

**Einfluss von Produkten der Firma AHV
auf die Eutergesundheit von bayerischen
Fleckviehkühen**

-

**Eine retrospektive Auswertung der
Tiergesundheit**

von Verena Renate Rötzer

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

**Einfluss von Produkten der Firma AHV auf die Eutergesundheit
von bayerischen Fleckviehkühen**

-

Eine retrospektive Auswertung der Tiergesundheit

von Verena Renate Rötzer

aus Cham (Oberpfalz)

München 2024

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Elke Rauch

Angefertigt an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf
Fakultät Nachhaltige Agrar- und Energiesysteme

Mentorin: Prof. Dr. Dr. Eva Zeiler

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichtersteller: Univ.-Prof. Dr. Elke Rauch

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wolfram Petzl

Tag der Promotion: 10. Februar 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Vorabveröffentlichungen	3
3	Erweiterte Literaturübersicht	5
3.1	Genetik und Milchleistung	6
3.2	Laktationsnummer	6
3.3	Mastitishistorie	7
3.4	Morphologie des Euters.....	8
3.5	Haltung	9
3.6	Hygienemanagement	11
3.7	Trockenstellmanagement	12
3.8	Mastitismanagement	14
3.9	Tierbeobachtung.....	15
3.10	Alternative Behandlungs- und Prophylaxemöglichkeiten bei Biofilm- assoziierten Mastitispathogenen	17
4	Erweitertes Material und Methoden	21
4.1	Übersicht über die teilnehmenden Betriebe und deren Milchkühe	21
4.1.1	Der konventionelle Betrieb	22
4.1.2	Der ökologische Betrieb	23
4.2	Praktische Umsetzung und Datengrundlage	24
4.3	Datenbearbeitung und Berechnung ausgewählter Parameter	27
4.3.1	Parameter zur Evaluation der Eutergesundheit um die Trockenstehphase und während der Laktation	27
4.3.2	Parameter Milchleistung	31
4.4	Statistische Auswertung	32
5	Erweiterte Ergebnisse	33
5.1	Milchleistung	33
5.2	Eutergesundheit	36
5.2.1	Entwicklung und Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehperiode .	36
5.2.2	Entwicklung und Beurteilung der Eutergesundheit in der Laktation	46
5.3	Euterscoring	51
6	Publizierte Studienergebnisse	55
7	Erweiterte Diskussion	77
7.1	Methodik	77
7.2	Milchleistung	77
7.3	Eutergesundheit	78
7.3.1	Eutergesundheit während der Trockenstehperiode.....	78

7.3.2	Eutergesundheit während der Laktation	81
7.4	Tiergesundheitsmonitoring	83
8	Fazit	85
9	Zusammenfassung	87
10	Summary	89
11	Literaturverzeichnis	91
12	Anhang	105
12.1	100 Tage Leistungen der Tiere am konventionellen und ökologischen Betrieb	105
12.2	Deskriptive Analyse der Zellzahlverläufe um die Trockenstehperiode	107
12.3	Deskriptive Analyse der Zellzahlen während der Laktation	108
12.4	Prävalenz und Inzidenz von Mastitis	109
12.5	Verteilung der Rast- und Gützeiten am konventionellen und ökologischen Betrieb	110
13	Danksagung	111

