetrieb;  $p = 0,594$ ). Die durchschnittliche Milchleistung der Kühe auf Fallbetrieben betrug 23,26 kg ( $\pm 0,64$  kg), während sie auf Kontrollbetrieben 22,69 kg ( $\pm 0,94$  kg) betrug. In Laufstallhaltungen betrug die durchschnittliche Milchleistung 24,44 kg ( $\pm 0,62$  kg) und in Anbindehaltungen 21,51 kg ( $\pm 0,98$  kg). Die höchste Milchleistung erzielten Tiere in ihrer 3. Laktation (durchschnittlich 24,7 kg  $\pm 0,60$  kg). Die Milchleistung nahm mit zunehmenden Tagen in

Milch ab (Koeffizient -4,87 für logarithmierte Tage in Milch).

Dies bedeutet, wenn man für die Faktoren, wie Haltungsform, Tage in Milch und Laktationsnummer korrigiert, gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Milchleistung zwischen Kühe in Fall- und Kontrollbetrieben.

### **Mittelwert der Milchzellzahl, Zitzenversiegler und antibiotische Trockensteller**

Der Mittelwert der Milchzellzahl der Einzeltiere lag in Fallbetrieben statistisch signifikant höher als in den Kontrollbetrieben (Tab. 22).

Zitzenversiegler wurden mit 4,8 % in Fall- und mit 30 % in Kontrollbetrieben eher selten benutzt. Hingegen verwendeten ca. die Hälfte aller Fall- und Kontrollbetriebe bei allen Kühen und ca. 30 – 40 % der Betriebe nur bei Problemtieren antibiotische Trockensteller (Tab. 23).

**Tabelle 19: Herdencharakteristika der Betriebe im Jahr 2012 (Fleckvieh und Fleckvieh-Kreuzungen)**

Parameter <sup>1)</sup>	Fallbetriebe (n = 18)			Kontrollbetriebe (n = 9)			p-Wert Mann-Whitney-U-Test
	MD	Q 1	Q 3	MD	Q 1	Q 3	
Jahresmilchleistung in kg	7075	6917	8277	7463	7169	8834	0,217
Milchfettgehalt in %	4,17	4,05	4,28	4,14	3,99	4,30	0,857
Milcheiweißgehalt in %	3,53	3,46	3,59	3,52	3,49	3,55	0,680

<sup>1)</sup> Für jeden Parameter pro Betrieb wurde ein arithmetischer Mittelwert aus den Einzelwerten aller Kühe eines Betriebes für das Jahr berechnet, der dann in die weitere Berechnung einfließt.

**Tabelle 20: Daten der Milchmenge und -inhaltsstoffe der jeweils letzten 12 Monate vor Bestandsbesuch**

Parameter	Fallbetriebe <sup>1)</sup> (n = 21)		Kontrollbetriebe <sup>2)</sup> (n = 10)		p-Wert T-Test
	MW	SD	MW	SD	
Ø Tagesmilchleistung in kg	24,2	8,1	24,4	8,2	0,160
Milchfettgehalt in %	4,26	0,75	4,19	0,77	< <b>0,001</b>
Milcheiweißgehalt in %	3,58	0,43	3,56	0,39	<b>0,001</b>
Fett-/Eiweißquotient	1,20	0,20	1,18	0,22	< <b>0,001</b>

<sup>1)</sup> Fallbetriebe: 12693 Datensätze von 1545 Kühen; <sup>2)</sup> Kontrollbetriebe: 6896 Datensätze von 856 Kühen)

**Tabelle 21: Berechnete Schnittpunkte aus MLP Daten für die Energiebilanz der Kühe auf Fall- und Kontrollbetrieben**

Kategorie	Energiebilanz			p-Wert Mann-Whitney-U-Test
	Schnittpunkt der Geraden des Fett-/Eiweiß-Quotienten mit 35 kg Milch			
	MD	Q1	Q3	
<b>Fallbetriebe</b> <sup>1)</sup> (n = 21)	1,2	1,2	1,2	0,319
<b>Kontrollbetriebe</b> <sup>1)</sup> (n = 10)	1,2	1,1	1,3	

<sup>1)</sup> Pro Betrieb wurde pro Monat (letzten 12 Monate vor Bestandsbesuch) auf Herdenebene mithilfe der MLP Daten ein Schnittpunkt des Fett-/ Eiweiß-Quotienten mit einer Geraden bei 35 kg Milch berechnet und dann pro Betrieb (aus 12 Werten) ein arithmetischer Mittelwert errechnet, welcher in die weiteren Berechnungen einfließt.

**Tabelle 22: Mittelwert der Milchzellzahl der Einzeltiere (letzte 12 Monate vor Bestandsbesuch)**

Milchzellzahl	Fallbetriebe <sup>2)</sup> (n = 21)	Kontrollbetriebe <sup>3)</sup> (n = 10)	p-Wert Mann-Whitney- U-Test	Referenzwert für Betriebe ohne Probleme <sup>1)</sup>
	211,9	185,4	<b>0,006</b>	< 150

Zellgehalt x 10<sup>3</sup>/ ml Milch ; <sup>1)</sup> Referenzwert nach DE KRUIF et al. (2013); <sup>2)</sup> Fallbetriebe: 12693 Datensätze von 1545 Kühen; <sup>3)</sup> Kontrollbetriebe: 6896 Datensätze von 856 Kühen

**Tabelle 23: Verwendung von Zitzenversiegeln und Trockenstellern auf den Betrieben**

Parameter	Fallbetriebe (n = 21)	Kontrollbetriebe (n = 10)	p-Wert Chi- Quadrat
Zitzenversiegler	4,8 % verwendet	30,0 % verwendet	0,121
	95,2 % nicht verwendet	70 % nicht verwendet	
AB- Trockensteller <sup>1)</sup>	57,1 % bei allen Tieren	55,6 % bei allen Tieren	0,276
	28,6 % bei Problemtieren	44,4 % bei Problemtieren	
	14,3 % nicht verwendet	0 % nicht verwendet	

<sup>1)</sup> AB-Trockensteller = Antibiotischer Trockensteller

### 2.3. Fütterungsmanagement

Ca. 2/3 der Silagen auf Fall- und Kontrollbetrieben waren bezüglich Farbveränderungen, Schimmelbefall und Fäulnis ohne besonderen Befund. Sand- und Erdbeimengungen sowie Strukturverlust kam äußerst selten vor. Geruchsabweichungen traten bei den Silagen der Fallbetriebe deutlich häufiger auf als in den Kontrollbetrieben, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Tab. 24).

Die Hälfte der Fallbetriebe verfütterte „gute“ und die andere Hälfte „schlechte“ Silage. Bei den Kontrollbetrieben wurden in 60 % „gute“ Silagen verfüttert, bei den Fallbetrieben in 50 % (Tab. 25).

Kontrollbetriebe ließen statistisch signifikant häufiger Rationsberechnungen für die Fütterung ihrer Kühe durchführen als Fallbetriebe. Ein Großteil der Kontrollbetriebe ließ von jeder Charge Grundfutteranalysen durchführen, bei den Fallbetrieben lag der Anteil hingegen bei knapp 40 % (Tab. 26).

**Tabelle 24: Ergebnisse der sensorischen Beurteilung der verfütterten Silagen**

Merkmal	Fallbetriebe (n = 20 <sup>1)</sup> mit 32 Silagen)			Kontrollbetriebe (n = 10 mit 17 Silagen)			p-Wert Chi- Quadrat
	% obB	% ggr	% hgr	% obB	% ggr	% hgr	
Einteilung							
Farbveränderung	65,6	31,3	3,1	70,6	29,4	0	0,747
Schimmelbefall	65,6	28,1	6,3	58,8	35,3	5,9	0,874
Fäulnis	61,3	35,5	3,2	64,7	35,3	0	0,752
Sand- / Erdbeimengung	78,1	18,8	3,1	82,4	11,8	5,9	0,754
Geruchs- abweichung	40,6	43,8	15,6	70,6	29,4	0	0,074
Strukturverlust	78,1	21,9	0	94,1	5,9	0	0,149

obB = ohne besonderen Befund; ggr = geringgradig; hgr = hochgradig;

<sup>1)</sup> bei einem der Fallbetriebe konnten die Silagen nicht sensorisch beurteilt werden.

**Tabelle 25: Anzahl Betriebe mit „guter“ bzw. „schlechter“ Silagequalität**

Silagequalität <sup>1)</sup>	Fallbetriebe (n = 20) <sup>2)</sup>	Kontrollbetriebe (n = 10)	p-Wert (Chi-Quadrat)
„gut“	10 (50 %)	6 (60 %)	0,605
„schlecht“	10 (50 %)	4 (40 %)	

<sup>1)</sup> Für die Einteilung der Silagen in „gute“ bzw. „schlechte“ Qualität siehe III.6

<sup>2)</sup> bei einem der Fallbetriebe konnten die Silagen nicht sensorisch beurteilt werden, weshalb keine Silagequalität zugeteilt werden konnte.

**Tabelle 26: Durchführung von Rationsberechnungen und Grundfutteranalysen auf den Betrieben**

Parameter	Fallbetriebe (n = 21)	Kontrollbetriebe (n = 10)	p-Wert Chi-Quadrat
Rationsberechnung	67,3 % durchgeführt	100 % durchgeführt	< 0,001
	32,7 % keine durchgeführt	0 % keine durchgeführt	
Grundfutteranalyse	38,1 % für jede Charge durchgeführt	70 % für jede Charge durchgeführt	0,238
	28,6 % gelegentlich durchgeführt	10 % gelegentlich durchgeführt	
	33,3 % keine durchgeführt	20 % keine durchgeführt	

### **3. Tiergesundheit**

#### **3.1. Herdenindices**

Die Auswertung der Herdenindices zeigte, dass die Euter der Fallbetriebe in Anbindehaltung statistisch signifikant stärker verschmutzt waren als in den Kontrollbetrieben. Genauso verhielt es sich mit den Beinen und Flanken, die sowohl in Laufställen als auch in der Anbindehaltung von Fallbetrieben statistisch signifikant stärker verschmutzt waren als in Kontrollbetrieben (Tab. 27-29).

Die Tiere in Laufställen und Anbindehaltung beider Kategorien sind verglichen mit den Referenzwerten nach COOK und REINEMANN (2007) zu stark verschmutzt, wobei die Tiere der Fallbetriebe stärker verschmutzt sind (Tab. 30, 31).

Bei der Auswertung ergaben sich für die Kühe in Laufställen von Fallbetrieben an den Steuerelementen statistisch signifikant stärkere Integumentschäden als in den Kontrollbetrieben. In der Anbindehaltung verhielt es sich umgekehrt, die Kühe der Kontrollbetriebe wiesen an den Steuerelementen statistisch signifikant stärkere Integumentschäden auf als die Tiere der Fallbetriebe. Für die Knochenpunkte der Liegefläche ergaben sich keine statistisch signifikanten Diskrepanzen zwischen Fall- und Kontrollbetrieben (Tab. 32-35).

Bei der in Kategorien zusammengefassten Bonitierung der Steuerelemente (Scores 1-3 und 4-5) wurden die Referenzwerte für Laufstall und Anbindehaltung sowohl von Fall- als auch von Kontrollbetrieben erreicht. In Anbindehaltung gab es bei den Fallbetrieben keine geprüften Kühe mit einem Score von 4 oder 5, weshalb die Fallbetriebe statistisch signifikant weniger starke Veränderungen an den hervorstehenden Knochenpunkten der Steuerelemente aufwiesen (Tab. 36).

Bei der in Kategorien zusammengefassten Bonitierung der Liegefläche (ebenfalls Score 1-3 und 4-5) wurden die Referenzwerte im Laufstall sowohl von Fall- als auch von Kontrollbetrieben erreicht. In Anbindehaltung wurden die Referenzwerte für die hervorstehenden Knochenpunkte der Liegefläche von den Fallbetrieben nicht ganz erreicht, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrollbetrieben bestand (Tab. 37).

**Tabelle 27: Hygienescore: Häufigkeit und Stärke der Verschmutzung des Euters in den einzelnen Betriebskategorien**

Haltung	Laufstall (n = 865 Kühe)										Anbindehaltung (n = 304 Kühe)									
	Fallbetriebe (n = 14)					Kontrollbetriebe (n = 8)					Fallbetriebe (n = 7)					Kontrollbetriebe (n = 2)				
Score <sup>1)</sup>	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4
Häufigkeit	587	47	297	213	30	278	33	132	93	20	228	8	73	86	61	76	19	31	24	2
Prozent	100	8,0	50,6	36,3	5,1	100	11,9	47,5	33,5	7,2	100	3,5	32,0	37,7	26,8	100	25,0	40,8	31,6	2,6
p-Wert	0,154 (Chi- Quadrat)										< 0,001 (Chi- Quadrat)									

<sup>1)</sup> Hygiene Score Card nach COOK und REINEMANN (2007)

**Tabelle 28: Hygienescore: Häufigkeit und Stärke der Verschmutzung der Beine in den einzelnen Betriebskategorien**

Haltung	Laufstall (n = 865 Kühe)										Anbindehaltung (n = 304 Kühe)									
	Fallbetriebe (n = 14)					Kontrollbetriebe (n = 8)					Fallbetriebe (n = 7)					Kontrollbetriebe (n = 2)				
Score <sup>1)</sup>	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4
Häufigkeit	587	6	137	290	154	278	2	118	108	50	228	1	52	80	95	76	1	32	38	5
Prozent	100	1,0	23,3	49,4	26,2	100	0,7	42,4	38,8	18,0	100	0,4	22,8	35,1	41,7	100	1,3	42,1	50,0	6,6
p-Wert	< 0,001 (Chi- Quadrat)										< 0,001 (Chi- Quadrat)									

<sup>1)</sup> Hygiene Score Card nach COOK und REINEMANN (2007)

**Tabelle 29: Hygienescore: Häufigkeit und Stärke der Verschmutzung der Flanken in den einzelnen Betriebskategorien**

Haltung	Laufstall (n = 865 Kühe)										Anbindehaltung (n = 304 Kühe)									
	Fallbetriebe (n = 14)					Kontrollbetriebe (n = 8)					Fallbetriebe (n = 7)					Kontrollbetriebe (n = 2)				
Score <sup>1)</sup>	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4	Gesamt (n)	1	2	3	4
Häufigkeit	587	33	172	191	191	278	18	126	77	57	228	4	40	64	120	76	7	30	30	9
Prozent	100	5,6	29,3	32,5	32,5	100	6,5	45,3	27,7	20,5	100	1,8	17,5	28,1	52,6	100	9,2	39,5	39,5	11,8
p-Wert	< 0,001 (Chi- Quadrat)										< 0,001 (Chi- Quadrat)									

<sup>1)</sup> Hygiene Score Card nach COOK und REINEMANN (2007)

**Tabelle 30: Vergleich der Häufigkeit der ermittelten Hygienescores 3 und 4 im Laufstall der untersuchten Betriebe mit vorgeschlagenen Referenzwerten aus der Literatur**

Hygiene-score <sup>1)</sup> für	Vorgeschlagene Referenzwerte <sup>1)</sup> für Score 3+4	Fallbetriebe (n = 14)			Kontrollbetriebe(n = 14)			p-Wert Chi-Quadrat
	Prozent	Stichprobenanzahl der Tiere (n)	Anzahl Tiere mit Score 3+4	Prozent	Stichprobenanzahl der Tiere (n)	Anzahl Tiere mit Score 3+4	Prozent	
Euter	11	587	243	41,4	278	113	40,7	0,834
Beine	47		444	75,6		158	56,8	< 0,001
Flanke	8		382	65,0		134	48,2	< 0,001

<sup>1)</sup> Vorgeschlagene Referenzwerte für Euter, Beine und Flanke Score 3 und 4 nach COOK und REINEMANN (2007), genauso wie die verwendete Hygiene Score Card

**Tabelle 31: Vergleich der Häufigkeit der ermittelten Hygienescores 3 und 4 in Anbindehaltung der untersuchten Betriebe mit vorgeschlagenen Referenzwerten aus der Literatur**

Hygiene-score <sup>1)</sup> für	Vorgeschlagene Referenzwerte <sup>1)</sup> für Score 3+4	Fallbetriebe (n = 7)			Kontrollbetriebe (n = 2)			p-Wert Chi-Quadrat
	Prozent	Stichprobenanzahl der Tiere (n)	Anzahl Tiere mit Score 3+4	Prozent	Stichprobenanzahl der Tiere (n)	Anzahl Tiere mit Score 3+4	Prozent	
Euter	10	228	147	64,5	76	26	34,2	< <b>0,001</b>
Beine	15		175	76,8		43	56,6	<b>0,001</b>
Flanke	17		184	80,7		39	51,3	< <b>0,001</b>

<sup>1)</sup> Vorgeschlagene Referenzwerte für Euter, Beine und Flanke Score 3 und 4 nach COOK und REINEMANN (2007), genauso wie die verwendete Hygiene Score Card

**Tabelle 32: Bonitur: Häufigkeit und Stärke der Veränderungen an den hervorstehenden Knochenpunkten der Steuerelemente in Laufstallbetrieben**

Haltung	Laufstall											
	Fallbetriebe (n = 14)						Kontrollbetriebe(n = 8)					
Score <sup>1)</sup>	Gesamt (n)	1	2	3	4	5	Gesamt(n)	1	2	3	4	5
Häufigkeit	579	321	162	79	16	1	279	206	51	18	4	0
Prozent	100	55,4	28,0	13,6	2,8	0,2	100	73,8	18,3	6,5	1,4	0
p-Wert	< <b>0,001</b> (Chi- Quadrat)											

<sup>1)</sup> Scores zur Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte nach REUBOLD (2003)

**Tabelle 33: Bonitur: Häufigkeit und Stärke der Veränderungen an den hervorstehenden Knochenpunkte der Steuerelemente in Anbindehaltung**

Haltung	Anbindehaltung											
	Fallbetriebe (n = 7)						Kontrollbetriebe (n = 2)					
Score <sup>1)</sup>	Gesamt (n)	1	2	3	4	5	Gesamt (n)	1	2	3	4	5
Häufigkeit	228	53	77	98	0	0	76	19	11	44	1	1
Prozent	100	23,2	33,8	43,0	0	0	100	25,0	14,5	57,9	1,3	1,3
p-Wert	<b>0,003</b> (Chi- Quadrat)											

<sup>1)</sup>Scores zur Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte nach REUBOLD (2003)

**Tabelle 34: Bonitur: Häufigkeit und Stärke der Veränderungen an den hervorstehenden Knochenpunkte der Liegefläche im Laufstall**

Haltung	Laufstall											
	Fallbetriebe (n = 14)						Kontrollbetriebe (n = 8)					
Score <sup>1)</sup>	Gesamt (n)	1	2	3	4	5	Gesamt (n)	1	2	3	4	5
Häufigkeit	571	64	256	232	17	2	279	33	131	99	11	5
Prozent	100	11,2	44,8	40,6	3,0	0,4	100	11,8	47,0	35,5	3,9	1,8
p-Wert	0,148 (Chi- Quadrat)											

<sup>1)</sup>Scores zur Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte nach REUBOLD (2003)

**Tabelle 35: Bonitur: Häufigkeit und Stärke der Veränderungen an den hervorstehenden Knochenpunkte der Liegefläche in Anbindehaltung**

Haltung	Anbindehaltung											
	Fallbetriebe (n = 7)						Kontrollbetriebe (n = 2)					
Score <sup>1)</sup>	Gesamt (n)	1	2	3	4	5	Gesamt (n)	1	2	3	4	5
Häufigkeit	228	6	110	86	18	8	76	6	40	26	2	2
Prozent	100	2,6	48,2	37,7	7,9	3,5	100	7,9	52,6	34,2	2,6	2,6
p-Wert	0,139 (Chi- Quadrat)											

<sup>1)</sup>Scores zur Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte nach REUBOLD (2003)

**Tabelle 36: Vergleich der Häufigkeit und Stärke der Veränderungen an den Steuerelementen in Kategorien zusammengefasst mit generierten Referenzwerten für Laufstall und Anbindehaltung**

Score <sup>1)</sup>	Zielwert <sup>2)</sup>	Laufstall				Anbindehaltung			
		Fallbetriebe (n = 14)		Kontrollbetriebe (n = 8)		Fallbetriebe (n = 7)		Kontrollbetriebe (n = 2)	
		Anzahl (n)	Prozent	Anzahl (n)	Prozent	Anzahl (n)	Prozent	Anzahl (n)	Prozent
1-3	>90 %	562	97,1	275	98,6	228	100	74	97,4
4-5	<10 %	17	2,9	4	1,4	0	0	2	2,6
p-Wert		0,182 (Chi-Quadrat)				<b>0,014</b> (Chi-Quadrat)			

<sup>1)</sup>Scores zur Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte nach REUBOLD (2003); <sup>2)</sup>Vergleich mit Referenzwerten nach DE KRUIF et al. (2007)

**Tabelle 37: Vergleich der Häufigkeit und Stärke der Veränderungen an der Liegefläche in Kategorien zusammengefasst mit generierten Referenzwerten für Laufstall und Anbindehaltung**

Score <sup>1)</sup>	Zielwert <sup>2)</sup>	Laufstall				Anbindehaltung			
		Fallbetriebe (n = 14)		Kontrollbetriebe (n = 8)		Fallbetriebe (n = 7)		Kontrollbetriebe (n = 2)	
		Anzahl (n)	Prozent	Anzahl (n)	Prozent	Anzahl (n)	Prozent	Anzahl (n)	Prozent
1-3	>90 %	552	96,7	263	94,3	202	88,6	72	94,7
4-5	<10 %	19	3,3	16	5,7	26	11,4	4	5,3
p-Wert		0,097 (Chi-Quadrat)				0,120 (Chi-Quadrat)			

<sup>1)</sup>Scores zur Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte nach REUBOLD (2003); <sup>2)</sup>Vergleich mit Referenzwerten nach DE KRUIF et al. (2007)

Bei Fleckvieh Kühen in Anbindehaltung lag ungefähr die Hälfte aller Kühe der Fallbetriebe im vorgeschlagenen Bereich des BCS. Die Kühe der Kontrollbetriebe mit Anbindehaltung befanden sich im Laktationsstadium 1 häufiger unterhalb des vorgeschlagenen Referenzwertes, bei den restlichen Laktationsstadien lagen ebenfalls über 50 % der Kühe im vorgeschlagenen Rahmen. Im Verlauf der Laktation lagen bei Fall- und Kontrollbetrieben immer mehr Kühe im Normbereich des BCS. Im Laktationsstadium 4 waren die Kühe der Fallbetriebe statistisch signifikant magerer als die der Kontrollbetriebe (Tab. 38).

Bei Fleckvieh Kühen im Laufstall lagen in den Kontrollbetrieben die Kühe der Laktationsstadien 1, 3 und 4 statistisch signifikant häufiger im oder unter dem vorgeschlagenen BCS Bereich als in den Fallbetrieben (Tab. 39).

Die Fallzahlen beim BCS von Schwarzbunten (oder von BCS vergleichbaren) Kühen waren sehr gering. Die Schwarzbunten (oder vom BCS vergleichbaren) Kühe im Laufstall lagen in Fallbetrieben zu Beginn der Laktation in über 50 % unter dem vorgeschlagenen Referenzbereich, wobei sich dies im Laufe der Laktation besserte. Bei den Kontrollbetrieben verhielt es sich umgekehrt. Mit Ausnahme gegen Ende der Laktation gab es während der gesamten Laktation mehr überkonditionierte als unterkonditionierte Kühe. Es entstanden keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen Fall- und Kontrollbetrieben (Tab. 40)

**Tabelle 38: Häufigkeit der einzelnen BCS Kategorien<sup>1)</sup> in Prozent unter Berücksichtigung des Laktationsstadiums bei Fleckvieh Kühen oder Kreuzungen davon in Anbindehaltung**

Lak- tations- stadium	Fallbetriebe (n = 7)				Kontrollbetriebe (n = 2)				p-Wert
	Anzahl (n)	BCS < vorgeschlagener Referenzwert in %	BCS entspricht vorgeschlagenem Referenzwert in %	BCS > vorgeschlagener Referenzwert in %	Anzahl (n)	BCS < vorgeschlagener Referenzwert in %	BCS entspricht vorgeschlagenem Referenzwert in %	BCS > vorgeschlagener Referenzwert in %	Chi- Quad.
1	29	37,9	48,3	13,8	7	71,4	28,6	0	0,237
2	50	24,0	54,0	22,0	8	37,5	50,0	12,5	0,668
3	59	13,6	50,8	35,6	12	25,0	58,3	16,7	0,358
4	90	25,8	56,2	18,0	49	10,2	69,4	20,4	<b>0,016</b>
p = 0,140 (Chi-Quadrat)									

BCS = Body condition score; BCS Schema verwendet nach EDMONSON et al. (1989); <sup>1)</sup> Referenzwerte für die einzelnen Kategorien nach HEUWIESER und MANSFELD (1992)

**Tabelle 39: Häufigkeit der einzelnen BCS Kategorien<sup>1)</sup> in Prozent unter Berücksichtigung des Laktationsstadiums bei Fleckvieh Kühen oder Kreuzungen davon im Laufstall**

Laktationsstadium	Fallbetriebe (n = 11)				Kontrollbetriebe (n = 7)				p-Wert
	Anzahl (n)	BCS < vorgeschlagener Referenzwert in %	BCS entspricht vorgeschlagenem Referenzwert in %	BCS > vorgeschlagener Referenzwert in %	Anzahl (n)	BCS < vorgeschlagener Referenzwert in %	BCS entspricht vorgeschlagenem Referenzwert in %	BCS > vorgeschlagener Referenzwert in %	Chi-Quad.
1	79	21,8	51,3	26,9	55	30,9	61,8	7,3	<b>0,016</b>
2	94	8,5	48,9	42,6	92	12,0	53,3	34,8	0,488
3	147	4,8	39,5	55,8	127	11,0	52,0	37,0	<b>0,004</b>
4	239	5,5	65,0	29,5	216	10,6	69,4	19,9	<b>0,024</b>
<b>p &lt; 0,001 (Chi-Quadrat)</b>									

BCS = Body condition score; BCS Schema verwendet nach EDMONSON et al. (1989); <sup>1)</sup> Referenzwerte für die einzelnen Kategorien nach HEUWIESER und MANSFELD (1992)

**Tabelle 40: Häufigkeit der einzelnen BCS Kategorien<sup>1)</sup> in Prozent unter Berücksichtigung des Laktationsstadiums bei Schwarzbunten (oder vom BCS vergleichbaren) Kühen im Laufstall**

Laktationsstadium	Fallbetriebe (n = 3)				Kontrollbetriebe (n = 1)				p-Wert
	Anzahl (n)	BCS < vorgeschlagener Referenzwert in %	BCS entspricht vorgeschlagenem Referenzwert in %	BCS > vorgeschlagener Referenzwert in %	Anzahl (n)	BCS < vorgeschlagener Referenzwert in %	BCS entspricht vorgeschlagenem Referenzwert in %	BCS > vorgeschlagener Referenzwert in %	Chi-Quad.
1	29	51,7	37,9	10,3	4	25,0	0	75,0	0,355
2	59	20,3	61,0	18,6	11	18,2	45,5	36,4	0,414
3	78	23,1	42,3	34,6	18	22,2	33,3	44,4	0,711
4	146	25,3	46,6	28,1	22	36,4	54,5	9,1	0,357
p = 0,193 (Chi-Quadrat)									

BCS = Body condition score; BCS Schema verwendet nach EDMONSON et al. (1989); <sup>1)</sup> Referenzwerte für die einzelnen Kategorien nach HEUWIESER und MANSFELD (1992)

### 3.2. Bakteriologische Untersuchung

Die im Folgenden beschriebenen Clostridienfunde beziehen sich auf positive Ergebnisse in den verwendeten real-time PCRs. Ablauf und Methodik der Clostridiendiagnostik siehe III.7, Anzahl und Verteilung der Proben Tab. 3.

Es wurden 52,5 % der Funde bei Falltieren und 47,5 % bei Kontrolltieren auf Fallbetrieben nachgewiesen und 43,2 % bei Falltieren und 56,8 % bei Kontrolltieren auf Kontrollbetrieben (Tab. 41).

Auf 74,2 % aller Betriebe wurde mind. eine pathogene Clostridien Spezies nachgewiesen. Von den positiven Proben (100 % = 77 Funde) waren bei 71,4 % der Erreger *C. perfringens*, in 24,7 % *C. novyi*, in 2,6 % *C. botulinum* und 1,3 % *C. haemolyticum* nachzuweisen (Tab. 42).

**Tabelle 41: Anzahl an pathogenen Clostridienfunden**

Positive Betriebe <sup>1)</sup>	Fallbetriebe (n = 21)		Kontrollbetriebe (n = 10)	
	66,7 % ( aller Fallbetriebe)		90,0 % (aller Kontrollbetriebe)	
Positive Funde beim Einzeltier	Falltiere (n= 93)	Kontrolltiere (n=93)	Falltiere (n=49)	Kontrolltiere (n=49)
	22,6 % (21 Funde)	20,4 % (19 Funde)	32,7 % (16 Funde)	42,9 % (21 Funde)
p-Wert	0,417 (Chi-Quadrat)			

<sup>1)</sup> Positiver Betrieb: Nachweis mind. einer pathogener *Clostridium* spp. mittels real-time PCR auf dem Betrieb

**Tabelle 42: Häufigkeit der einzelnen Clostridien Spezies (*C. perfringens*, *C. novyi*, *C. botulinum*, *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. difficile*) in Kot und Pansensaft**

Clostridienart	Fallbetriebe (n = 21)				Kontrollbetriebe (n = 10)				Gesamt
	Falltiere (n= 93)		Kontrolltiere (n= 93)		Falltiere (n=49)		Kontrolltiere (n=49)		
	Kot	Pansensaft	Kot	Pansensaft	Kot	Pansensaft	Kot	Pansensaft	
<i>C. perf.</i>	11	2	15	1	12	1	12	1	55
<i>C. novyi</i>	5	2	2	0	3	0	4	3	19
<i>C. botul.</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	2
<i>C. spp.</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1

*C. perf.* = *C. perfringens*; *C. botul.* = *C. botulinum*; *C. spp.* = *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. difficile* (Der nachgewiesene Fund war *C. haemolyticum*)

Im Rahmen dieser Studie wurde bei den beprobten Kühen *C. perfringens* in 15,6 % auf Fallbetrieben und in 26,5 % auf Kontrollbetrieben gefunden. *C. novyi* wurde in 4,8 % auf Fallbetrieben und in 10,2 % auf Kontrollbetrieben gefunden. *C. botulinum* (Typ B) fand sich in 1,1 % der Proben auf einem Fallbetrieb und 0 % auf Kontrollbetrieben. *C. haemolyticum* wurde nicht auf Fall- und in einem Prozent auf Kontrollbetrieben nachgewiesen (Tab 42). Es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den einzelnen Clostridien Spezies bezüglich den Fall- und Kontrolltieren sowie Kot- und Pansensaftproben auf Fall- und Kontrollbetrieben. Ebenfalls ergaben sich nur p-Werte > 0,05 für Kot- und Pansensaftproben bei Fall- und Kontrolltieren.

Die Aufteilung der Clostridien Funde nach der Probenart wurde in Tab. 43 und 44 dargestellt. In Fallbetrieben wurden 85,0 % der Clostridienfunde im Kot und 15,0 % im Pansensaft nachgewiesen. In den Kontrollbetrieben stammten 86,5 % der Funde aus dem Kot und 13,5 % aus dem Pansensaft (Fall-/Kontrollbetrieb: p = 0,852; Chi-Quadrat-Test).

**Tabelle 43: Häufigkeit der Clostridien Nachweise im Kot**

Fallbetriebe (n = 21; 186 Proben)		Kontrollbetriebe (n = 10, 98 Proben)	
34 Funde		32 Funde	
Falltiere	Kontrolltiere	Falltiere	Kontrolltiere
47,1 %	52,9 %	46,9 %	53,1 %
p = 0,988 (Chi-Quadrat)			

**Tabelle 44: Häufigkeit der Clostridien Nachweise im Pansensaft**

Fallbetriebe (n = 21; 186 Proben)		Kontrollbetriebe (n = 10, 98 Proben)	
6 Funde		5 Funde	
Falltiere	Kontrolltiere	Falltiere	Kontrolltiere
83,3 %	16,7 %	20,0 %	80,0 %
p = <b>0,036</b> (Chi-Quadrat)			

Die Clostridienfunde aus dem Pansensaft zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Fall- und Kontrolltieren der Fall- und Kontrollbetriebe. Bei den Fallbetrieben wurden die meisten Proben bei Falltieren gefunden, wohingegen bei den Kontrollbetrieben in den meisten Fällen die Clostridien bei Kontrolltieren zu finden waren (Tab.44).

In einem Betrieb (Kategorie zwei Fallbetrieb), der gegen *Clostridium* spp. (exkl. *C. botulinum*) geimpft hatte, konnten bei der bakteriologischen Untersuchung keine Clostridien nachgewiesen werden.

#### **Clostridienfunde beim Einzeltier in Kot und Pansensaft gleichzeitig:**

Die 77 Clostridien Funde waren auf 68 Tiere verteilt, sechs der Tiere (8 %) hatten Clostridien in Kot und Pansensaft, wobei zwei der Tiere aus Fall- und vier Tiere aus Kontrollbetrieben stammten.

#### **Verschiedene Clostridien Spezies gleichzeitig im Kot von Einzeltieren:**

Drei Tiere (4 %) hatten verschiedene Clostridienarten im Kot. Hier stammten zwei der Kühe aus Fallbetrieben und eine Kuh aus einem Kontrollbetrieb.

#### **Clostridienfunde bei Kühen bezogen auf die verfütterte Silage**

Insgesamt wurden in 73,3 % der Silagen Clostridien Spezies bei den Kühen der zugehörigen Betriebe gefunden, davon 45,5 % in „guten“ und 54,5 % in „schlechten“ Silagen (p = 0,151; Chi-Quadrat). Bezogen auf die einzelnen Betriebskategorien wurden in den Fallbetrieben (n = 20) in 50 % der „guten“ Silagen und in 80 % der „schlechten“ Silagen Clostridien Spezies bei Kühen nachgewiesen. In den Kontrollbetrieben (n = 10) wurden in 83,3 % „guter“ Silage und in 100 % „schlechter“ Silage Clostridien Spezies bei Kühen nachgewiesen. Es bestand weder bei „guter“ Silage (p = 0,182; Chi-Quadrat) noch bei „schlechter“ Silage (p = 0,334; Chi-Quadrat) ein statistisch signifikanter Unterschied bei den

Clostridienfunden bei Kühen auf Fall- und Kontrollbetrieben (Tab. 45).

**Tabelle 45: Silagequalität der Betriebe bezogen auf die Clostridienfunde bei den Kühen**

Clostridien Funde bei Kühen	Fallbetriebe (n = 20 <sup>1)</sup> )		Kontrollbetriebe (n = 10)	
	„Gute“ Silage	„Schlechte“ Silage	„Gute“ Silage	„Schlechte“ Silage
ja	5	8	5	4
nein	5	2	1	0
p-Wert	0,605 (Chi-Quadrat)			

Jedem Betrieb wurde eine Silagequalität (n = 30) zugeordnet (siehe III.6)

<sup>1)</sup> bei einem der Fallbetriebe konnten die Silagen nicht sensorisch beurteilt werden und somit keine Silagequalität zugeordnet werden

### Nachweis von *C. perfringens*

In 96,4 % der *C. perfringens* Funde wurde Toxintyp A und in jeweils 1,8 % der Toxintyp D und E nachgewiesen (Tab. 46).

**Tabelle 46: Häufigkeit der gefundenen *C. perfringens* Toxintypen**

Toxintyp von <i>C. perfringens</i>	Gesamtfunde (n)	Fallbetriebe (n = 21; 29 Funde)	Kontrollbetriebe (n = 10; 26 Funde)	Prozent (%)
A	53	27	26	96,4
B	0	0	0	0
C	0	0	0	0
D	1	1	0	1,8
E	1	1	0	1,8
Prozent (%)		52,7	47,3	100

### Ergebnisse des Robert-Koch-Instituts

Die nochmaligen Untersuchungen der beiden positiven *C. botulinum* real-time PCRs bei unserer Studie am RKI ergaben folgende Ergebnisse: In den Seren konnte kein BoNT nachgewiesen werden. Bei beiden Tieren konnte weder im Kot, noch im Pansensaft *C. botulinum* nachgewiesen werden. Aus beiden Pansensaft-Proben sowie einer Kotprobe konnte ein atoxischer *C. botulinum* Gruppe II-Stamm (ohne BoNT-Gene) isoliert werden.

### 3.3. Parasitologische Untersuchung

Es wurden insgesamt 1,4 % parasitologisch positive Kühe gefunden. Davon stammten 1,6 % der positiven Proben aus Fallbetrieben und 1 % aus Kontrollbetrieben (Tab. 47).

**Tabelle 47: Anzahl und Art der parasitologischen Funde auf den Betrieben**

Proben	Fallbetriebe (n = 21)		Kontrollbetriebe (n = 10)	
	Falltier (n=93)	Kontrolltier (n=93)	Falltier (n=49)	Kontrolltier (n=49)
284	1Tier <i>Trichostrongylidae</i>	1 Tier <i>Moniezia</i>	1Tier <i>Eimeria spp.</i>	0
	1Tier <i>Trichostrongylidae</i> <i>Nematodirus</i> <i>Bandwurm</i>			

### 3.4. Blut- Laborparameter

Der Mittelwert der Glutathionperoxidase-Aktivität liegt in Fallbetrieben statistisch signifikant niedriger als in Kontrollbetrieben. Nach klinikinternem Standard war sie bei über 97 % der geprüften Kühe aber ausreichend (Tab. 48 und 49). Bezüglich der Werte von Gesamteiweiß und Hämoglobin bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben (Tab. 48, 50 und 51).

Die Anzahl an Tieren mit einem Glutartest unter drei Minuten war bei Fall- und Kontrollbetrieben in etwa ausgeglichen (Tab. 52).