Abkürzungsverzeichnis

a.p.	ante partum, vor der Geburt
AHV	Animal Health Vision
AI	Autoinduktoren
AMP	antimikrobielle Peptide
AMS	Automatisches Melksystem
BAC	Biofilm Adhesion Component
bpT	Bundesverband praktizierende Tierärzte e.V.
BU	Zyto - bakteriologische Untersuchung
<i>C. bovis</i>	<i>Corynebakterium bovis</i>
CC	Conventional culture, konventionelle Kultur
CMT	California Mastitis Test
DART	Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie
DIM	days in milk, Laktationstage
DLQ	Deutscher Verband für Leistungs- und Qualitätsprüfungen e.V.
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Extra zelluläre polymere Substanzen
FV	Fleckvieh
HF	Holstein-Friesian
HSWT	Hochschule Weihenstephan - Triesdorf
ICAR	International Committee for Animal Recording
IMI	Intramammäre Infektion
InK	Kumulative Inzidenz
ITS	Internal teat sealant, interner Zitzenversiegler
JE	Jersey
KNS	Koagulase negative Staphylokokken
LKV	Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V.
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LT	Laktationstag
MB	Mastitisbehandlungen
MLP	Milchleistungsprüfung
NI	Neuinfektion
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
o.b.B.	Ohne besonderen Befund
p.p.	post partum, nach der Geburt
PI	Persistierende Infektion
PM	Probemelkung
Pr	Prävalenz
PräRi	Tiergesundheit, Hygiene und Biosicherheit in deutschen Milchkuhbetrieben – eine Prävalenzstudie

PTS	Propyl-Propan-Thiosulfinat
PTSO	Propyl-Propan-Thiosulfonat
QQ	Quorum Quenching
QS	Quorum Sensing
QSI	Quorum Sensing Inhibition
RAST	Reduktion des Antibiotikaeinsatzes beim Milchvieh durch Selektives Trockenstellen
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
<i>Sc. agalactiae</i>	<i>Streptokokkus agalactiae</i>
<i>Sc. canis</i>	<i>Streptokokkus canis</i>
<i>Sc. uberis</i>	<i>Streptokokkus uberis</i>
SCC	Somatic cell count, somatische Zellzahl
STAR	Selektives Trockenstellen und Antibiotika Reduktion
TAMG	Tierarzneimittel Gesetz
TS	Trockenstellen
VO	Verordnung

Darüber hinaus verwendete Abkürzungen sind im Text erklärt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen aus den Kapiteln 3, 4 und 5

Abbildung 1 Übersicht über wichtige mastitisverursachende Faktoren modifiziert nach Zigo et al. (2021).....	5
Abbildung 2 Verteilung der ausgewerteten Tiere des konventionellen Betriebes aufgeschlüsselt nach der aktuellen Laktationsnummer in der Laktation 2022..	23
Abbildung 3 Verteilung der ausgewerteten Tiere des ökologischen Betriebes aufgeschlüsselt nach der aktuellen Laktationsnummer in der Laktation 2022..	24
Abbildung 4 Eingaben und Untersuchungen jeder ausgewerteten Kuh im zeitlichen Verlauf.....	25
Abbildung 5 <i>Animal Health Vision</i> Erstversorgung bei den ausgewerteten Tieren mit akuter Mastitis in der Laktation 2022	25
Abbildung 6 Überblick über die Kategorien zur Beurteilung des Infektionsgeschehens über die Trockenstehphase modifiziert nach Zeiler und Bechter (2019).....	28
Abbildung 7 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des konventionellen Betriebes nach Laktationen sortiert.....	33
Abbildung 8 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des konventionellen Betriebs nach Behandlungen sortiert	34
Abbildung 9 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des ökologischen Betriebes nach Laktationen sortiert.....	35
Abbildung 10 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des ökologischen Betriebs nach Behandlungen sortiert	36
Abbildung 11 Verteilung der Tiere des konventionellen und ökologischen Betriebes (gemeinsam dargestellt) anhand des Infektionsgeschehens in der Trockenstehphase 2022 nach den Mastitisbehandlungen aus den Vorlaktationen	39
Abbildung 12 Zellzahlverlauf vor dem Trockenstellen und in der darauf folgenden Frühlaktation in den Jahren 2021 und 2022 beim konventionellen Betrieb	40
Abbildung 13 Zellzahlverlauf vor dem Trockenstellen und in der darauf folgenden Frühlaktation in den Jahren 2021 und 2022 beim ökologischen Betrieb	40
Abbildung 14 Klassifizierung der untersuchten Euterviertel in die verschiedenen Kategorien der Eutergesundheit am konventionellen Betrieb	42
Abbildung 15 Klassifizierung der untersuchten Euterviertel in die verschiedenen Kategorien der Eutergesundheit am ökologischen Betrieb	44
Abbildung 16 Anteil an eutergesunden Tieren und Tieren mit erhöhtem und deutlich erhöhtem Zellgehalt aufgeteilt nach Probemelkungen am konventionellen Betrieb in der Laktation 2021 und 2022	47
Abbildung 17 Anteil an eutergesunden Tieren und Tieren mit erhöhtem und deutlich erhöhtem Zellgehalt aufgeteilt nach Probemelkungen am ökologischen Betrieb in der Laktation 2021 und 2022.....	49
Abbildung 18 Zellzahlverlauf während der Laktation 2021 und 2022 beim konventionellen Betrieb.....	50
Abbildung 19 Zellzahlverlauf während der Laktation 2021 und 2022 beim ökologischen Betrieb.....	50
Abbildung 20 Zellzahlkategorien von Tieren mit und ohne Euterödem auf beiden Betrieben.....	53

Abbildungen aus der Publikation

Figure 1. α -diversity shown as effective richness between different sample types and cows.....	66
Figure 2. (A) Bacterial genera and (B) molecular strains obtained from 16S rRNA gene amplicon sequencing of the MC	66
Figure 3. Relative abundance (%) of (A) bacterial species and (B) molecular strains for Cow 6 for MS and TCS.....	67
Figure 4. Relative abundance (%) of (A) bacterial species and (B) molecular strains for Cow 1 MS	68
Figure 5. Relative abundance (%) of (A) bacterial species and (B) molecular strains for Cow 6 MS and TCS.....	69

Tabellenverzeichnis

Tabellen aus den Kapiteln 2, 3, 4, 5 und 12

Tabelle 1 Gehaltene Vorträge der Autorin	3
Tabelle 2 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehphase und in der Laktation mit den Ergebnissen aus dem PräRi Bericht für die Region Süd, sowie den Ergebnissen aus dem LKV Jahresbericht 2021 in Bayern und den Ergebnissen von ökologischen Betrieben von Hansmann et al. (2019).....	10
Tabelle 3 Überblick über drei verschiedene Konzepte zum selektiven Trockenstellen auf Herdenebene	13
Tabelle 4 Überblick über Mastitispathogene und deren Fähigkeit zur Biofilmbildung modifiziert nach Gomes et al. (2016).....	19
Tabelle 5 Überblick über die Betriebskennzahlen des konventionellen Betriebes im Jahr 2021	22
Tabelle 6 Überblick über die Betriebskennzahlen des ökologischen Betriebes im Jahr 2021	23
Tabelle 7 Übersicht über wichtige Inhaltsstoffe der verwendeten <i>Animal Health Vision</i> Produkte modifiziert nach Müller (2022)	26
Tabelle 8 Überblick über die erfassten Daten der Tiere und Betriebe	27
Tabelle 9 Auswertung der betrieblich getrennten Beurteilungskriterien für die verschiedenen Konzepte zum selektiven Trockenstellen	37
Tabelle 10 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehperiode 2021 und 2022 für den konventionellen Betrieb.....	37
Tabelle 11 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehperiode 2021 und 2022 für den ökologischen Betrieb.....	38
Tabelle 12 Detektierte Pathogene aus den Viertelgemelksproben in der 1. und 2. BU am konventionellen Betrieb.....	41
Tabelle 13 Detektierte Pathogene aus den Viertelgemelksproben in der 1. und 2. BU am ökologischen Betrieb.....	43
Tabelle 14 Bakteriologische und zytologische Heilungsraten aufgeteilt nach Erreger am konventionellen Betrieb.....	45
Tabelle 15 Bakteriologische und zytologische Heilungsraten aufgeteilt nach Erreger am ökologischen Betrieb.....	46
Tabelle 16 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Laktation 2021 und 2022 für den konventionellen Betrieb.....	47
Tabelle 17 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Laktation 2021 und 2022 für den ökologischen Betrieb.....	48
Tabelle 18 Anzahl an Mastitiserstversorgungen und Antibiotikabehandlungen bei Mastitiserkrankungen in der Laktation 2022	51
Tabelle 19 Hygienescore der beurteilten Euter einschließlich der Hintergliedmaßen, betrieblich getrennt.....	51
Tabelle 20 Tiere mit tiefhängendem Euter im Zusammenhang mit dem Hygienescore und der Zellzahl auf beiden Betrieben	52
Tabelle 21 Übersicht über die Ergebnisse aus der palpatorischen Untersuchung betrieblich getrennt.....	52
Tabelle A1 100 Tage Leistung der ausgewerteten Kühe am konventionellen Betrieb sortiert nach der aktuellen Laktationsnummer	105