**Tabelle 48: Häufigkeit und Durchschnittswerte der getesteten Blut-Laborparameter (Glutathionperoxidase-Aktivität, Gesamteiweiß, Hämoglobin)**

Parameter	Fallbetriebe (n=21)			Kontrollbetriebe (n=10)			p-Wert T-Test
	Tierzahl (n)	MW	SD	Tierzahl (n)	MW	SD	
Glutathionperoxidase-Aktivität (U / g Hb)	164	530,6	132,1	90	585,1	149,6	<b>0,004</b>
Gesamteiweiß (g / l)	174	71,0	7,0	98	70,9	5,7	0,938
Hämoglobin (g / dl)	162	9,7	1,4	88	9,7	1,3	0,850

**Tabelle 49: Anzahl Tiere mit erniedrigter / normaler Glutathionperoxidase-Aktivität in den unterschiedlichen Kategorien**

	Anzahl Tiere mit erniedrigter Glutathionperoxidase Aktivität ( $\leq 250$ U / g Hb)	Prozent (%)	Anzahl Tiere mit normaler Glutathionperoxidase Aktivität ( $> 250$ U / g Hb)	Prozent (%)	p-Wert
<b>Fallbetriebe</b> (n=21; 164 Tiere)	4	2,4	160	97,6	0,466 (Chi-Quadrat)
<b>Kontrollbetriebe</b> (n= 10; 90 Tiere)	1	1,1	89	98,9	

Referenzwerte nach klinikinternem Standard

**Tabelle 50: Anzahl Tiere mit erniedrigtem / normalem / erhöhtem Gesamteiweiß in den unterschiedlichen Kategorien**

	Anzahl Tiere mit erniedrigtem Gesamteiweiß ( $< 60 \text{ g/l}$ )	Prozent (%)	Anzahl Tiere mit normalem Gesamteiweiß ( $60-80 \text{ g/l}$ )	Prozent (%)	Anzahl Tiere mit erhöhtem Gesamteiweiß ( $> 80 \text{ g/l}$ )	Prozent (%)	p-Wert
<b>Fallbetriebe</b> (n= 21; 174 Tiere)	3	1,7	152	87,4	19	10,9	0,418
<b>Kontrollbetriebe</b> (n= 10; 98 Tiere)	2	2,0	90	91,8	6	6,1	(Chi-Quadrat)

Referenzwerte nach klinikinternem Standard

**Tabelle 51: Anzahl Tiere mit erniedrigtem / normalem / erhöhtem Hämoglobingehalt in den unterschiedlichen Kategorien**

	Anzahl Tiere mit erniedrigtem Hämoglobingehalt ( $<10 \text{ g/dl}$ )	Prozent (%)	Anzahl Tiere mit normalem Hämoglobingehalt ( $10-13 \text{ g/dl}$ )	Prozent (%)	Anzahl Tiere mit erhöhtem Hämoglobingehalt ( $>13 \text{ g/dl}$ )	Prozent (%)	p-Wert
<b>Fallbetriebe</b> (n= 21; 162 Tiere)	94	58,0	67	41,4	1	0,6	0,571
<b>Kontrollbetriebe</b> (n= 10; 88 Tiere)	47	53,4	41	46,6	0	0	(Chi-Quadrat)

Referenzwerte nach klinikinternem Standard

**Tabelle 52: Anzahl Tiere mit aussagekräftig niedrigem / nicht aussagekräftig niedrigem bis normalem Glutartestes in den unterschiedlichen Kategorien**

	Anzahl Tiere mit zu niedrigem Glutartest ( $\leq 3$ min)	Prozent (%)	Anzahl Tiere mit niedrigem bis normalem Glutartest ( $> 3$ min)	Prozent (%)	p-Wert
<b>Fallbetriebe</b> (n= 21; 159 Tiere)	17	10,7	142	89,3	0,759 (Chi-Quadrat)
<b>Kontrollbetriebe</b> (n=10; 92 Tiere)	11	12	81	88	

Referenzwerte nach klinikinternem Standard

## V. DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es, Erkenntnisse zur klinischen Bedeutung verschiedener pathogener Clostridien Spezies in bayerischen Milchviehherden zu gewinnen. Clostridien sind ubiquitär vorkommende Umweltkeime, die im Gastrointestinaltrakt gesunder Menschen und Tiere nachgewiesen werden, aber auch ein pathologisch wirksames Potential besitzen können (KAHN, 2010; KRÜGER, 2010; KRÜGER et al., 2014). BÖHNEL et al. (2001) vermuteten, dass *C. botulinum* und dessen Toxine in Form einer sogenannten Toxinfektion (Vermehrung des Erregers im Darm mit fortlaufender Toxinproduktion) eine Ursache für die starke Beeinträchtigung der Herdengesundheit von Milchkühen darstellen könnten. Daher wurde der Fragestellung nachgegangen, ob in Milchviehherden mit gesundheitlichen Problemen *C. botulinum* oder auch andere pathogene Clostridienarten häufiger vorkommen als in Beständen ohne die von verschiedenen Autoren beschriebenen Symptome.

Bei den in dieser Fall-Kontroll-Studie verwendeten Inklusionskriterien gab es Abweichungen von den Einschlusskriterien des „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“. Die Abänderungen fanden bezüglich den Betrieben mit Anbindehaltung statt, da diese Haltungform in Bayern noch weit verbreitet ist (SPRENGEL, 2009) und es für eine repräsentative Erhebung erforderlich schien, diese nicht auszuschließen. Genauso wurde die Grenze der Anzahl laktierender Kühe auf 20 pro Betrieb festgesetzt statt – wie im „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ auf 30 – da sonst viele kleinere Betriebe in Bayern ebenfalls nicht hätten berücksichtigt werden können. Kontrollbetriebe zu rekrutieren war schwierig, da gut geführte Betriebe kaum Interesse an umfangreichen und zeitaufwendigen Untersuchungen hatten, Bedenken hinsichtlich möglicher Gefahren für die Tiere durch die Untersuchungen anführten oder die Inklusionskriterien nicht erfüllten. Somit war es trotz wiederholter Aufrufe nicht immer möglich, innerhalb eines Praxisgebiets zu Fallbetrieben in Größe und Struktur vergleichbare Kontrollbetriebe zu finden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass alle Betriebe, unabhängig ihrer Einteilung in Fall- und Kontrollbetriebe, bei der Haltung und den hygienischen Bedingungen (anhand der Herdenindices) unterhalb der in der Literatur beschriebenen Zielwerte lagen. Dennoch schnitten die Kontrollbetriebe in diesen Kategorien meist besser ab (teilweise statistisch signifikant) als die

Fallbetriebe. Es konnte jedoch kein statistisch abgesicherter direkter Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des Nachweises pathogener Clostridienarten und schlechten Hygienebedingungen in bayerischen Milchviehbetrieben hergestellt werden. Als mögliche Kriterien für die Stratifizierung konnten vor allem Faktoren im Management, der Haltung und Hygiene identifiziert werden, wie nachfolgend näher erläutert wird.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der allgemeinen Herdencharakteristika fiel auf, dass in unserer Studie knapp 30 % der Betriebe ihre Kühe in Anbindehaltung ohne Auslauf oder Weide hielten. Bayernweit waren es 2009 noch 65 %, was sich in den letzten Jahren unter Umständen weiter reduziert haben könnte. Dieser sicherlich trotzdem noch vorhandene Unterschied kam wahrscheinlich durch das zu erfüllende Inklusionskriterium von mindestens 20 laktierenden Kühen im Betrieb zustande, da tendenziell in eher kleinen älteren Betrieben Tiere in Anbindehaltung gehalten werden. Genauso könnte dies, zusammen mit der Voraussetzung der monatlichen Milchleistungsprüfung (MLP), auch ein Grund für die über dem bayernweiten Schnitt liegende Tiergesamtzahl der teilgenommenen Betriebe darstellen. Alle Studienbetriebe wurden konventionell bewirtschaftet. In Anbindehaltung lag der Durchschnitt in den Fallbetrieben bei 34,0 und in den Kontrollbetrieben bei 37,5 Kühen, der bayernweite Schnitt bei konventioneller Bewirtschaftung lag 2009 nur bei 25,7 Kühen. In den Laufställen der Fallbetriebe wurden durchschnittlich 67,6 und der Kontrollbetriebe 70,8 Kühe gehalten, wobei der bayrische Schnitt 2009 bei konventioneller Bewirtschaftung bei 51,1 Kühen lag (SPRENGEL, 2009). Im Laufstall scheint die Mindestanzahl von 20 laktierenden Kühen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Das Durchschnittsalter der Kühe in Anbindehaltung belief sich auf fünf, bayernweit auf 4,8 Jahre. Im Laufstall lag es mit 4,7 Jahren im Vergleich zum bayernweiten Schnitt sogar etwas darunter (SPRENGEL, 2009).

Die Auswertung des Betriebsfragebogens zeigte, dass die meisten Landwirte gemäß den Tierschutzleitlinien zweimal im Jahr Klauenpflege bei allen Kühen des Bestandes selbst durchführten, oder durchführen ließen. In Problembeständen allgemein wird die Klauenpflege sowie eine Kontrolle der Klauen- und Gliedmaßengesundheit und ggf. Pflege- und Behandlungsmaßnahmen sogar häufiger gefordert (RINDERHALTUNG, 2007). Die Kühe der Fallbetriebe wiesen trotz Erfüllung der Tierschutzleitlinien bei gleicher Klauenpflege

(halbjährlich) statistisch signifikant höhere Lahmheitsscores auf als in den Kontrollbetrieben. Die Referenzwerte nach DE KRUIF et al. (2013) (mind. 70 % lahmheitsfrei gehende Kühe je Betrieb) konnten zusammenfassend jedoch weder von Fall- noch von Kontrollbetrieben eingehalten werden. Ungefähr die Hälfte aller Kühe aus Laufstallbetrieben ging nicht lahmheitsfrei. Im Vergleich zu den angewandten Referenzwerten schlägt die European Food Safety Authority sogar eine maximale Prävalenz von 10 % wahrnehmbar lahmer Kühe im Betrieb vor (EFSA, 2009). Im „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ fiel die Quote an lahmen Tieren sogar noch höher aus. Auf Fallbetrieben ging durchschnittlich 2/3 der Herde nicht lahmheitsfrei. Die Prävalenz lahmer Tiere auf Kontrollbetrieben war mit ca. 60 % ebenfalls hoch (BREVES, 2014).

Zur Beurteilung des Lahmheitsgrades für Tiere in Anbindehaltung lagen keine Referenzwerte vor. Anhand der Kriterien „Trippeln“ und „Entlasten einer Gliedmaße“ konnte keine klare Aussage über den Lahmheitsgrad der Tiere getroffen werden, weshalb die Auswertung nicht berücksichtigt wurde. Zudem trippelten viele Kühe bei Unruhe im Stall auch ohne zugrundeliegende Gliedmaßenproblematik.

Um als Falltiere zu gelten, mussten Kühe zur schlechten Körperkondition und dem chronisch kranken Habitus ein weiteres Zusatzkriterium erfüllen. Dieses war sowohl in Fall- als auch in Kontrollbetrieben zu über 50 % und somit am häufigsten „höhergradige Lahmheit“. Der Locomotion Score wurde bei jeder Kuh erhoben und war somit ein offensichtlicheres Kriterium als die übrigen Zusatzkriterien. Je nach Lichtverhältnis und Bewegung in der Herde war es deutlich schwieriger, z. B. gestaute Venen oder eine sensorische Störung zu beurteilen. Auf diese Punkte wurden bei der Einzeltieruntersuchung näher eingegangen und somit ggf. weitere Zusatzkriterien vermerkt. Ein noch deutlicheres Ergebnis als in unserer Studie wurde beim „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ erzielt. Mit über 80 % war die „höhergradige Lahmheit“ das häufigste Zusatzkriterium bei den Verdachtstieren (BREVES, 2014). Lahme Kühe sinken in der Rangordnung ab, geben im Laufe der Zeit weniger Milch, nehmen anfangs in der kurzen Zeit, in welcher sie am Trog stehen, zwar noch möglichst viel Futter auf, später verringert sich die Futteraufnahme aber und sie magern ab. Lahme Kühe sind anfälliger für Fruchtbarkeitsstörungen, entwickeln Mastitiden und Stoffwechselerkrankungen und weisen eine verkürzte

Nutzungsdauer auf (GASTEINER, 2005; EFSA, 2009). Das Symptom Lahmheit begünstigt somit eine Reihe weiterer Faktoren, wovon folgend einige näher beschrieben werden. COOK et al. (2004) erfassten, dass in immer mehr Studien ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Steh- und Liegezeit und Lahmheit beschrieben wird. Aus Angst vor dem Abliege- und Aufstehvorgang verlängern sich die einzelnen Steh- und Liegezeiten lahmer Kühe häufig.

Die Boxenmaße und damit verbunden der Kuhkomfort waren sowohl in Fall- als auch in Kontrollbetrieben unzureichend. Ein Großteil der Boxen sowohl in Fall- als auch in Kontrollbetrieben war zu kurz und schmal. Darüber hinaus boten viele Boxen einen zu kleinen Kopfraum. Die Formel für die Kopfraumgröße von KNIERIM und WINCKLER (2002) wurde von unserer Studie modifiziert. Aus der Formel der genannten Autoren wurde, mit der von uns durchschnittlich gemessenen Widerristhöhe der Kühe, eine fixe Zahl für den Kopfraum errechnet. In Folge der unzureichenden Boxenmaße werden ein verletzungsfreies Abliegen, Ruhen und Aufstehen behindert (KANSWOHL, 2008). Durch schmerzfreies, komfortables und somit längeres Liegen wird die Milchleistung positiv beeinflusst, denn eine liegende Kuh hat eine deutlich höhere Euterdurchblutung als ein stehendes Tier (METCALF et al., 1992).

Die Maße der Stände in Anbindehaltung erwiesen sich als nicht auswertbar. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen an Kontrollbetrieben ( $n = 2$ ) und der zusätzlichen Unterteilung in Kurz-, Mittel- und Langstand standen nicht genügend Abteile für eine repräsentative Auswertung zur Verfügung.

Im Laufstall spiegelte sich die Qualität der Liegeboxen auch beim Hygienescore wieder, da bei einem erschwerten Aufsteh- und Abliegevorgang Kot- und Harnabsatz häufig im Liegen stattfinden (BOGNER und GRAUVOGEL, 1984). In den Fallbetrieben mit Anbindehaltung waren die Euter, Beine und Flanken statistisch signifikant schmutziger als in den dazugehörigen Kontrollbetrieben. Dies lässt aufgrund der geringen Anzahl Betriebe nur schwer Rückschlüsse auf das Management zu. Verschmutzung kann in Anbindehaltung auch durch lange Liegeflächen verursacht werden, was durchaus positiv im Sinne des Tierschutzes zu werten wäre. Im Laufstall der Fallbetriebe traten ebenfalls statistisch signifikant schmutzigere Beine und Flanken auf als in den Kontrollbetrieben. In beiden Haltungformen waren die Tiere sowohl der Fall- als auch der Kontrollbetriebe deutlich schmutziger als COOK und REINEMANN (2007)

vorschlugen. Im „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ erfüllten die Betriebe beider Kategorien die empfohlenen Anforderungen für die Sauberkeit der Tiere ebenfalls nur in Ausnahmefällen. Die Tiere der Fallbetriebe waren durchschnittlich ebenfalls stärker verschmutzt als die Tiere der Kontrollbetriebe (BREVES, 2014). Die Kontamination der Tiere mit Kot spiegelte sich ferner in der Milchzellzahl wieder. Der Mittelwert der somatischen Zellen lag bei Fallbetrieben signifikant höher als bei Kontrollbetrieben. Betriebe ohne Euterprobleme sollten  $< 150\,000$  Zellen / ml Milch im Jahresmittel haben, auch wenn die Beurteilung der Eutergesundheit anhand der Tankmilchzellzahl nur begrenzt möglich ist. In der vorliegenden Studie hatten weder Fall- noch Kontrollbetriebe diesen Zielwert erreicht. Eine gestörte Eutergesundheit verursacht hohe Verluste (DE KRUIF et al., 2013). Dies könnte auch ein Grund für die erhöhten Abgangszahlen in 80,9 % der Fallbetriebe sein. Ebenfalls die Klauen- und Beinhygiene beeinflussend, in dieser Studie jedoch nicht bewertet, sind das Stalldesign und die Häufigkeit der Laufgangreinigung (COOK, 2002). Der Faktor der Belegungsdichte wird später noch ausführlich diskutiert. Neben der unterschiedlichen Pflege des Stalles (Boxen, Laufgang usw.) durch das Personal, kann sowohl der Einsatz chemischer Produkte als auch die Gestaltung des Liegeplatzes (z. B. Menge und Art der Einstreu, Dicke und Zustand der Gummimatten) Einfluss auf die Herdenindices nehmen. Damit wären auch trotz unzureichender Boxenmaße bei Fall- und Kontrollbetrieben die unterschiedlich starken Integumentschäden zu erklären. Die Kühe in den Laufställen der Fallbetriebe zeigten signifikant stärkere Integumentschäden an den hervorstehenden Knochenpunkten der Steuerelemente als die Tiere in den Kontrollbetrieben. Bei den hervorstehenden Knochenpunkten der Liegefläche ergaben sich keine statistisch signifikanten Differenzen. Ähnlich verhielt es sich beim „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“. Die Bonitur ergab bei den Fallbetrieben mehr Hautläsionen als bei den Kontrollen, jedoch an den hervorstehenden Knochenpunkten von Liegefläche und Steuerelemente (BREVES, 2014). In der Anbindehaltung wurden die gleichen Referenzwerte für die hervorstehenden Knochenpunkte gewählt wie im Laufstall, da eine vergleichbare Scala für die Anbindehaltung in der Literatur nicht gefunden wurde. Es ist denkbar, dass durch unterschiedliche Haltungsbedingungen verschieden starke Integumentschäden an unterschiedlichen Stellen vorkommen, was jedoch den Vergleich zwischen Fall- und Kontrollbetrieben nicht beeinträchtigte. Dieser zeigte hier ein umgekehrtes Verhalten als im Laufstall. Die Kühe der

Kontrollbetriebe wiesen signifikant stärkere Integumentschäden an den hervorstehenden Knochenpunkten der Steuerelemente auf als die Tiere der Fallbetriebe. Bei den hervorstehenden Knochenpunkten der Liegefläche ergaben sich, wie schon im Laufstall, keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen Fall- und Kontrollbetrieben. Die Ergebnisse unserer Studie deckten sich auch mit den Erkenntnissen von NUSS und WEIDMANN (2013), wonach Lahmheit und dadurch häufigeres Liegen der Tiere einen negativen Einfluss auf Liegeschäden und Verschmutzung hat. Das Liegen schien sich für manche Tiere in Anbetracht der Überbelegung in den Ställen eher schwierig zu gestalten, weshalb einige Kühe in den Laufgängen ruhten und wiederum schmutziger waren als andere. Zwar sollten in Neubauten jedem Tier mindestens eine Liegebox zur Verfügung stehen (RINDERHALTUNG, 2007), anzustreben wäre sogar ein Tier-Liegeboxenverhältnis  $< 1:1$  (KNIERIM und WINCKLER, 2002), damit alle Tiere gleichzeitig ungestört ruhen können, in der Realität waren jedoch die meisten Ställe überbelegt und zwar nicht nur in Altbauten. Eine Milchkuh versucht 50 - 60 % ihrer Zeit täglich mit Liegen zu verbringen, was wichtig für die Erholung und dem Erhalt ihrer Leistung ist (NUSS und WEIDMANN, 2013). Diese Leistung scheint sich in Fall- und Kontrollbetrieben in vielerlei Hinsicht noch verbessern zu lassen. In dieser Studie war das Kuh-Liegeplatzverhältnis in den Fallbetrieben etwas besser als in den Kontrollbetrieben, das Kuh-Fressplatzverhältnis war zwischen den Kategorien ausgeglichen, jedoch bei beiden kam es zu einer leichten Überbelegung. Ähnliche Ergebnisse wurden im „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ verzeichnet (BREVES, 2014).