Tabelle A2 100 Tage Leistung der ausgewerteten Kühe am ökologischen Betrieb sortiert nach der aktuellen Laktationsnummer	106
Tabelle A3 Deskriptive Analyse zu den Zellzahlen in der Probemelkung vor dem Trockenstellen und in den ersten drei Probemelkungen in der Folgelaktation in den Laktationen 2021 und 2022 für beide Betriebe getrennt.....	107
Tabelle A4 Deskriptive Analyse zu den Zellzahlen in der Probemelkung in den ersten fünf Probemelkungen in der Laktationen 2021 und 2022 für beide Betriebe getrennt.....	108
Tabelle A5 Inzidenz und Prävalenz von Mastitis in den ersten 100 Laktationstagen in den Laktationen 2021 und 2022	109
Tabelle A6 Deskriptive Analyse zur Rastzeit und Gützeit der ausgewerteten Tiere im konventionellen Betrieb in den Laktationen 2021 und 2022	110
Tabelle A7 Deskriptive Analyse zur Rastzeit und Gützeit der ausgewerteten Tiere im ökologischen Betrieb in den Laktationen 2021 und 2022	110

Tabellen aus der Publikation

Table 1. Overview of the scoring of the cows including general examination, further examination of the udder, and sensory examination of the milk secretion	59
Table 2. Evaluation of cytological and bacteriological results as part of mastitis categorization on the quarter level according to Fehlings et al. (2012).....	60
Table 3. Overview of all data collected in the scoring and the cytological and bacteriological examination including the evaluation	63
Table 4. DNA content in experimental samples.....	65
Table 5. Bacterial species present in the mock community (MC) according to the manufacturer's specifications and obtained molecular species (OTU)	65

Gender - Disclaimer

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter

1 Einleitung

Die Novellierungen des Arzneimittelgesetzes, die Zunahme an multiresistenten Keimen und die gesellschaftspolitische Diskussion um den Einsatz von Antibiotika stellen die aktuellen Anforderungen zum Antibiotikaeinsatz im Nutztierbereich dar. Zum einen werden Tiere und Menschen oft von gleichen Krankheitserregern infiziert und mit denselben Antibiotika behandelt. Zum anderen ist die Zunahme von bakteriellen krankmachenden Erregern, die gegenüber Antibiotika weniger empfindlich oder völlig resistent geworden sind, zu einer globalen Herausforderung geworden (Bundesministerium für Gesundheit 2015). Daraus resultierend bewegen sich Landwirte und Tierärzte zunehmend in einem Spannungsfeld aus gesetzlichen Vorgaben, gesellschaftlichen Erwartungen und der Gesunderhaltung der Tiere. Dies führt zur Forderung der Reduktion des Antibiotikaeinsatzes und bringt den Wunsch nach wartezeitfreien Behandlungsalternativen auf. Aus diesem Grund richtet sich eine Zielsetzung aus dem Abschlussbericht „DART 2020“ an die Unterstützung der Forschung und Entwicklung von Alternativen zur Antibiotika-Therapie. Konkret wird beschrieben, dass ein Beispiel für alternative Therapiemöglichkeiten die so genannte Antivirulenz-Strategie darstellt. Dabei wird die Bildung von Resistenzen umgangen, indem die Erreger nicht abgetötet, sondern „entwaffnet“ werden. So sollen gezielt krankmachende Proteine, bakterielle Gifte oder Signalstoffe blockiert und dadurch Infektionen vermieden werden (Bundesministerium für Gesundheit 2022). Im Euterbereich gibt es eine Vielzahl an alternativen Behandlungsmöglichkeiten, die sowohl in der Therapie als auch zur Prophylaxe eingesetzt werden. Dazu zählen beispielsweise die Phagentherapie und deren Endolysine, antimikrobielle Peptide (AMP) und Bakteriozine, Probiotika, Immunotherapie / Impfungen, nanopartikelbasierte Therapie, Stammzelltherapie, Laktoferrin oder Phytotherapie (Sharun et al. 2021). Viele dieser genannten Optionen sind bisher gut im Labor erforscht, jedoch mangelt es an Studien aus der Praxis (Pedersen et al. 2021). Auch das Prinzip der Verminderung der Quorum Sensing (QS) Signalkaskade und die Blockade bakterieller Kommunikation mittels Quorum Quenching (QQ) oder Quorum Sensing Inhibition (QSI) kann eine vielversprechende pflanzliche Strategie darstellen (Vollstedt und Streit 2021). Praxistaugliche Anwendung im Rinderbereich finden derzeit Produkte der Firma *Animal Health Vision* (AHV) mit thiosulfurhaltigen Zusammensetzungen, insbesondere *Propyl-Propan-Thiosulfonat* (PTSO) und *Propyl-Propan-Thiosulfinat* (PTS), die auf diesem Wirkprinzip zur Behandlung von Infektionen und die Reduzierung und Abbau von Biofilmen eingesetzt werden (Streefland und DeRooij 2021).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die retrospektive Beurteilung der Eutergesundheit nach der Umstellung auf eine soweit vertretbare antibiotikafreie Prophylaxe und Therapie von intramammären Infektionen bei bayerischen Milchkühen auf einem konventionellen und ökologischen Betrieb. Insbesondere wurden Einflüsse durch das betriebsspezifische Management und die Unterschiede zwischen den beiden Haltungformen herausgearbeitet. Aus den Ergebnissen können mögliche Schlussfolgerungen für den Einsatz in der gängigen Praxis und für weitere Studien gezogen werden.

Um einen möglichst tiefgreifenden Einblick in die Eutergesundheit von Milchkühen zu bekommen, befasste sich die Publikation mit der 16S rRNA Sequenzierung von steril entnommenen Milchproben aus der Euterzisterne und Tupfern aus dem Strichkanal unter Feldbedingungen. Als Ziel der Untersuchung galt es herauszufinden, ob eine kontaminationsarme Probenentnahme im Stall möglich ist und ob neben den gängigen pathogenen Mastitiserregern noch andere Bakterien in gesunden oder infizierten Vierteln vorhanden sind. Dies würde auf ein Vorhandensein einer bakteriellen Gemeinschaft im Euter, dem sog. Mikrobiom, hinweisen.

2 Vorabveröffentlichungen

Tabelle 1 Gehaltene Vorträge der Autorin

Vortrags - Rahmen	Titel	Datum
Tiergesundheit neu gedacht, Leipzig	Retrospektive Auswertung zum Einsatz von alternativen Produkten zur Verbesserung der Eutergesundheit von Milchkühen	08.11.2022
bpT Kongress 2022, Hannover	Retrospektive Auswertung zum Einsatz von alternativen Produkten zur Verbesserung der Eutergesundheit von Milchkühen	19.11.2022

3 Erweiterte Literaturübersicht

Die Eutergesundheit von Milchkühen war und ist eines der bedeutendsten Themen in der Milchviehhaltung. Kommt es zu entzündlichen Prozessen im Drüsengewebe des Euters, so wird dies als Mastitis bezeichnet. Eine Mastitis hat vielseitige und erhebliche Folgen für das betroffene Tier, den Landwirt und seinen Betrieb. Die Eutergesundheit ist kein statischer oder stabiler Zustand, sondern ein fragiles Gleichgewicht, das durch viele Faktoren beeinflusst wird (Becker und Märtlbauer 2016). Ein erhöhtes Risiko für Eutererkrankungen resultiert folglich meist aus dem Vorhandensein von Mastitiserregern, der Anfälligkeit der Milchkuh für eine Infektion und den gleichzeitig vorherrschenden Umweltbedingungen am Betrieb (Zigo et al. 2021). Bei einer Mastitis ist das Gleichgewicht zwischen Erreger (Pathogen), Tier (Host) und Umwelt aus der Balance gebracht (Abbildung 1).