Laut Tierschutzleitlinie für Milchkühe muss grundsätzlich für jedes Tier mindestens ein Fressplatz zur Verfügung stehen, wobei unter bestimmten Bedingungen davon abgewichen werden kann (RINDERHALTUNG, 2007). Die Gestaltung des Fressplatzes ist für die Gesundheit der Tiere und die aufgenommene Futtermenge von entscheidender Bedeutung. Hochleistungskühe nehmen bei einer *ad libitum* Fütterung ca. 12 mal am Tag für 25 Minuten Grundfutter auf (RINDERHALTUNG, 2007). Als Herdentiere neigen Kühe dazu, ihr Verhalten zu synchronisieren, sobald ihnen die Möglichkeit dazu gegeben wird (BARTH, 2011), weshalb ein Tier-Fressplatzverhältnis von mehr als 1:1 als ungünstig zu werten ist.

Die Aufnahmemenge und Qualität des Futters haben einen direkten Einfluss auf

die Körperkondition der Tiere. Bei Fleckvieh Kühen in Anbindehaltung lag sowohl in Fall- als auch in Kontrollbetrieben ungefähr die Hälfte aller Kühe entsprechend ihres Laktationsstadiums im vorgeschlagenen Bereich des BCS. Bei Fleckvieh Kühen im Laufstall lagen in den Kontrollbetrieben statistisch signifikant mehr Kühe im oder unter dem vorgeschlagenen BCS Bereich als in den Fallbetrieben. Im Umkehrschluss lag der BCS der Laufstallkühe aus Fallbetrieben häufiger über dem vorgeschlagenen Referenzbereich als in den Kontrollbetrieben. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass weniger Fallbetriebe von jeder Charge Grundfutteranalysen und Rationsberechnungen durchführen ließen. Die Kontrollbetriebe, die geringere sensorische Abweichungen der Silagen hatten, deutlich häufiger von jeder Charge Grundfutteranalysen und auch statistisch signifikant häufiger Rationsberechnungen durchführen ließen, hatten zwar mehr Kühe im Normbereich des BCS aber auch mehr unterkonditionierte Tiere. Sowohl die starke Überkonditionierung als auch Unterkonditionierung können gesundheitliche Probleme nach sich ziehen. Bei zu mageren Tieren sind die Fruchtbarkeit und Milchleistung deutlich herabgesetzt, bei verfetteten Tieren kommt es durch verringerte Futteraufnahme zu einer starken Beanspruchung der Körperreserven, was bei deren Erschöpfung ebenfalls häufig mit Stoffwechsel- und Fruchtbarkeitsstörungen sowie Lahmheiten einhergeht (HEUWIESER und MANSFELD, 1992). Dies war auch bei den Fallbetrieben sichtbar. Dort gab es mehr überkonditionierte Tiere und statistisch signifikant mehr Lahmheiten als in den Kontrollbetrieben.

Wie schon erwähnt beeinflussen Qualität und Menge des Futters neben vielen anderen Faktoren die Milchleistung und die Milchinhaltsstoffe. Die Milchmenge wird v. a. durch die Rasse und die genetische Auswahl durch die Betriebsleiter beeinflusst, wodurch natürlicherweise höher und niedriger leistende Betriebe entstehen. Analysiert mithilfe eines gemischten Modells (Proc Mixed), ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Milchleistung zwischen Kühen in Fall- und Kontrollbetrieben, wenn man für die Faktoren wie Haltungform, Tage in Milch und Laktationsnummer korrigiert. Der Milchleistungsabfall, welcher bei der Kategorisierung in Fall- und Kontrollbetriebe eine Rolle spielte, stellte eines der fünf Inklusionskriterien für Fallbetriebe dar. Milchleistungsabfall über mindestens drei aufeinanderfolgende Monate war das am seltensten erfüllte

Inklusionskriterium (3 Betriebe; 14,3 %). Zwei dieser betroffenen Betriebe hielten Schwarzbunte Kühe und Kreuzungen davon, teilweise gemischt mit Rotbunten oder Braunvieh Kühen, ein Betrieb hielt Fleckvieh Kühe und Kreuzungen davon. Da von allen Fall- und Kontrollbetrieben nur vier Betriebe Schwarzbunte (oder von der Leistung vergleichbare) Kühe hielten, wovon drei der Betriebe Fallbetriebe waren und nur einer ein Kontrollbetrieb (mit niedriger Leistung), war der Milchleistungsabfall im Vergleich zu den anderen Betrieben für diese beiden Fallbetriebe nicht aussagekräftig. Der Betrieb mit den Fleckvieh und Fleckviehkreuzungs-Kühen erzielte trotz Milchleistungsabfall eine höhere Jahresdurchschnittsleistung als der Median der Fall- und Kontrollbetriebe für Fleckvieh und Fleckvieh Kreuzungen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Einteilung in Fall- und Kontrollbetriebe nur vom Milchleistungsabfall und nicht von dessen Niveau abhing, was bedeutet, dass ein Kontrollbetrieb durch die bereits angesprochene Rasse, Züchtung und andere Faktoren auch durchgehend eine niedrigere Milchleistung haben konnte als ein Fallbetrieb nach dem Leistungsabfall. Weitere Faktoren, welche die Milchmenge in unterschiedlichem Maße beeinflussen können, sind der Kuhkomfort (mit Boxenmaßen) und die Überbelegung des Stalles, was die Liegedauer der Kuh und somit wiederum die Euterdurchblutung beeinflusst (METCALF et al., 1992). Lahmheit und die darauf folgenden Probleme wie z. B. Abmagerung und Stoffwechselstörungen gehen ebenfalls, wie bereits erwähnt, mit einer verringerten Milchleistung einher (GASTEINER, 2005; EFSA, 2009). Um eine optimale Milchleistung zu gewährleisten, muss auch eine ausreichende Wasserversorgung sichergestellt sein. Die Beurteilung dieses Parameters war für die gesamten Fall- und Kontrollbetriebe nicht sehr aussagekräftig, bot jedoch eine Tendenz. Jeder Stall hätte einzeln im Detail analysiert werden müssen, da die Wasserversorgung von der Positionierung, der Dimension sowie der Fördermenge der jeweiligen Tränken im Betrieb abhängig ist. Darüber hinaus war die Beurteilung u. a. durch variierende Tränkesysteme innerhalb eines Abteils erschwert. Die Sauberkeit der Tränken, ihre Anordnung, Anzahl sowie Anbringungshöhe und viele weitere Faktoren (RINDERHALTUNG, 2007) spielen ebenfalls eine Rolle bei der Beurteilung der Wasserversorgung. Daher kann deren Evaluation betriebsübergreifend nicht pauschalisiert werden. Die meisten dieser Faktoren wurden bei dieser Studie nicht berücksichtigt. Um jedoch eine Auswertung vorzunehmen und die Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben

aufzeigen zu können, wurden die verschiedenen Tränketechiken zusammengenommen und die Tränkeplätze pro Abteil berechnet. Dazu wurde aufgrund der weiten Spanne an Angaben in der Literatur von max. 20 Tieren / Einzeltränke (EILERS, Stand 25.04.2013) bis zu max. 7 Tieren pro Schalentränke, wenn nur diese zur Verfügung stehen (RINDERHALTUNG, 2007), ein Wert von 10 Tieren / Schalentränke verwendet. Die Ergebnisse lieferten Hinweise darauf, dass in den Laufstallabteilen der Fallbetriebe nur in 39,3 % und in den Abteilen der Kontrollbetriebe nur in 31,3 % die Wasserversorgung der Tiere vollkommen (bedeutet zu 100 %) ausreichend war. Bei der Betrachtung des Mittelwertes schnitten jedoch die Kontrollbetriebe mit einem Durchschnitt von 72,2 % ausreichender Wasserversorgung besser ab als die Fallbetriebe mit 65,6 %. Im „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ gab es durchschnittlich sowohl in Fall- als auch in Kontrollbetrieben ebenfalls zu wenige Tränkeplätze, wobei sich die Fall- und Kontrollbetriebe ebenfalls nicht voneinander unterschieden (BREVES, 2014). Wichtig zu wissen wäre die Lage der Tränken gewesen. Die Tiere sollten nach dem Melken und bevor sie fressen oder liegen Zugang zu Wasser haben, da etwa ein Drittel der täglichen Wasserration kurz nach dem Melken aufgenommen wird (RINDERHALTUNG, 2007; DE KRUIF et al., 2013). Umgekehrt betrachtet ist die Futter- und Wasseraufnahme auch abhängig vom Kuhkomfort, da Kühe aus unkomfortablen Liegeboxen weniger gerne aufstehen. Ebenso korreliert die aufgenommene Wassermenge mit dem Trockensubstanzgehalt des Futters (RINDERHALTUNG, 2007). Der richtige Gehalt an Trockensubstanz bei der Herstellung von Silage stellt eines der Kriterien für qualitativ gute Futterwerbung dar. Es muss darauf geachtet werden, eine gute Futterqualität zu gewährleisten und z. B. Schimmelbildung und eine Mykotoxinbelastung, genauso wie ein ungewolltes Bakterienwachstum zu verhindern. Futtermittel mit sauerstoffreduzierter Atmosphäre (z. B. Heulage, Mais- und Grassilage) stellen bei einem hohen Kontaminationsgrad eine ideale Brutstätte für *C. botulinum* dar (SEIFERT, 2004). Bei unserer Studie wurde bewusst auf eine Probenentnahme von Silage verzichtet, da Proben von der Anschnittsfläche der Silage nicht aussagekräftig für das gesamte Silo erschienen. Zudem wäre das momentan offene Silo beurteilt worden und nicht zwangsläufig das, welches verfüttert worden war und Symptome der Clostridiosen hätte hervorrufen können. Anhand der grobsinnlichen Beurteilung konnte festgestellt werden, dass hochgradig sensorische Veränderungen an der

Anschnittsfläche der Silagen eher selten beobachtet wurden, jedoch häufiger bei Fall- als bei Kontrollbetrieben. Bei Betrachtung der Silagequalität bezogen auf Clostridienfunde bei den Kühen der jeweiligen Betriebe zeigte sich jedoch, dass in 45,5 % der „guten“ und in 54,5 % der „schlechten“ Silagen Clostridien Spezies bei den Kühen nachgewiesen wurden. Bei der Nutzung von output aus Biogasanlagen zur Düngung von Nutzflächen zeichnete sich kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf Clostridienfunde ab, auch wenn etwas mehr Fall- als Kontrollbetriebe diesen Dünger nutzten. Die Hypothese von BÖHNEL und GESSLER (2010, 2012) zur technologischen Verbreitung des Botulismus-Erregers durch Gärrückstände bei der Biogasgewinnung und das damit verbundene Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier konnte somit in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Bei der Auswertung der analysierten Blutparameter ergaben sich nur bei den Ergebnissen der Glutathionperoxidase-Aktivität statistisch signifikante Differenzen, wonach bei den Tieren aus den Kontrollbetrieben höhere Aktivitäten gefunden wurden. Da die Glutathionperoxidase-Aktivität nach klinikinternem Standard bei über 97 % aller geprüften Kühe ausreichend war, wurde diesem Ergebnis in Bezug auf die Gesundheit der Kühe keine große Bedeutung beigemessen. Eine positive Auswirkung könnten die leicht höheren Werte der Kontrollbetriebe eventuell auf die Kälber haben, welche jedoch in dieser Studie nicht untersucht wurden.

Bei den Untersuchungen auf pathogene Clostridien Spezies mithilfe von real-time PCRs wurde in einem Großteil aller Betriebe mind. eine positive Probe nachgewiesen. Die Verteilung der Funde auf Fall- und Kontrolltiere sowie auf Fall- und Kontrollbetriebe ergab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied. Auf die beprobte Tierzahl hochgerechnet, wurden tendenziell eher mehr positive Ergebnisse auf Kontrollbetrieben gefunden. Es wurden dort deutlich weniger Tiere untersucht aber ähnlich viele Clostridien-Fälle gefunden. Anhand dieser Studie konnte zwischen Fall- und Kontrollbetrieben kein Zusammenhang zum Nachweis von Clostridien Spezies festgestellt werden. Im Folgenden wird näher auf die einzelnen pathogenen Clostridienarten eingegangen, die in dieser Studie nachgewiesen wurden. Die real-time PCR weist Gensequenzen der Bakterien nach, die für die Toxinbildung Voraussetzung sind. Bezogen auf *C. botulinum* greift diese Nachweismethode daher auf einer tieferen Ebene als der

ELISA und der Mausbioassay an, welche das Toxin selbst nachweisen. Dies geschieht bei den zuletzt genannten Methoden unabhängig davon, ob der Erreger sich im Körper des Tieres befindet oder das Toxin selbst (oral) aufgenommen wurde. Ob das Bakterium wirklich BoNT exprimiert, kann mit der real-time PCR wiederum nicht nachgewiesen werden. Eine Toxinproduktion im Körper eines Tieres, wie bei der beschriebenen Toxininfektion, setzt jedoch die Anwesenheit des dazugehörigen Erregers voraus, sonst müsste das Toxin oral aufgenommen worden sein. Die unerwartet geringe Anzahl an positiven *C. botulinum* Funden (2 Nachweise auf einem Fallbetrieb entspricht 0,7 % aller beprobten Tiere und 2,6 % aller Clostridien Funde) sowohl in „kranken“ als auch in „gesunden“ Milchviehbeständen deckte sich mit den Ergebnissen der Dissertation SCHMID (2014). Dort wurden in gesunden bayerischen Rinderbeständen 388 Kot- und Staubproben untersucht und nur ein positives PCR-Ergebnis (0,3 %) für *C. botulinum* Typ B in einer Staubprobe gefunden. Das „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ kam beim BoNT-Gen Nachweis mittels real-time PCR ebenfalls zu ähnlich niedrigen Ergebnissen. Von insgesamt 2818 Tierproben (1410 Pansensaft- und 1408 Kotproben) waren 96 Tierproben von 86 unterschiedlichen Tieren *C. botulinum* positiv. Somit erwiesen sich 6,19 % aller Tiere für eine der Neurotoxigen-Varianten als positiv (BREVES, 2014). Eine Möglichkeit für die wenigen Funde an *C. botulinum*, auch wenn es sich im Darmtrakt gesunder Tiere finden lässt (ROLLE und MAYR, 2007; KRÜGER, 2010; LINDSTRÖM et al., 2010; OZMEN et al., 2013), wäre, dass *C. botulinum* nicht kontinuierlich ausgeschieden wird und somit mittels PCR nicht immer nachweisbar wäre, auch wenn sich das Bakterium im Darmtrakt aufhält und BoNT produziert. Die real-time PCR für *C. botulinum* Typ A, B, E, F wies zudem eine hohe Sensitivität und Spezifität bei Lebensmittelproben auf. Ihre zuverlässige Nachweisgrenze lag bei  $10^2$  bis  $10^3$  KBE / ml Anreicherung (MESSELHÄUSSER, ZUCKER, ZIEGLER et al., 2007). Die Sensitivität und Spezifität einer PCR beziehen sich auf den Erreger und sind unabhängig vom Probenmaterial, weshalb sie auch für Tierproben wie Kot und Pansensaft gültig sind. Somit ist diese Nachweismethode preisgünstig, schnell und aussagekräftig in Bezug auf den Nachweis von Toxigenen. Der Mausbioassay hingegen ist teuer, langsam sowie arbeitsintensiv (SATTERFIELD et al., 2010) und es muss v. a. auch der Tierschutzaspekt berücksichtigt werden. Ferner könnte ein bisher als apathogen bzw. schwach pathogen eingestuftes *Clostridium* spp., welchem in den bisherigen

Untersuchungen keine Bedeutung beigemessen wurde, eine Rolle bei der Herdengesundheit von Milchkühen spielen. Die am häufigsten nachweisbare pathogene Clostridien Spezies war *C. perfringens* welche in 71,4 % von 77 Proben gefunden wurde. Bei 96,4 % der *C. perfringens* Nachweise handelte es sich um Toxintyp A. Im Rahmen dieser Studie wurde bei den beprobten Kühen *C. perfringens* in 15,6 % auf Fallbetrieben und in 26,5 % auf Kontrollbetrieben gefunden. In der Studie von GURJAR (2008) wurde ebenfalls zu 93 % *C. perfringens* Typ A nachgewiesen. Dass dort mit 78,5 % (241 positive PCR Ergebnisse in 307 Rinderkotproben) deutlich mehr *C. perfringens* Funde gemacht wurden als in unserer Studie, liegt wahrscheinlich daran, dass in unserer Studie nur von den auf der Agarplatte als *C. perfringens* identifizierten Kolonien eine real-time PCR gemacht wurde. Da *C. perfringens* auch in der normalen Darmflora von gesunden Tieren nachzuweisen ist (ROLLE und MAYR, 2007), wurde eine höhere Konzentration des Erregers bei einer klinischen Erkrankung vorausgesetzt, weshalb das Bakterium auch im Direktausstrich zu finden sein sollte. Das „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ identifizierte *C. perfringens* mittels 16S rRNA-Genanalyse mit 8,5 % am dritthäufigsten, wobei in unserer Studie auf die beiden in Hannover häufiger nachgewiesenen Spezies *C. sporogenes* und *C. cochlearium / tetani* nicht untersucht wurde. *C. perfringens* trat in etwa gleicher Häufigkeit in Fall- und Kontrollbetrieben auf (BREVES, 2014). Es besteht weiterhin Forschungsbedarf, ob und in wieweit dieses Bakterium eine Rolle bei einem chronischen Krankheitsgeschehen spielt. Die Anwesenheit von *C. perfringens* Stämmen im Gastrointestinaltrakt gesunder, lebender Tiere stellt selbst kein Risiko dar, kann jedoch durch eine Dysbiose zu einem Gesundheitsrisiko werden (GURJAR et al., 2008). Ob *C. perfringens* krankheitsauslösende Ursache beim lebenden Tier ist, ist schwer zu interpretieren. An Kadavern ist die Beurteilung jedoch ebenfalls schwierig, da sich der Erreger nach dem Tod unterschiedlich weiter vermehren kann.

Im Rahmen dieser Studie wurde ebenfalls *C. novyi* gefunden. Der Erreger wurde in 4,8 % auf Fallbetrieben und in 10,2 % auf Kontrollbetrieben nachgewiesen. Bei den hier durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen wurde kein *C. novyi* Wachstum in Reinkultur nachgewiesen, da die Kultivierung sehr schwer ist und die Isolierung aus der Begleitflora nicht gelang.

Von den parasitologisch untersuchten Milchkühen wurden 1,6 % positive Proben

auf Fallbetrieben und 1 % auf Kontrollbetrieben gefunden. Die geringe Häufigkeit positiver parasitologischer Befunde weist daraufhin, dass die Magen-Darm-Würmer keine bedeutende Rolle in bayerischen Betrieben zu spielen scheinen. Die Ausscheidungsextenstität von Magen-Darm-Strongyliden in Laufställen lag in der Studie von TANDLER (2005) je nach Jahreszeit zwischen 1 und 16 %. Die Ausscheidungshäufigkeit der *Monezia* spp. deckte sich mit 0 - 5 % (TANDLER, 2005). Weitere Gründe für die geringen parasitologischen Funde könnten sein, dass nur Kühe von einem Betrieb Weidegang hatten und ein Großteil der Tiere nur Silage und kein Grünfutter zu fressen bekam, was das Infektionsrisiko deutlich senkte. Eine Aussage über den Befall mit Lungenwürmern konnte nicht getroffen werden, da weder ein Auswanderverfahren noch ein Antikörpernachweis durchgeführt wurden.

Abschließend kann aus der vorliegenden Studie kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten toxinogener Clostridien Spezies und dem Gesundheitszustand ausgewählter Milchviehherden in Bayern hergestellt werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die heterogene Familie der *Clostridiaceae* besteht aus einer Reihe ubiquitär vorkommender Umweltkeime. Einige Spezies sind für Mensch und Tier pathogen, wobei besonders *C. botulinum* hervorzuheben ist. Dieses Bakterium produziert das potenteste, von der Natur gebildete Gift. Die Bedeutung der Clostridien bei verschiedenen Krankheitsbildern von Tieren ist noch nicht ausreichend geklärt. Aus diesem Grund war das Hauptziel dieser Studie, neue Erkenntnisse zur möglichen klinischen Bedeutung verschiedener pathogener Clostridien Spezies, insbesondere *C. botulinum*, in bayerischen Milchviehherden zu gewinnen.

Dazu wurden 2013 im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie bayernweit 31 Milchviehbetriebe besucht. Fallbetriebe (n = 21) mussten analog zum „Botulismus-Verbundprojekt TiHo“ mindestens drei von fünf Inklusionskriterien erfüllen: ein Milchleistungsabfall > 15 % in mindestens drei aufeinanderfolgenden Monaten, > 5 % euthanasierte oder verendete Kühe innerhalb der letzten zwölf Monate, > 35 % Abgänge (ohne Verkauf zur Zucht) innerhalb der letzten zwölf Monate, > 10 % festliegende Kühe innerhalb der letzten zwölf Monate und / oder eine subjektive Einschätzung einer erhöhten Krankheitsrate durch den Tierhalter. Als Kontrollbetriebe (n = 10) dienten landwirtschaftliche Betriebe, bei denen keines der genannten Kriterien erfüllt wurde. Im Rahmen der Bestandsanalyse wurden für die Datenerhebung verschiedene Fragebögen (entwickelt an der TiHo-Hannover) zu den Bereichen „Betrieb“, „Standort“, „Stall“, „Melkanlage / Melkroboter“, „Abteil“, „Laktationsgruppe“, „Silage“, „Eigene Untersuchung im Abteil“ und „Einzeltieruntersuchung“ verwendet. Des Weiteren wurde bei allen Kühen (laktierend und trockenstehend) des Betriebes Körperkondition, Habitus und Bewegungsscore sowie die relative laktationsstandabhängige Milchleistung im Vergleich zum Herdenschnitt beurteilt. Bei einer bestimmten Stichprobenanzahl wurden ebenfalls der Verschmutzungsgrad und die hervorstehenden Knochenpunkte bonitiert. Anhand dieser Beobachtungen wurde eine Rangliste hinsichtlich tierindividueller Weiteruntersuchungen erstellt: die 10 % der klinisch auffälligsten und die 10 % der klinisch unauffälligsten Milchkühe eines Bestandes (jedoch nicht mehr als 10 Tiere pro Betrieb) wurden einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Ferner wurden von diesen ausgewählten Tieren Proben (Blut, Pansensaft, Kot) für bakteriologische,

parasitologische sowie hämatologische Untersuchungen entnommen. Insgesamt wurden 284 Kühe beprobt, davon 186 in Fall- und 98 in Kontrollbetrieben.

Die Betriebe hielten überwiegend Fleckvieh Kühe und davon knapp 1/3 in Anbindehaltung. Der durchschnittliche Fallbetrieb besaß 51 Milchkühe mit einer Jahresmilchleistung von 7509 kg und der durchschnittliche Kontrollbetrieb hielt 54 Kühe mit einer Jahresleistung von 7337 kg Milch.

Die Ergebnisse der Herdenindices zeigten, dass die Kühe in Fallbetrieben bei gleicher halbjährlicher Klauenpflege statistisch signifikant stärker lahm gingen und an Bein und Flanke statistisch signifikant schmutziger waren als in den Kontrollbetrieben. Die Verschmutzung des Euters war hingegen nur in Fallbetrieben mit Anbindehaltung statistisch signifikant stärker als in den dazugehörigen Kontrollbetrieben. Bei allen Fallbetrieben wurde im Vergleich zu den Kontrollbetrieben jedoch eine statistisch signifikant höhere Milchzellzahl beim Einzeltier verzeichnet. Die Veränderungen an den Knochenpunkten der Steuerelemente waren in den Laufställen der Fallbetriebe ebenfalls statistisch signifikant stärker als in den Kontrollbetrieben, in Anbindehaltung verhielt es sich umgekehrt. Für die Integumentschäden im Bereich der Liegefläche genauso wie für die Boxenmaße der Fall- und Kontrollbetriebe ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Durchschnittlich lag die Hälfte der Kühe in Fall- und Kontrollbetrieben, unabhängig der Haltungsform, aber unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Rassen und Laktationsstadien, im Referenzbereich des BCS. Die Auswertung des Tränke-, Fress- und Liegeplatz-Verhältnisses zeigte, dass in allen Betrieben eine leichte Überbelegung herrschte.

Bei der subjektiven grobsinnlichen Beurteilung der Silage-Qualität ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben. Abgesehen von den Geruchsabweichungen bei knapp 60 % der Fallbetriebe waren ca. 2/3 aller Silagen unauffällig. Wenn man die Silagequalität hinsichtlich der Clostridienfunde bei den Kühen betrachtete, wurden in 45,5 % der „guten“ und in 54,5 % der „schlechten“ verfütterten Silagen Clostridien Spezies bei den Kühen der Betriebe nachgewiesen. Bei der bakteriologischen Untersuchung der Kot- und Pansensaftproben mittels real-time PCR zum Nachweis der verschiedenen Toxingene verteilten sich die Funde wie folgt: In 74,2 % der Betriebe wurden Clostridien (v. a. in Kotproben) gefunden, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied in der Nachweishäufigkeit zwischen Fall- und Kontrollbetrieben und

auch nicht zwischen Fall- und Kontrolltieren bestand. Die einzelnen Clostridien Spezies verteilten sich zu 71,4 % auf *C. perfringens* (größtenteils Typ A), 24,7 % *C. novyi*, 2,6 % *C. botulinum* (2 Tiere aus demselben Fallbetrieb) und 1,3 % auf *C. haemolyticum*.

Bei den erhobenen Laborparametern im Blut konnten keine größeren Abweichungen verzeichnet werden. Bei 1,4 % aller beprobten Kühe fiel die parasitologische Kotuntersuchung positiv aus.

Anhand dieser Studie konnte zwischen Fall- und Kontrollbetrieben kein Zusammenhang zum Nachweis von Clostridien Spezies mit dem Gesundheitsstatus der untersuchten Milchkühe festgestellt werden. Die Stratifizierung der Betriebe ergab sich am ehesten durch die Faktoren Management, Haltung und Hygiene. Die Fallbetriebe erzielten für den Lahmheitsscore, die Verschmutzung der Tiere, die Integumentschäden an den hervorstehenden Knochenpunkten der Steuerelemente sowie im Hinblick auf die Milchzellzahl und die Häufigkeit von Rationsberechnungen signifikant schlechtere Ergebnisse.

## VII. SUMMARY

*Clostridiaceae* is a heterogeneous group of bacteria and comprises a series of ubiquitous occurring environmental germs. Some of these species are pathogen for human and animal with particular emphasis on *C. botulinum*, which is able to produce the most toxic substance formed in nature. Since the significance of diseases in animals caused by *Clostridia* has not been evaluated with sufficient accuracy, the principal purpose of this study was to obtain new insights into the clinical significance of the different *Clostridium* species, especially *C. botulinum*, in Bavarian dairy herds.

For this purpose 31 Bavarian dairy farms were visited in a case-control study in 2013. Farms of the case group (n = 21) had to meet at least three out of five inclusion criteria, analog to the “botulism joint project TiHo”: A reduced milk yield > 15 % at least three months in a row, > 5 % euthanized or fallen cows within the last 12 months, > 35 % disposal rate (without sales for breeding) within the last 12 months, > 10 % downer cow syndrome within the last 12 month and / or a subjective evaluation of a higher incidence of illness by the owner of the livestock. Farms of the control group (n = 10) were not allowed to fulfill any of those criteria.

In the context of the status analyses, the following questionnaires were used for collection of the data (developed at the TiHo Hannover): “holding”, “facility”, “barn”, “milking installation / robot”, “compartment”, “lactation group”, “silage”, “own investigation in the compartment” and “individual examination”. Furthermore the body condition, habitus and locomotion score were assessed for each cow (lactating and dry cows) on the farm as well as the relative milk yield of each cow according to her stage of lactation, compared with the average of the herd. Additionally, the hygiene score and the skin damage on the bone prominences were monitored for a certain random sample. According to these observations a ranking list for the following individual examination was created: 10 % of the most notably sick looking cows and 10 % of the healthiest looking cows of a farm. (But not more than 10 cows per holding) were subjected to clinical examination. Of these dairy cows, samples (rumen fluid, blood and feces) for bacteriological, parasitological and hematological testing were also taken. A

total of 284 dairy cows were included in the study, 186 in the case group and 98 in the control group.

Predominantly the farms kept “Fleckvieh” cows, almost 1/3 thereof in tiestalls. The average holding in the case group had 51 dairy cows with a milking yield of 7509 kg per year and the average holding in the control group held 54 dairy cows with a milking yield of 7337 kg per year.

The results of the herd indices represented significantly more severe lameness while having the same claw cutting (half-year interval) and significantly worse hygiene scoring on leg and flank of dairy cows of the case group compared with the control group. The contamination of the udder was only in case tiestalls significantly worse compared with the control group. In general, the somatic cell count in the milk of the individual was significantly higher in the case group than in the control group. In freestall herds of the case group the damage on the integument of the upper half of the body was also significantly stronger than in the control group while in tiestall herds it was the other way around. There were no significant differences for case and control group relating to the damage on the integument of the lower half of the body and cubicle dimensions.

On average, half of the dairy cows of the case and control group were in the reference range of the BCS according to their breed and lactating stage, but independently of the farming condition. The evaluation of the drinking, feeding and lying place ratio showed a slight over-crowding in all categories. Between case and control group there were no significant differences proved for the subjective sensorial assessment of the silage. Other than a deviation of smell in almost 60 % of the case group, approximately 2/3 of all silages were unremarkable. *Clostridia* were found in 45.5 % of the “good” and in 54.5 % of the “bad” silage.

Carrying out bacteriological tests of feces and rumen fluid using real-time PCR for proofing toxin genes, the distribution was as follows: In 74.2 % of the farms, *Clostridia* (especially in feces samples) were found without a difference in the frequency of detection between case and control groups and case and control cows. Distributed into the individual species *C. perfringens* (mainly type A) was found in 71.4 %, *C. novyi* in 24.7 %, *C. botulinum* in 2.6 % (2 cows out of one farm in the case group) and *C. haemolyticum* in 1.3 % of the cases. Analysis of previously examined laboratory parameters did not show high deviations

concerning the case and control group. In 1.4 % of all the sampled cows, the parasitological tests were positive.

Based on the results found in this study, it was not possible to prove a connection with *Clostridium* spp. between the case and control group. The holding stratification may most likely be the result of management, husbandry and hygiene factors. The case group achieved significant worse results for the locomotion score, the contamination of the animals, the damage on the integument of the upper half of the body as well as for the somatic cell count and the frequency of the diet calculation.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Anniballi F, Fiore A, Lofstrom C, Skarin H, Auricchio B, Woudstra C, Bano L, Segerman B, Koene M, Baverud V, Hansen T, Fach P, Tevell Aberg A, Hedeland M, Olsson Engvall E, De Medici D. Management of animal botulism outbreaks: from clinical suspicion to practical countermeasures to prevent or minimize outbreaks. *Biosecur Bioterror* 2013; 11 Suppl 1: S191-9.

Anonymus. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. The EFSA Journal 2005; 06.04.2014: <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/199.pdf>.

Anonymus. Abschlussbericht für das Projekt „Entwicklung von mikrobiologischen und molekularbiologischen Nachweismethoden für toxinbildende Mikroorganismen (*Clostridium botulinum* und *Bacillus cereus* – emetischer Typ) in Lebensmitteln“. StMUV 2006: <http://www.stmuv.bayern.de/umwelt/forschung/projekte/index.htm>.

Anonymus. Dokumente zum Thema: Chronischer Botulismus. VetImpulse, ed. 2010: [http://www.vetimpulse.de/fileadmin/user\\_upload/Botulismus\\_Dossier\\_1-11-2010.pdf](http://www.vetimpulse.de/fileadmin/user_upload/Botulismus_Dossier_1-11-2010.pdf).

Anonymus (2011) Faktorenerkrankung bei Rindern oder sogenannter "chronischer Botulismus", BauernBlatt

Anonymus (2012) Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Botulismus. Thieme Verlag, Stuttgart

Anthes M, Peter A. Botulismus: Die verharmloste Krankheit. SWR Fernsehen: 2010; 31.05.2014: <http://www.swr.de/landesschau-aktuell/rp/-/id=1682/mpdid=6852548/nid=1682/did=6852548/12v1kaf/index.html>.

Appunn K. Botulismus: Pest oder Fantasie? 2011; 31.05.2014: [http://www.botulismus.org/index\\_htm\\_files/boehnel14.11.11.pdf](http://www.botulismus.org/index_htm_files/boehnel14.11.11.pdf).

Arnon SS. Infant botulism. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 4th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co 1998: 1570-7.

Barth K. Sozialverhalten von Kühen-mehr Einflüsse auf die Produktion als Sie denken! Fresh Cow Management 2011: 3-8.

Bechter MR. Umfrage unter Tierärzten zum Auftreten von Bestandsproblemen in bayerischen Milchviehbetrieben mit möglicher Beteiligung von Clostridium botulinum. Diss. med. vet. 2014. LMU München.

BfR. Hinweise für Verbraucher zum Botulismus durch Lebensmittel. Bundesinstitut für Risikobewertung 2005:

BMEL (2000) Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG), BGBl. I S. 1045

BMEL (2004) Tierseuchengesetz (TierSG)

BMEL (2005) Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)

BMEL (2006) Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene nach dem Tiergesundheitsgesetz (Tierimpfstoff-Verordnung)

BMEL (2011) Fachgespräch zum viszeralem Botulismus. In: Grosstier Praxis. Verlag für Agrarwissenschaften. 490-3

BMEL (2013) Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG)

Bogner H, Grauvogel A (1984) Verhalten landwirtschaftlicher Nutztiere. Ulmer Verlag, Stuttgart

Böhnel H, Schwagerick B, Gessler F. Visceral botulism—a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 2001; 48: 373-83.

Böhnel H, Wernery U, Gessler F. Two Cases of Equine Grass Sickness with Evidence for Soil-borne Origin Involving Botulinum Neurotoxin. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 2003; 50: 178-82.

Böhnel H, Gessler F. Botulinumtoxikosen—Infektionsrisiken für Mensch und Tier. *Nutztierpraxis aktuell* 2010 2010; 18: 14- 8.

Böhnel H, Gessler F. Hinweise zum Vorkommen von Rinderbotulismus in Deutschland anhand von Laboruntersuchungen der Jahre 1996-2010. *Tierärztl. Umschau* 2012; 67: 1-6.

Böhnel H, Gessler F. Presence of *Clostridium botulinum* and botulinum toxin in milk and udder tissue of dairy cows with suspected botulism. *Veterinary Record* 2013; 172: 397.

Braun U. Botulismus beim Rind. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2006; 148: 331-9.

Breves G (2014) Abschlussbericht: Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen und Teilprojekt: Mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Hühnertrockenkot als Gärs substrat. 1-103

Brown A, Gregory A, Ellis T, Hearnden M. Comparative immunogenicity of two bivalent botulinum vaccines. *Australian veterinary journal* 1999; 77: 388-91.

Bruijn M, Hogeveen H, Stassen E. Assessing economic consequences of foot disorders in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. *Journal of Dairy Science* 2010; 93: 2419-32.

Busch U. Real-Time PCR. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2007; 2: 111-2.

Busse T (2011) Die ignorierte Seuche. Zeit online: 2011; 31.05.2014: <http://www.zeit.de/2011/35/Tiere-Seuche-Bakterium>.

Clausen HM (2010) Erfahrungen eines praktischen Tierarztes zum Thema Clostridium Botulinum in Schleswig-Holstein. Chronischer Botulismus, 30.9. - 1.10.2010. Horstmar-Leer. 38-44

Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen Clostridium botulinum and its neurotoxins. Journal of applied microbiology 1998; 84: 5-17.

Cook NB. The influence of barn design on dairy cow hygiene, lameness and udder health. Proc. of the 35 th Ann. Conv. Amer. Assoc. Bov. Pract., Madison, WI. Amer. Assoc. Bov. Pract., Rome, GA 2002: 97-103.

Cook NB, Nordlund KV, Oetzel GR. Environmental influences on claw horn lesions associated with laminitis and subacute ruminal acidosis in dairy cows. Journal of Dairy Science 2004; 87: E36-E46.

Cook NB, Reinemann DJ (2007) A tool box for assessing cow, udder and teat hygiene. 46th Annual Meeting of the National Mastitis Council. San Antonio, Texas.  
<http://www.uwex.edu/uwmril/pdfMilkMachine/Cleaning/07%20NMC%20Hygiene%20Toolbox%5B1%5D.pdf>. 2008

Cunha CE, Moreira GM, Salvarani FM, Neves MS, Lobato FC, Dellagostin OA, Conceicao FR. Vaccination of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D. Vaccine 2014; 32: 214-6.

Dahlenborg M, Borch E, Rådström P. Prevalence of Clostridium botulinum types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. International journal of food

microbiology 2003; 82: 105-10.

De Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M (2007) Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Enke Verlag, Stuttgart

De Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M (2013) Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Dickson EC, Shevsky R. Botulism. Studies in the manner in which the toxin of *Clostridium botulinum* acts upon the body. I. The effect upon the autonomic nervous system. The Journal of experimental medicine 1923; 37: 711-31.

Dirksen G, Gründer HD, Stöber M (1990) Die klinische Untersuchung des Rindes, 3. Auflage edn. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

Dirksen G, Gründer HD, Stöber M (2006) Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Georg Thieme Verlag

Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. PLoS One 2009; 4: e7063.

Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. Journal of Dairy Science 1989; 72: 68-78.

EFSA. Scientific opinion on welfare of dairy cows in relation to leg and locomotion problems based on a risk assessment with special reference to the impact of housing, feeding, management and genetic selection. EFSA Journal 2009; 1142: 1-57.

Eilers U. Planungshilfen für den Rinder-Stallbau mit Anforderungen, Funktionsmaßen und Empfehlungen. Aulendorf: LAZBW Stand 25.04.2013; 07.07.2014:<http://www.landwirtschaft->

[bw.de/pb/MLR.Landwirtschaft,Lde/Startseite/Tierhaltung+\\_+Tierzucht/Rinder](http://bw.de/pb/MLR.Landwirtschaft,Lde/Startseite/Tierhaltung+_+Tierzucht/Rinder).

Eklund MW, Poysky F, Meyers J, Pelroy G. Interspecies conversion of *Clostridium botulinum* type C to *Clostridium novyi* type A by bacteriophage. *Science* 1974; 186: 456-8.

Engels S. Untersuchungen zu Auftreten von *Clostridium botulinum*, betriebsspezifischen Risikofaktoren und Symptomen beim Krankheitsbild des viszeralen Botulismus. Diss. med. vet. 2012. Göttingen, Georg-August Universität, Diss., 2012.

Erbguth FJ, Naumann M. Historical aspects of botulinum toxin Justinus Kerner (1786–1862) and the “sausage poison”. *Neurology* 1999; 53: 1850-.

Erbguth FJ, Nauman M. LETTER TO THE EDITOR On the First Systematic Descriptions of Botulism and Botulinum Toxin by Justinus Kerner (1786-1862). *Journal of the History of the Neurosciences* 2000; 9: 218-20.

EU. Directive 2003/99/EC of the european parliament and of the council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents. *Off J Europ Union* 2003; L 325/31

Fach P, Gibert M, Griffais R, Guillou JP, Popoff MR. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *Applied and environmental microbiology* 1995; 61: 389-92.

Fach P, Gibert M, Griffais R, Popoff MR. Investigation of animal botulism outbreaks by PCR and standard methods. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 1996; 13: 279-85.

Fach P, Micheau P, Mazuet C, Perelle S, Popoff M. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium*

botulinum, Clostridium baratii and Clostridium butyricum. Journal of applied microbiology 2009; 107: 465-73.

FLI. Informationen zu klassischem und chronischem/viszeralem Botulismus. Friedrich-Löffler-Institut 2011:

FLI. Empfehlung zur Durchführung des Maus-Bioassays zum Nachweis von Clostridium botulinum Neurotoxin in Rinderkot und Silage. Friedrich-Löffler-Institut 2012: [http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/Publikationen/FLI-Methodenempfehlung/FLI\\_Methodenempfehlung\\_Botulinum\\_Toxin.pdf](http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/FLI-Methodenempfehlung/FLI_Methodenempfehlung_Botulinum_Toxin.pdf).

Gasteiner J (2005) Ursachen für Lahmheiten bei Milchkühen. Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein

Gill DM. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiological Reviews 1982; 46: 86.

Gurjar AA, Hegde NV, Love BC, Jayarao BM. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxin typing of Clostridium perfringens toxin producing strains in feces of dairy cattle. Molecular and cellular probes 2008; 22: 90-5.

Hatheway CL. Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 66-98.

Hein J-P (2012) Expertenkrieg um tote Kühe, Focus Magazin Online

Hellwig E-G. Chronischer Botulismus/morbus Kerner im Zusammenhang mit Biogasanlagen? Nutztierpraxis aktuell 2010 2010; 11: 10-1.

Heuwieser W, Mansfeld R. Beurteilung der Körperkondition bei Milchkühen. Milchpraxis 1992; 30: 10-4.

Hill KK, Xie G, Foley BT, Smith TJ, Munk AC, Bruce D, Smith LA, Brettin TS, Detter JC. Recombination and insertion events involving the botulinum

neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum types A, B, E and F and Clostridium butyricum type E strains. BMC biology 2009; 7: 66.

Holznagel R (2004) LAandtag Mecklenburg-Vorpommern Drucksache 4/999 4. Wahlperiode 16.02.2004 KLEINE ANFRAGE der Abgeordneten Renate Holznagel, Fraktion der CDU Viszeraler Botulismus

Hunter LC, Miller J, Poxton I. The association of Clostridium botulinum type C with equine grass sickness: a toxicoinfection? Equine Vet J 1999; 31: 492-9.

Kahn CM (2010) The Merck Veterinary Manual, 10 edn. Merck&Co, Whitehouse Station N.J., USA

Kalb SR, Baudys J, Rees JC, Smith TJ, Smith LA, Helma CH, Hill K, Kull S, Kirchner S, Dorner MB, Dorner BG, Pirkle JL, Barr JR. De novo subtype and strain identification of botulinum neurotoxin type B through toxin proteomics. Anal Bioanal Chem 2012; 403: 215-26.

Kanswohl N. Analyse und Bewertung von Hoch- und Tiefboxen für Milchrinder aus arbeitswirtschaftlicher, ethologischer, hygienischer und ökonomischer Sicht. MV LfLuF, ed. 2008; 15.07.2014: [http://www.landwirtschaft-mv.de/cms2/LFA\\_prod/LFA/content/de/Fachinformationen/Tierproduktion/Milch\\_erzeugung/?&artikel=1863](http://www.landwirtschaft-mv.de/cms2/LFA_prod/LFA/content/de/Fachinformationen/Tierproduktion/Milch_erzeugung/?&artikel=1863).

Kelch WJ, Kerr LA, Pringle JK, Rohrbach BW, Whitlock RH. Fatal Clostridium botulinum toxicosis in eleven Holstein cattle fed round bale barley haylage. Journal of veterinary diagnostic investigation 2000; 12: 453-5.

Kirchner S, Krämer M, Schulze M, Pauly D, Jacob D, Gessler F, Nitsche A, Dorner BG, Dorner MB. 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 2010; 76: 4387-95.

Knierim U, Winckler C (2002) Checklisten zur Überprüfung der Haltungsbedingungen im Boxenlaufstall für Milchkühe. XXII. World Buiatrics Congress. 23

Kristan S. chronischer Botulismus bei Kühen. Hessischer Rundfunk 2012: [http://www.hr-online.de/website/fernsehen/sendungen/index.jsp?rubrik=74396&key=standard\\_documentoent\\_44764752](http://www.hr-online.de/website/fernsehen/sendungen/index.jsp?rubrik=74396&key=standard_documentoent_44764752).

Krüger M. Chronischer Botulismus in Milchviehbeständen Schleswig-Holsteins. Nutztierpraxis Aktuell 2010: 24.

Krüger M (2010) Clostridium Botulinum in Tierbeständen aus mikrobiologischer Sicht. Chronischer Botulismus, 30.09.-01.10.2010. Horstmar-Leer. 24-7

Krüger M, Neuhaus J, Gökce K, Möckel H-G, Schrödl W (2011) Chronischer Botulismus in einem sächsischen Milchviehbestand, Ergebnisse der bakteriologischen und immunologischen Untersuchungen und der durchgeführten Bekämpfungsmaßnahmen. Internationale Konferenz: Prophylaxe von Herden- bzw. Produktionskrankheiten, 7. - 8. Oct. 2011. Leipzig. 36-40

Krüger M, Große-Herrenthey A, Schrödl W, Gerlach A, Rodloff A. Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany – Prevalence of Clostridium botulinum in feces of cows, in animal feeds, in feces of the farmers, and in house dust. Anaerobe 2012; XXX: 1-3.

Krüger M, Shehata AA, Schrödl W, Rodloff A. Glyphosate suppresses the antagonistic effect of Enterococcus spp. on Clostridium botulinum. Anaerobe 2013; 20: 74-8.

Krüger M, Skau M, Shehata AA, Schrodli W. Efficacy of Clostridium botulinum types C and D toxoid vaccination in Danish cows. Anaerobe 2013; 23: 97-101.

Krüger M, Shehata AA, Grosse-Herrenthey A, Ständer N, Schrödl W. Relationship between gastrointestinal dysbiosis and *Clostridium botulinum* in dairy cows. *Anaerobe* 2014;

Lindström M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical microbiology reviews* 2006; 19: 298-314.

Lindström M, Myllykoski J, Sivelä S, Korkeala H. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical reviews in food science and nutrition* 2010; 50: 281-304.

Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clinical microbiology reviews* 1988; 1: 1-18.

Maselli RA. Pathogenesis of human botulism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 841: 122-9.

May D (2012) Kleine Anfrage des Abg. Daniel May (Bündnis 90/ Die Grünen) vom 16.02.2012 betreffend chronischer Botulismus in Hessen

Messelhäusser U, Zucker R, Elmer-Englhard D, Busch U, Hörmansdorfer S, Pudich U, Höller C. Nachweis und Charakterisierung von *Clostridium perfringens* mittels real-time-PCR. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2007; 2: 194-7.

Messelhäusser U, Zucker R, Ziegler H, Elmer-Englhard D, Kleih W, Höller C, Busch U. Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ A, B, E und F mittels real-time-PCR. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2007; 2: 198-201.

Metcalf JA, Roberts SJ, Sutton JD. Variations in blood flow to and from the bovine mammary gland measured using transit time ultrasound and dye dilution. *Res Vet Sci* 1992; 53: 59-63.

Moeller RB, Puschner B, Walker RL, Rocke T, Galey FD, Cullor JS, Ardans AA. Determination of the median toxic dose of type C botulinum toxin in lactating dairy cows. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2003; 15: 523-6.

Mühlbauer (2013) Kleine Anfrage 3285 der Abgeordneten Mühlbauer (SPD)  
Botulismusprävention in Thüringen

Nantel AJ. Clostridium Botulinum. World Health Organization 2002; 06.04.2014:  
<http://www.who.int/csr/deliberations/clostridiumbotulism.pdf>.

Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (2009) Mikrobiologische Diagnostik. Thieme Verlag KG, Stuttgart

Nigam PK, Nigam A. Botulinum toxin. *Indian journal of dermatology* 2010; 55: 8.

Notermans S, Kozaki S, Van Schothorst M. Toxin production by Clostridium botulinum in grass. *Applied and environmental microbiology* 1979; 38: 767-71.

Nuss K, Weidmann E. Sprunggelenkschäden bei Milchkühen—eine Übersicht. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 2013; 4

Oguma K. The stability of toxigenicity in Clostridium botulinum types C and D. *Journal of general microbiology* 1976; 92: 67-75.

Ostendorff F, Behm C, Ebner H, Höhn B, Kurth U, Maisch N, Tressel M (2011) Kleine Anfrage der Abgeordneten Friedrich Ostendorff, Cornelia Behm, Harald Ebner, Bärbel Höhn, Undine Kurth (Quedlinburg), Nicole Maisch, Markus Tressel und der Fraktion Bündnis 90/ Die Grünen

Ozmen O, Aydogan A, Haligur M, Sahinduran S. Pathology of botulism in dairy cattle Belgrade: Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade and Servian Buiatrics Association 2013: 465-73.

Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends in microbiology 1999; 7: 104-10.

Philipot JM, Pluvinage P, Cimarosti I, Sulpice P, Bugnard F. Risk factors of dairy cow lameness associated with housing conditions. Veterinary research 1994; 25: 244-8.

Popoff MR, Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. Toxicon 2013; 75: 63-89.

Preising C. Literaturstudie zum Vermehrungs-und Toxinbildungs-vermögen von Clostridium botulinum, zu den Eigenschaften des Botulinumtoxins sowie zum Vorkommen und zur Tenazität der Clostridium botulinum-Sporen. Diss. med. vet. 2006.

Reubold H. Bewertung der Tiergerechtheit von Liegeboxen. Vet-MedReport 2003; Sonderausgabe VI: 14-5.

Rinderhaltung A. Tierschutzleitlinie für die Milchkuhhaltung Hannover: Niedersächsisches Ministerium für den ländlichen Raum, Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Ref. 204 2007:

RKI. Clostridium difficile. Robert Koch Institut 2007; 12.05.2014: [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Clostridium.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html).

RKI (2007, 2013 überarbeitet) Botulismus. In: Biologische Gefahren II. Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe. 205-17

Rodloff AC, Krüger M. Chronic Clostridium botulinum infections in farmers. Anaerobe 2012; XXX: 1-3.

Rolle M, Mayr A (2007) Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und

Seuchenlehre. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Rummel A. Tote Tiere, kranke Menschen. MDR Fernsehen: 2013:  
<http://www.mdr.de/exakt/exaktdiestorydreissigsterfuenfterzwozwoelf100.html>.

Satterfield BA, Stewart AF, Lew CS, Pickett DO, Cohen MN, Moore EA, Luedtke PF, O'Neill KL, Robison RA. A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the Clostridium botulinum toxin genes A, B, E and F. Journal of medical microbiology 2010; 59: 55-64.

Schmid AKP. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli, toxinogenic Clostridium spp. and Yersinia enterocolitica on Bavarian dairy and beef cattle farms. Diss. med. vet. 2014. lmu.

Schwagerick B, Böhnel H. Eine chronische Erkrankung bei Milchkühen mit Nachweis von Botulinumtoxin-eine Fallstudie. Prakt Tierarzt 2001; 9: 516-24.

Schwagerick B (2011) Viszeraler Botulismus - klinisches Bild. 25. Bayerischer Tierärztetag, 2.-5.Juni, 2. - 5.6. Nürnberg. 316-8

Schwebs B (2011) KLEINE ANFRAGE der Abgeordneten Birgit Schwebs, Fraktion DIE LINKE Chronischer Botulismus

Seifert HSH. Evolution, Pathogenese und Epizootiologie von Bodenseuchen. Tierärztl Umschau 2004; 59: 9-12.

Selbitz HJ (1992) Lehrbuch der Veterinärmedizinischen Bakteriologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Sharma SK, Ramzan MA, Singh BR. Separation of the components of type A botulinum neurotoxin complex by electrophoresis. Toxicon 2003; 41: 321-31.

Smith T, Lou J, Geren I, Forsyth C, Tsai R, Laporte S, Tepp W, Bradshaw M,

Johnson E, Smith L. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization. *Infect Immun* 2005; 73: 5450-7.

Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 216-34.

Sprecher DJ, Hostetler DE, Kaneene JB. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 1997; 47: 1179-87.

Sprengel D. Anbindehaltung bei Milchkühen in Bayern. München: Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. 2009:

Steinman A, Chaffer M, Elad D, Shpigel NY. Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 862-8.

Stemme K. Clostridienerkrankungen des Rindes. Unterschleißheim: Intervet Deutschland GmbH 2011; [http://www.msd-tiergesundheit.de/binaries/Bravoxin\\_Clostridien\\_A5\\_Fibel\\_pop\\_42SeitenScreen\\_2709-DS\\_tcm82-58382.pdf](http://www.msd-tiergesundheit.de/binaries/Bravoxin_Clostridien_A5_Fibel_pop_42SeitenScreen_2709-DS_tcm82-58382.pdf).

Stöber M. Bazilläre Hämoglobinurie. In: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, eds. Stuttgart: Parey 2006: 216-7.

Stöber M. Botulismus. In: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*, 5. Auflage edn. Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, eds. Stuttgart: Parey 2006: 1113-8.

Tandler F. Untersuchungen zum Vorkommen und zur Epidemiologie von Endoparasiten bei Kühen in verschiedenen Haltungssystemen. Diss. med. vet. 2005. lmu.

Taylor SM, Wolfe CR, Dixon TC, Ruch DS, Cox GM. Wound botulism complicating internal fixation of a complex radial fracture. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 650-3.

Weingart OG, Schreiber T, Mascher C, Pauly D, Dorner MB, Berger TF, Egger C, Gessler F, Loessner MJ, Avondet M-A. The case of botulinum toxin in milk: experimental data. *Applied and environmental microbiology* 2010; 76: 3293-300.

Wilkins PA, Palmer JE. Botulism in foals less than 6 months of age: 30 cases (1989–2002). *Journal of veterinary internal medicine* 2003; 17: 702-7.

Woolums AR, Ensley DT, Tanner PA, Fankhauser R, Shen J, Songer JG, Leard AT, Milward FW, Pence ME, Hurley DJ. Humoral immunity and injection-site reactions in cattle vaccinated with a multivalent clostridial vaccine administered via subcutaneous injection or via transdermal needle-free injection. *Am J Vet Res* 2011; 72: 1124-9.

Ziegler JS. Vergleichende Differenzierung von *Clostridium* spp. mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie. Diss. med. vet. 2013. lmu.

Zühlke CuP, H. (2013) Das Gift im Kuhstall - Sterbende Tiere, kranke Menschen

## IX. ANHANG

### 1. Fragebögen und Beispielbericht



#### Projekt Botulismus: Abteil Anbindehaltung

Datum:

Betriebs ID:

Prüftierarzt:

Standortbezeichnung:

LKV-Nr.:

Abteilbezeichnung

Stallbezeichnung:

#### 1. Welche Laktationsgruppen gibt es in diesem Abteil?

LF

LM

LS

TSF

TSS

#### 2. Wenn Laktierende: Mit welcher Melkanlage werden die Tiere in diesem Abteil gemolken?

\_\_\_\_\_

#### 3. Wenn Laktierende: Wie oft werden die Kühe aus diesem Abteil gemolken?

\_\_\_\_\_ x täglich

#### 4: Welcher Belag befindet sich in den Ständen?

Ohne (Estrich)

Gummimatten

Art der Gummimatten: \_\_\_\_\_

Betonboden mit Einstreu

sonstiges: \_\_\_\_\_

#### 5. Welche Einstreu nutzen Sie für die Stände?

Nichts

Langstroh

Häckselstroh

Sägemehl

Sand

Kompost

Feststoffseparierte Gülle

Pferdemist

sonstiges: \_\_\_\_\_

**6. Wenn Einstreu: Wie oft wird nachgestreut?**

- Täglich**
- mind. 1x pro Woche**
- seltener**

**7. Wird Kalk auf die Liegeflächen gestreut?***Wenn ja, wie oft und welcher?*

- Ja, mind. täglich**  **Ja, alle 2 Tage**
- Ja, seltener**  **Nein**

Name des Kalks: \_\_\_\_\_

**8. Wie oft werden die Stände in diesem Abteil gereinigt?**

- mehrfach täglich**  **täglich**
- wöchentlich**  **seltener**

**9. Was für einen Stand haben Sie?**

- Kurzstand**  **Mittellangstand**  **Langstand**

**10. Bei Kurzstand: Welches Modell des Kurzstands haben Sie?**

- mit Kotstufe**  **mit Gitterrost**  **Sonstiges**

**11. Was für ein Fixationssystem haben Sie in diesem Stallabteil?**

- Grabneranbindung**   **Doppelgelenkhalsrahmen**
- Selbstfangrahmen**   **Horizontalanbindung**
- Horizontalanbindung**   **Sonstiges**
- mit Nackenbügel**

**12. Nutzen Sie einen Kuhtrainer?**

- Ja**  **Ja, nur zeitweise**   **Nein**



## Projekt Botulismus: Eigene Untersuchungen im Abteil (Anbindehaltung)

Datum:

Betriebs ID:

Prüftierarzt:

Standortbezeichnung:

LKV-Nr.:

Abteilbezeichnung

Stallbezeichnung:

### A. Kuh-Komfort

#### A1: Durchschnittliche Wiederkauintensität

	Kuh 1	Kuh 2	Kuh 3	Kuh 4	Kuh 5	Ø
Kauschläge/ Minute						

### B. Stände

#### B1: Welcher Belag befindet sich in den Ständen?

- Ohne (Estrich)
- Gummimatten   Art der Gummimatten: \_\_\_\_\_
- Gummimatratze
- Betonboden mit Einstreu
- sonstiges: \_\_\_\_\_

#### B2A: Einstreu:

- nichts   Langstroh   Häckselstroh   Sägemehl
- Sand   Kompost   festst. Gülle   Pferdemist
- Sonstiges: \_\_\_\_\_

#### B2B: Falls vorhanden: Menge der Einstreu:

- Sehr wenig   wenig   eher viel   viel

#### B3: Sauberkeit der Stände:

- dreckig   eher dreckig   eher sauber   sauber

#### B4: Rutschfestigkeit der Stände:

- Rutschig   eher rutschig   eher rutschfest   rutschfest

**B5: Desinfektionsmaßnahmen der Stände:**

Mehr als 1x pro We                       1x pro We   
 weniger als alle 4 We                       Nie

**C. Abteilklima****C1: Lichtverhältnisse:**

dunkel                       eher dunkel                       eher hell                       hell

**C2: Luftverhältnisse**

Stickig                       eher stickig                       eher frisch                       frisch

**C3: Luftfeuchtigkeit**

feucht                       eher feucht                       eher trocken                       trocken

**D. Fressplätze****D1: Wie ist die Beschaffenheit des Futtertisches?**

Glatt                       rau                        beschädigt

**D2: Sauberkeit Futtertisch:**

dreckig                       eher dreckig                       eher sauber                       sauber

**E: Stände vermessen:**

	Stehpl. 1	Stehpl.2	Stehpl. 3	Stehpl. 4	Ø in cm
Länge Stehplatz					
Breite Stehplatz					
Seitenabtrennung Ja/nein; Länge					
Trogwandhöhe Kuhseitig Elastisch/ fest					
Abstand Kuhtrainer-Kuh					
Sonstiges					

**F: Größe der Tiere** (3 bis 5 der größten Tiere) im gesamten Abteil:

	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Ø in cm
Widerristhöhe in cm						
Sitzbeinhöcker Buggelenk (schräge Rumpflänge) in cm						

**G. Tränken****G1. Schalentränken**1 Tränke pro Tier 1 Tränke pro 2 Tiere 

davon sauber \_\_\_\_\_

ggr. verschmutzt \_\_\_\_\_ mit Futter mit Kot

dtl. verschmutzt \_\_\_\_\_ mit Futter mit Kot

**H. Bauliche Mängel**


---



---



## Untersuchungsbericht für den Betrieb:

XXX

Diese Studie wird durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen einem chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und unterschiedlichen Krankheitserregern, z. B. *Clostridium botulinum*, herauszufinden. Gesicherte und abschließende Aussagen über die Bedeutung der Erreger können erst am Ende der Studie in 2014, nach Auswertung aller am Projekt teilnehmenden Betriebe, getroffen werden.

Im Folgenden möchte ich über einige Auffälligkeiten berichten, die wir bei den Untersuchungen auf Ihrem Betrieb festgestellt haben und Ihnen einige kurze Hinweise geben, welche Bereiche optimiert werden könnten. Es handelt sich hierbei um Empfehlungen, die wir aufgrund des Bestandsbesuchs am xx.xx.2013 abgeben. Wir bitten Sie, diese mit Ihrem Hoftierarzt zu besprechen.

Auf Futtermittelanalysen wurde aufgrund der unzureichenden Aussagekraft einer einzelnen Probe aus einem ganzen Silo bewusst verzichtet.

### Bestandsinspektion und Abteilauswertung

Kühe: (ca. xx Milchkühe, größtenteils Fleckvieh im Laufstall)

### Lahmheits-Beurteilung (nach Sprecher et al. 1997)

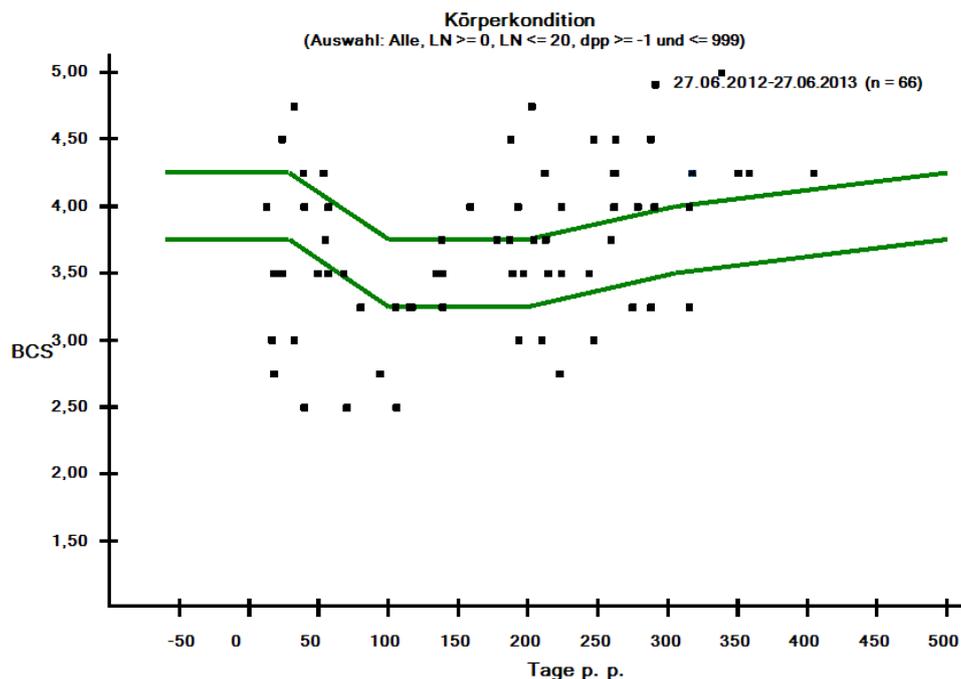
Note	Anzahl Tiere	Ist %	Soll %
<b>1 = nicht lahm</b>	43	58 %	> 70 %
<b>2 = leicht lahm</b>	23	31 %	< 20 %
<b>3 = mittelmäßig lahm</b>	6	8 %	< 10 %
<b>4 = deutlich lahm</b>	2	3 %	0 %
<b>5 = schwer lahm (belastet Gliedmaße nicht mehr)</b>	0	0 %	0 %
<b>Tiere gesamt</b>	74		

Anhand der Lahmheits-Beurteilung nach Sprecher et al. (1997) gehen zu viele Milchkühe leicht lahm.

→ Lahme Tiere sollten näher untersucht und ggf. behandelt werden

→ evtl. Klauenpflegeintervall verkürzen

## Körperkondition (nach Edmondson et al. 1989)



Einige Ihrer Kühe sind ihrem Laktationsstadium entsprechend überkonditioniert, einige zu mager (darunter auch Fleckvieh)

### Haltung:

#### Kuhkomfort

Kuh-Komfort-Quotient (nach Nelson): bedeutet Anteil richtig liegender Kühe in den Liegeboxen bezogen auf die Gesamtzahl der Kühe, welche mindestens 2 Beine in den Liegeboxen haben. [Zielgröße: >80 %]

Hier bei Laktierenden: 91 %, das bedeutet im Referenzbereich

Wiederkauindex: bedeutet Anteil der wiederkauenden Kühe in den Liegeboxen bezogen auf die Gesamtzahl der Kühe, welche sich stehend oder liegend in den Liegeboxen befinden. [Zielgröße:> 50 %]

hier: 53 % bei Laktierenden → Der Wiederkauindex im Referenzbereich

durchschnittliche Wiederkauintensität (Erhebung an fünf Kühen): Kauschläge/Minute, Zielgröße: 60/Minute

hier: 66/ Minute → Die Wiederkauintensität bei den Laktierenden rangiert im Referenzbereich

**Fressplätze und Boxen**

Nur 52 Fressplätze und 56 Boxen für 71 Tiere [Referenz: 1:1]

**Tränken:**

3 Trogtränken insg. mit einer Länge von 307cm und 2 Schalentränken

[Referenz: max. 10 Tiere/Schalentränke, bei ganzjähriger Stallhaltung mind. 8 bis 10 cm Troglänge pro Tier]

→ Die Wasseraufnahmemöglichkeit für die Herde erscheint nicht ganzausreichend

**Messwerte einzelner Parameter zur Beurteilung der****Liegeboxenbeschaffenheit:**

Vermessung von 4 Boxen (2 wandständige Boxen, 2 gegenständige Boxen):

	wandständig		gegenständig		Ø	Anzu- streben	Akzeptabel
	Box 1	Box2	Box 3	Box 4			
Liegefläche in cm (z. T. = Boxenlänge, da kein Bugbrett)	191	220	191	193	199	mindst. 170 (Hochbox)	
Boxenlänge wandständig in cm	205	228			<b>216</b>	258	246
Boxenlänge gegenständig in cm			240	195	217	221	210
Kopffreiheit, wandständig in cm	68	62			<b>65</b>	88	84
Kopffreiheit, gegenständig in cm			77	62	70	50	48
Boxenbreite in cm	123	130	126	126	126	129	122
Nackenriegelhöhe in cm	123	127	112	112	118	127	112
Bugbretthöhe in cm	27	-	24	24	<b>25</b>	8 bis 12	5 bis 7,
schräge Länge des Nackenriegels in cm	210	217	201	200	207	190 bis 200	
Höhe der Kotkante in cm	40	42	39	42	<b>41</b>	15 bis 20	

Kopffreiheit in wandständigen Boxen ist zu kurz

Bugschwelle und Kotkante zu hoch

**Hygiene-Score (nach Cook 2002)**

	Stichproben- zahl	deutlich bis stark verschmutzte Tiere (Score 3 + 4)		Zielwerte Laufstall
		Anzahl	%	
Euter	38	8	21 %	11 %
Beine		14	37 %	47 %
Flanke		11	29 %	8 %

Es wäre eine Verbesserung der Laufganghygiene und die der Liegeboxen anzustreben.

**Bewertungsschema hervorstehender Knochenpunkte (nach Reubold 2003)**

**Steuerelemente** (Hüfthöcker, Rücken, Nacken, seitliche Bauchwand)

Note	Anzahl Tiere	Ist %	Soll %
<b>1 = unauffällig</b>	27	74 %	100 % > 90 %
<b>2 = haarlose Stelle</b>	9	26 %	
<b>3 = Verhornung, Schleimbeutelanschwellung ohne Entzündung</b>	0	0 %	
<b>4 = Hautverletzung, Entzündung, Schwellung</b>	0	0 %	0 % < 10 %
<b>5 = wie 4 mit zusätzlicher Gelenkbeteiligung</b>	0	0 %	
<b>Stichprobenzahl</b>	38		

Die Veränderungen an den hervorstehenden Knochenpunkten liegen im Referenzbereich.

**Liegefläche** (Sprung-, Knie-, Karpalgelenk)

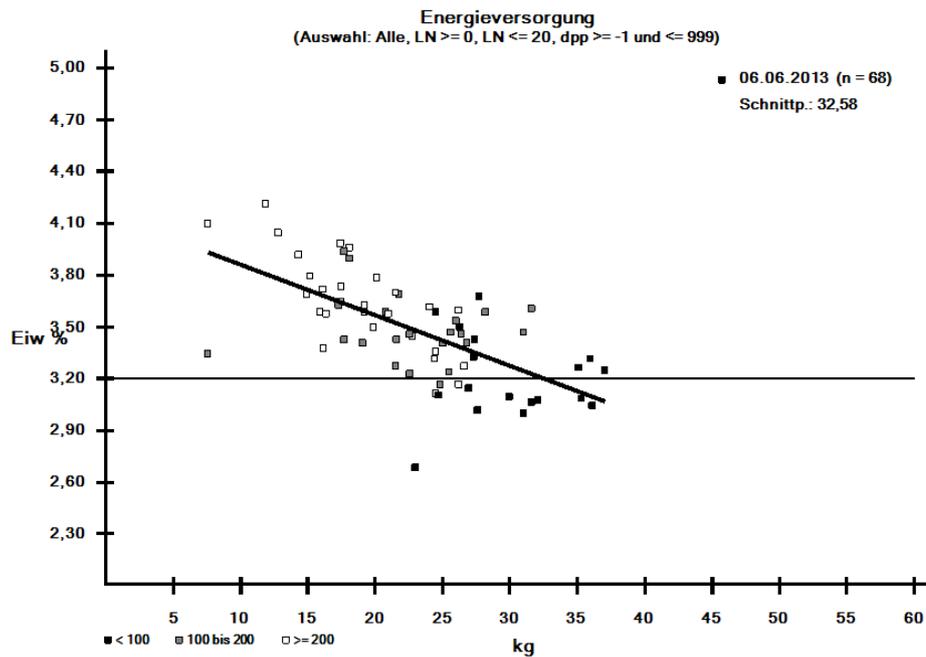
Note	Anzahl Tiere	Ist %	Soll %
<b>1 = unauffällig</b>	12	31 %	100 % > 90 %
<b>2 = haarlose Stelle</b>	24	63 %	
<b>3 = Verhornung, Schleimbeutelanschwellung ohne Entzündung</b>	2	5 %	
<b>4 = Hautverletzung, Entzündung, Schwellung</b>	0	0 %	0 % < 10 %
<b>5 = wie 4 mit zusätzlicher Gelenkbeteiligung</b>	0	0 %	
<b>Stichprobenzahl</b>	38		

Die Veränderungen an den Gelenken, die mit der Liegefläche in Berührung kommen, liegen im Referenzbereich.

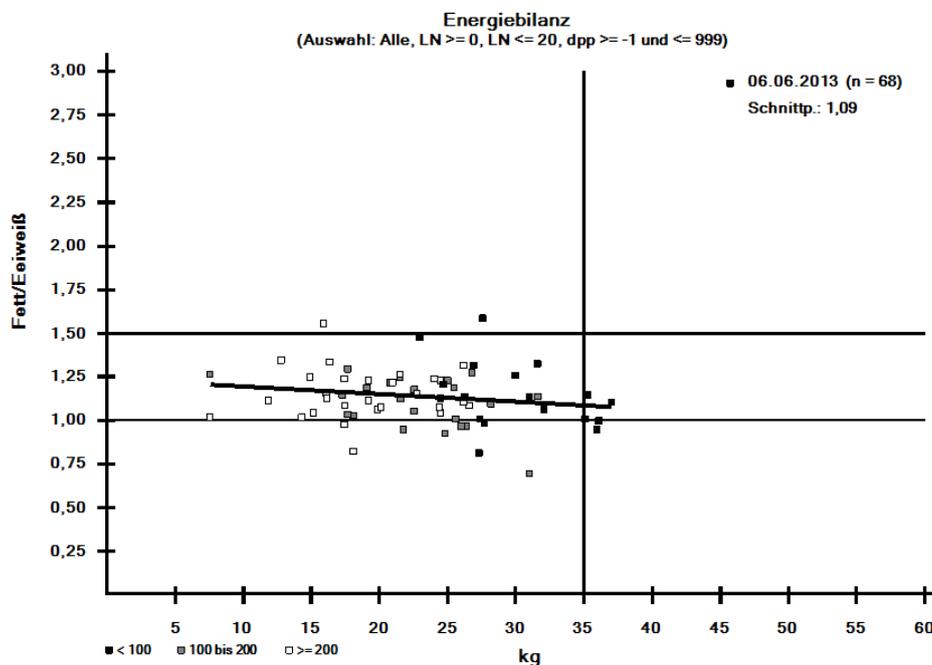
**Fütterung:**

Oberste Schicht der Maissilage schimmelig

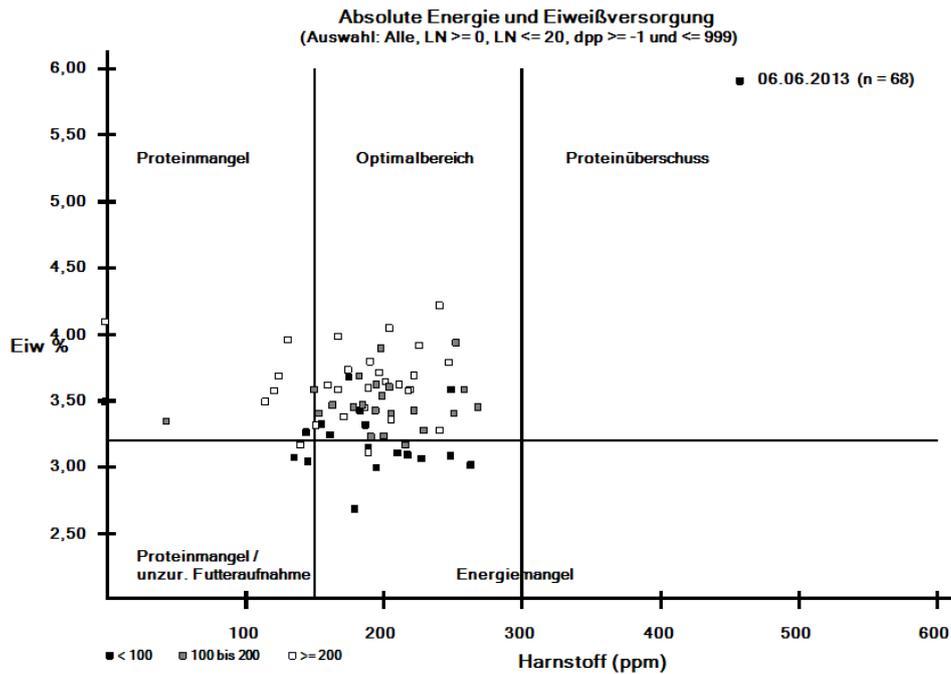
### Auswertung der Milchleistungsprüfung:



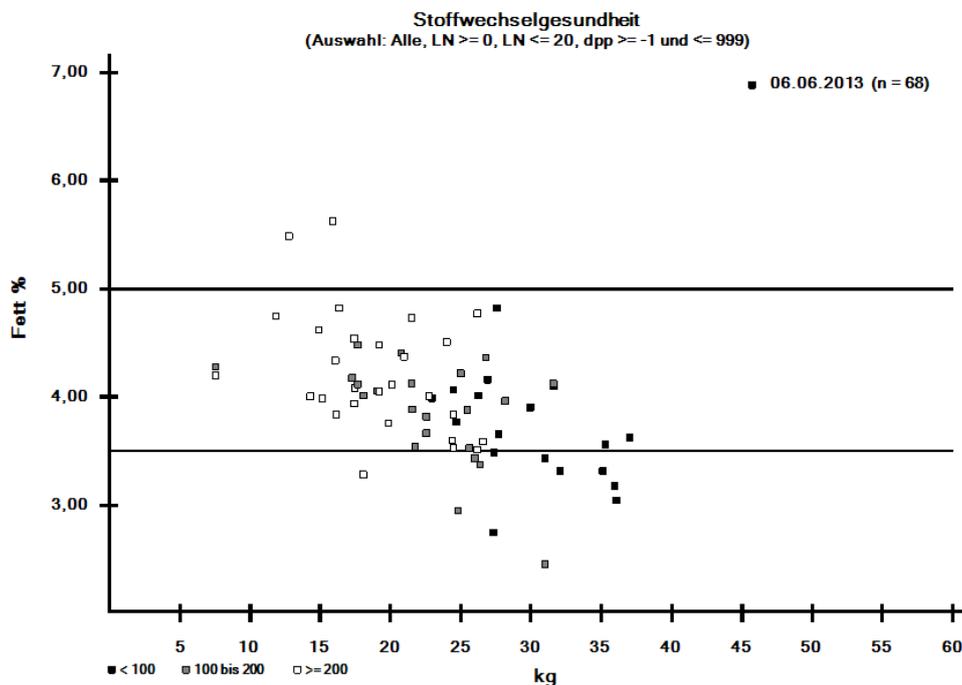
Der Eiweissgehalt in der Milch sollte über 3,2 % sein (Bei Erstlaktierenden darf er etwas niedriger liegen). Die Energieversorgung Ihrer Kühe erscheint nach dieser Auswertung größtenteils gut.



Ein Fett-Eiweiß-Quotient von unter 1 deutet auf eine mangelnde Rohfaserversorgung (Struktur) hin. Tiere mit einem Fett/Eiweiß-Quotienten über 1,5 gelten als ketoseverdächtig.

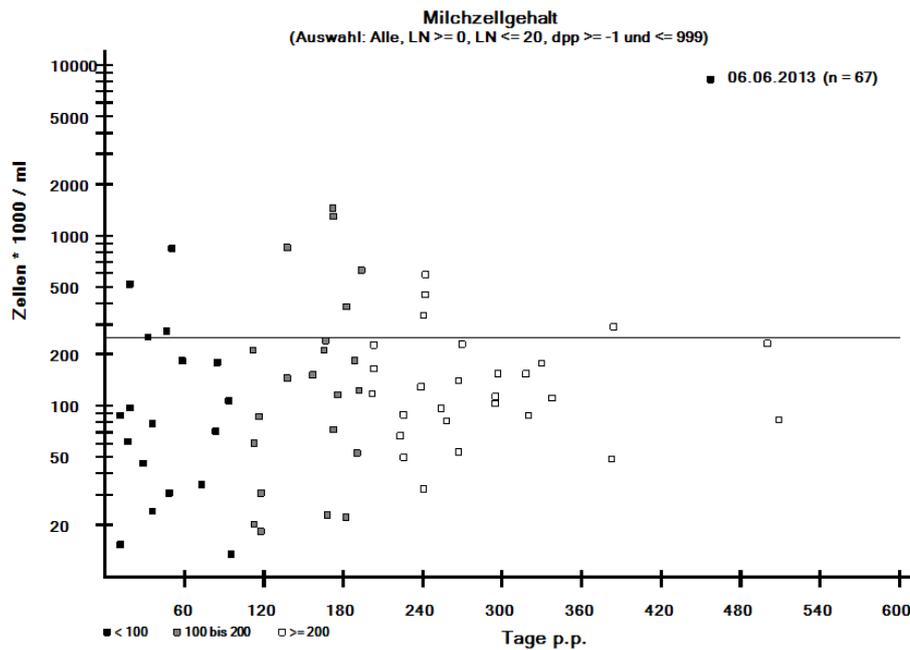


Bei ein paar Kühen zeigt sich ein Proteinmangel, bei manchen auch ein Energiemangel.



Fettwerte von unter 3,5 % deuten auf eine strukturarme Ration hin. Fettgehalte von über 5 % weisen bei frisch- und hochlaktierenden Tieren auf eine mögliche subklinische Ketose hin. Bei altemelkenden Tieren sind höhere Fettgehalte bis zu einem gewissen Grad tolerierbar.

## **Zellgehalt in der Milch:**



Einige Kühe (18 %) haben einen Zellgehalt über 250 000 Zellen/ml. Dies liegt bis 10 % im Referenzbereich.

### **Einzeltieruntersuchung (Besonderheiten)**

Kuh mit Ohrmarkennr. xxx: Lahmheit und entzündete Schwanzspitze

Kuh mit Ohrmarkennr. xxx: Lahmheit

Kuh mit Ohrmarkennr. xxx: Lahmheit

Kuh mit Ohrmarkennr. xxx: Lahmheit

### **Labordiagnostik**

#### bakteriolog. und parasitolog. Untersuchungen von Kot und Pansensaft:

- Kuh mit der Ohrmarkenendnr. 27619 geringgradig *C. novyi* im Kot
- keine parasitologisch positiven Tiere gefunden

#### Blutuntersuchungen:

- Die Selenversorgung der geprüften Kühe ist ausreichend

**Empfehlungen:**

Lahme Tiere sollten untersucht und ggf. behandelt werden

Fütterungsrationen noch mehr den einzelnen Laktationsstadien anpassen (einige Tiere überkonditioniert, andere zu mager)

Optimierung der Möglichkeit zur Wasseraufnahme

Das Fressplatz und Liegeboxen-Kuh Verhältnis sollte 1:1 sein, d.h. bei Ihnen sind die Fressplätze und Liegeboxen bei den Laktierenden Kühen nicht ganz ausreichend

Wenn möglich, Höhe der Bugschwelle und Kotkante optimieren

Regelmäßige Überprüfung der Silagequalität wäre sinnvoll

Überprüfung der Eutergesundheit (z. B. Milchproben von betroffenen Tieren zur mikrobiologischen Untersuchung ziehen lassen)

Ich möchte mich nochmals recht herzlich für Ihre Teilnahme an unserer Studie bedanken und wünsche Ihnen, Ihrer Familie und Ihren Kühen weiterhin alles Gute!

*Johanna Dietsche*

---

Johanna Dietsche

Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Sonnenstrasse 16

85764 Oberschleißheim

Handy: xxx

Fax: xxx

E-Mail: xxx





## 2. Rezepturen zur Anzucht/ für verwendete Methoden

### Flüssige Medien

**TPGY-Bouillon** (eigene Herstellung) – Zusammensetzung für 4 Liter:

Pepton aus Casein	200,0 g
Pepton aus Fleisch	20,0 g
Hefeextrakt	80,0 g
Glukose	16,0 g
Natriumthioglycolat	4,0 g
Wasser, deionisiert	4000 ml
pH 7,0	

### Feste Medien

**Blutagar-Blut Agar Basis**, Art.CM 0055 (Oxoid, Wesel) - Zusammensetzung:

'Lab-Lemco' Puder	10,0 g
Pepton, neutralisiert	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar	15,0 g
pH 7,3 ± 0,2	

**Gassner Agar**, Art. 1.01282 (Merck, Darmstadt) – Zusammensetzung:

Pepton	14,0 g
Natriumchlorid	5,9 g
Lactose	43,0 g
Wasserblau	0,62 g
Metachromgelb	1,25 g
Agar-Agar	13,0 g
pH 7,2	

**Selektivagar nach Slanetz und Bartley**, Art. 1.05289 (Merck, Darmstadt) –  
Zusammensetzung:

Tryptose	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
D (+) -Glucose	2,0 g
di-Kaliumhydrogenphosphat	4,0 g

Natriumazid	0,4 g
Agar-Agar	10,0 g

Zugabe von 1 % 2,3,5 Triphenylterazoliumchlorid, Art. 1.08380 (Merck, Darmstadt)

**M.R.S. Agar** ,Art. CM 0361 (Oxoid, Wesel) – Zusammensetzung:

Pepton	10,0 g
Fleischextrakt ,Lab Lemco <sup>c</sup>	8,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Glukode	20,0 g
Tween 80	1,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0 g
Natriumacetat	5,0 g
Triammoniumcitrat	2,0 g
Magnesiumsulfat	0,2 g
Mangan(II)-sulfat	0,05 g
Agar	10,0 g
pH 5,7	

Zugabe von 13,3 % Kaliumsorbat Lösung aus eigener Herstellung

### Testlösungen

#### **Testlösung für Glutardialdehyd-Probe**

Glutardialdehyd 25 % Lösung	50 ml
K-EDTA	1 g
Natriumchlorid 0,9 % Lösung	950 ml

#### **Flotationslösung Kaliumazetat**

Kaliumazetat	25 kg
Leitungswasser	ca. 14 L
Dichte	1,35

### 3. Arbeitsmaterialien und Geräte

#### Kulturelle Verfahren

##### Anaerobe Anzucht

Anaerobtopf 2,5 l-Volumen, Art. 1.16387.0001	(Merck, Darmstadt)
AnaerotestAnaerobiose-Indikator, Art. 1.15112.0001	(Merck, Darmstadt)

##### Geräte

Brutschrank, 37 °C ± 1 °C	(Mettler, Schwabach)
Brutschrank, 25 °C ± 1 °C	(Mettler, Schwabach)
Kühlgefrierkombination	(Liebherr, Schweiz)

#### Real-Time PCR

##### Reagenzien

0,1x TE Puffer, Zusammensetzung:		
DEPC-Treated Water, Art. AM9915G	9 ml	(Ambion, USA)
Tris-EDTA Buffer, 100x Concentrate	1 ml	(SIGMA, Schweiz)
Lysozyme - from chicken egg white, activity: _ 40000 units/mg protein		(SIGMA, Schweiz)
DEPC-Treated Water, Art. AM9915G		(Ambion, USA)
Brilliant Multiplex QMastermix, Art. 600553		(Agilent Technologies, USA)

##### Primer und Sonden (Sequenzen siehe Methoden)

Primer und Sonden	(MWG, Ebersberg)
pUC19-Plasmid	(Fermentas, St. Leon-Rot)

##### Geräte

Thermocycler Mx3000P QPCR System	(Agilent Technologies, USA)
Thermocycler Mx3005P QPCR System	(Agilent Technologies, USA)
Thermomixer comfort	(eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge Mini Spin	(eppendorf, Hamburg)
Centrifuge 5417R und Centrifuge 5430	(eppendorf, Hamburg)
PipettierhilfeMultipette plus, Art. 4981 000.019	(eppendorf, Hamburg)
PipettierautomatMotion 5070	(eppendorf, Hamburg)
Maxwell® 16 Extraktionsautomat	(Promega, USA)
Vortex Mixer - Lab dancer	(VWR, Ismaning)

Vortex Mixer - Vortex Genie 2	(Scientific Industries, USA)
Airstream® Polymerase Chain Reaction Cabinet	(ESCO Global, Singapur)
Kühlschrank	(Siemens, Berlin)

**Software**

MxPro ET QPCR Software	(Agilent Technologies, USA)
------------------------	-----------------------------

**Flotationsmethode****Geräte**

Zentrifuge Universal 320 R	Hettich, Tuttlingen
----------------------------	---------------------

**Messung der Blutparameter****Geräte**

Hämatologiesystems poch-100iV	Sismex GmbH, Norderstedt
Cobas c 311 analyzer	Roche Doagnostics GmbH, Mannheim
GlutathionePeroxidaseassay (Ransel)	Randox, United Kingdom

**4. Real- Time PCR****Tabelle 53: Primer und Sondensequenzen für die IAC**

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
pUC 19 IAC fw	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG (20 bp)	L 09137
pUC 19 IAC re	AGC TGG CGT AAT AGC GAA G (19 bp)	
pUC 19 IAC S	GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC (20 bp)	
(ROX)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanal: ROX = 6-Carboxy-X-Rhodamine

**Tabelle 54: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von BoNT A, B, E und F**

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
CBOT A fw	TCT TAC GCG AAA TGG TTA TGG (21 bp)	X52066
CBOT A re	TGC CTG CAC CTA AAA GAG GA (20 bp)	

CBOT A S	TGG TTT TGA GGA GTC ACT TGA A (22 bp)	
(HEX)		
CBOT B fw	GGA GAA GTG GAG CGX AAA A (19 bp)	X71343
CBOT B re	TTC CCT TGA TGC AAA ATG AT (20 bp)	
CBOT B S	CCT GGG CCA GTT TTA AAT GA (20 bp)	
(FAM)		
CBOT E fw	TCA GCA CCT GGA CTT TCA GA (20 bp)	X62089
CBOT E re	CAT GTT GTT CTA TAT CAC TTG TTC CA (26 bp)	
CBOT E S	TCC AAA ATG ATG CTT ATA TAC CAA AA (26 bp)	
(CY5)		
CBOT F fw	ATA CGG GGC TAG GGG AGT TA (20 bp)	X81714
CBOT F re	AAA TCC TGA CCT CCA AAG GTT (21 bp)	
CBOT F S	CCG AAA AAC CCA TAA GGC TA (20 bp)	
(ATTO)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: ATTO = N-Hydroxysuccinimidyl-(NHS)-Ester; Cy5 = Cyanin-5; FAM = 6-Carboxy-fluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

**Tabelle 55: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von BoNT C und D**

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Gensequenz (Acc. Nr.)
CBOT C fw	GGC ACA AGA AGG ATT TGG TG (20 bp)	D49440
CBOT C re	TTG GAT CCA TGC AAA ATT CA (20 bp)	
CBOT C S	TGC AAC TAA TAA TGT AGG AGA GGG (24 bp)	
(FAM)		
CBOT D fw	TGG TTC ACC TTT TAT GGG AGA (21 bp)	D38442
CBOT D re	CCA ACT ACC ATT TTC AAA CTT TTC (24 bp)	
CBOT D S	CGC CTG AAG ATA CAT TTG ATT TT (23 bp)	
(HEX)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: FAM = 6-Carboxy-fluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

**Tabelle 56: Komponenten für eine Pentaplex-PCR inklusive IAC**

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz in µl
Brilliant Multiplex QMastermix		12,50
Primer, jeweils		0,70

Sonden, jeweils		0,25
IAC (pUC 19 Plasmid, Konzentration 1 fg)		1,00
DNA-Template		5,00
gesamt		26,75

**Tabelle 57: Komponenten für eine Duplex-PCR ohne IAC**

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz in µl
Brilliant Multiplex QMastermix		12,50
Primer, jeweils	500 nM	1,25
Sonden, jeweils	200 nM	0,50
Aqua dest.		1,50
DNA-Template		5,00
gesamt		25,00

**Tabelle 58: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der *C. perfringens* Toxingene**

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Gensequenz(Acc. Nr.)
CPRF cpafw	GCT AAT GTT ACT GCC GTT GA(20 bp)	DQ184176
CPRF cpa re	CCT CAT TAG TTT TGC AAC C (19 bp)	
CPRF cpa S	GCG CAG GAC ATG TTA AGT TTG (21 bp)	
(FAM)		
CPRF cpefw	GAA ATC CTT GAT TTA GCT GCT G (22 bp)	X81849
CPRF cpe re	TGA GTT AGA AGA ACG CCA ATC A (22 bp)	
CPRF cpe S	GAT GCA TTA AAC TCA AAT CCA GC (23 bp)	
(HEX)		
CPRF extfw	AGC TTT TCC TAG GGA TGG TTA (21 bp)	M95206
CPRF etx re	AAC TGC ACT ATA ATT TCC TTT TCC (24 bp)	
CPRF etx S	AAG AGT GAT TTA AAT GAA GAT GG (23 bp)	
(FAM)		
CPRF iapfw	CGT GGA GGA TAT ACC GCA AT (20 bp)	X73562
CPRF iap re	GGT GTG AGC TTT AAT GCG TTT (21 bp)	
CPRF iap S	TGG TCC TTT AAA TAA TCC TAA TCC A (25 bp)	

(HEX)		
CPRF cpb1 fw	TCA ATT GAA AGC GAA TAT GCT G (22 bp)	X83275
CPRF cpb1 re	CTG TAA ATT TTG TAT CCC ATG AAG C (25 bp)	
CPRF cpb1 S	GAA TAT GTC CAA CCT GAT TTT TCT (24 bp)	
(HEX)		
CPRF cpb2 fw	TTT AAA TAT GAT CCT AAC C (19 bp)	AY730632
CPRF cpb2 re	GCA CCA TTC ATA AAT TCA GT (20 bp)	
CPRF cpb2 S	TGA AAT ACT TAA TTC ACA AAA GA (23 bp)	
(FAM)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: FAM = 6-Carboxyfluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

**Tabelle 59: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der *cpe*-Genotypen**

CPRF cpe_ chromfw	TGA AAA CCG TGA AGA ATT TGG (21 bp)	GQ225715
CPRF cpe_ chromre	CCT AGT TTT ACG CTC GAC AAG TG (23 bp)	
CPRF cpe_ chrom S	TGG GAA ATA GAC TGT GTA TTA GGT GA (26 bp)	
(FAM)		
CPRF cpe_ IS1470-like fw	CAA AGG AGC TAG ATC GAT CAA TAA (24 bp)	AB236336
CPRF cpe_ IS1470-like re	TCG CCA ATG TCA GCA AGA TA (20 bp)	
CPRF cpe_ IS1470-like S	CAA ATT AGC CAA GGA AAG CA (20 bp)	
(HEX)		
CPRF cpe_ IS1151 fw	GAA ACT AGT TGT GAT AAT GGA GCT G (25 bp)	AF511071.2
CPRF cpe_ IS1151 re	CAA AAT TCA TTC AAA GAC AAG GAA (24 bp)	
CPRF cpe_ IS1151 S	ATC GGA GCC ATA GAA CAC GT (20 bp)	
(FAM)		

**Tabelle 60: Komponenten für einen Triplex-PCR Ansatz inklusive IAC**

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz in $\mu\text{l}$
Brilliant Multiplex QMastermix		12,50
Primer, jeweils	300 nM	0,75
Sonden, jeweils	200 nM	0,50
Aqua dest.		0,50
IAC (pUC 19 Plasmid, Konzentration 1 fg)		1,00
DNA-Template		5,00
gesamt		25,00

**Tabelle 61: Komponenten für eine Single-PCR ohne IAC**

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz in $\mu\text{l}$
Brilliant Multiplex QMastermix		12,50
Primer, jeweils	500 nM	1,25
Sonden, jeweils	200 nM	0,50
Aqua dest.		4,50
DNA-Template		5,00
gesamt		25,00

**Tabelle 62: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der *C. novyi*-Gene**

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Gensequenz (Acc. Nr.)
CLN phCfw	GAT TCC TGG TCA AAA GAG TAT T (22 bp)	D32125
CLN phCre	AAA GCG TGA CTT GCT GAA TAA (21 bp)	
CLN phC S	GGT TGG GCA AAA CAA GCT AA (20 bp)	
(FAM)		
CLN alphafw	ATG GAC AAA GAT GGG GTC AA (20 bp)	Z48636
CLN alphare	CCA CCT AAT ACT CGC CAA CC (20 bp)	
CLN alpha S	TGG ATG GCT ACA CTT AAA TGG A (22 bp)	
(HEX)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: FAM = 6-Carboxy-fluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

**Tabelle 63: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von *C. difficile*, *C. septicum* und *C. haemolyticum***

Bezeichnung	Sequenz(5` - 3`)	Genesequenz (Acc. Nr.)
Cdif_tpi_fw	GAA GCT ACT AAG GGT ACA AAT ATA AAG (27 bp)	AY700149
Cdif_tpi_re	TGA ATG TCC TAT TAC AAC ATA GTC CA (26 bp)	
Cdif_tpi_S	GGA GCA TTT ACA GGA GAA GTT TCA (24 bp)	
(CY5)		
Csepticum_fw	GTA AAA CTG AGT CTA AAT TAT CAA AAA C (28 bp)	FJ212777
Csepticum_re	TAC TTT AAA TGA TGT TTT TAC TCC TA (26 bp)	
Csepticum_S	ACA GAT AAC TTT AAA TTT GGA GAA AAA (27 bp)	
(ATTO)		
Chaem_fli_fw	TGA CGG AGC CTA TGG AGT TT (20 bp)	AB058939
Chaem_fli_re	TTT CCA CTT TCT CCA TCA CCT T (22 bp)	
Chaem_fli_S	GCA TCT GTC ACT CCT AAA ACT GG (23 bp)	
(HEX)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: ATTO = N-Hydroxysuccinimidyl-(NHS)-Ester; Cy5 = Cyanin-5; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

**Tabelle 64: Komponenten für einen Quadruplex-PCR Ansatz inklusive IAC**

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz in µl
Brilliant Multiplex QMastermix		12,50
Primer, jeweils		0,70
Sonden, jeweils		0,25
IAC (pUC 19 Plasmid, Konzentration 1 fg)		1,00
DNA-Template		5,00
gesamt		25,10

## **X. DANKSAGUNG**

Ein herzliches Dankeschön an meine großartigen Betreuer, vor allem an Frau Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer und Herrn Dr. Moritz Metzner, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und den Rücken gestärkt haben, egal zu welcher Tages- oder Nachtzeit!

Genauso gilt mein Dank den Doktoranden, die sich die Zeit genommen haben, um mit mir zu den Betrieben zu fahren und zu helfen. Ich weiß, es waren lange und anstrengende Tage.

Auch nicht zu vergessen sind das Labor unserer Klinik sowie das Sekretariat mit den stets gut gelaunten und hilfsbereiten Sekretärinnen!

Mein Dank geht auch an die Abteilung der Lebensmittelmikrobiologie des LGL, insbesondere an Frau Dr. Ute Messelhäuser und Renate Zucker, für die Diagnostik, die vielen Ratschläge und Hilfe!

Das „Botulismus Team“ Hannover stand mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite und ich durfte mich mit allen Fragen an sie wenden. Danke für die Überlassung der Fragebögen und anderen Materialien sowie der Datenbank usw.!

Danke auch an die Landwirte und ihre Familien, die an dieser Studie teilnahmen und uns herzlich empfangen haben!

Last but not least einen herzlichsten Dank an meine Familie, meinen Freund Sebastian sowie Susi und Michi, die alle an meinen Höhen und Tiefen in diesen zwei Jahren teilhaben durften und immer für mich da waren! Vielen Dank auch für das Korrekturlesen!!!