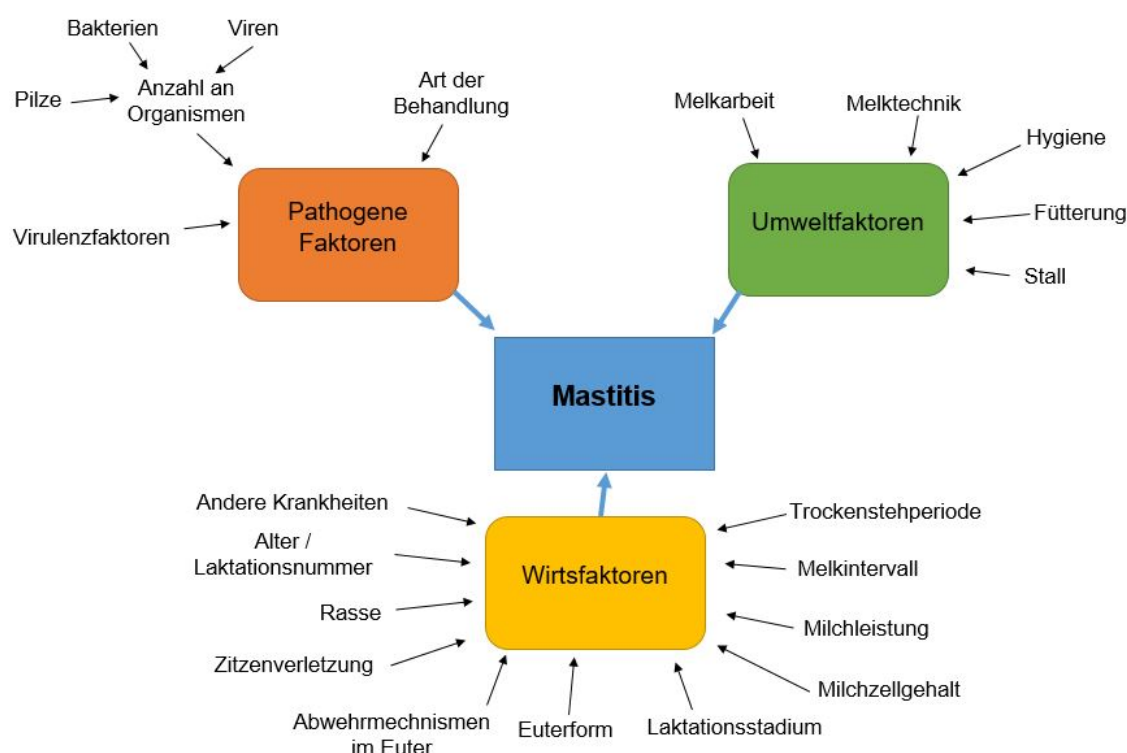


Abbildung 1 Übersicht über wichtige mastitisverursachende Faktoren modifiziert nach Zigo et al. (2021)

Auf Grund der Komplexität der Erkrankung wird Mastitis auch als Faktorenkrankheit bezeichnet. Viele verschiedene Komponenten nehmen einen Einfluss auf das Infektionsgeschehen, den Verlauf und die Heilungschancen des betroffenen Rindes (Fehlings et al. 2012). Diese Risikofaktoren können viertelspezifisch, tierspezifisch oder bestandspezifischer Natur sein und beeinflussen die Anfälligkeit eines Viertels für eine Euterentzündung. Im Folgenden sollen wichtige Faktoren näher erläutert werden, die ein Risiko für die Eutergesundheit des Einzeltiers und der Herde darstellen. Manche Parameter sind nur langfristig oder wenig bis gar nicht zu beeinflussen, wohingegen aber vor allem Maßnahmen im Management meist unmittelbar umsetzbar sind (Krömker 2007).

3.1 Genetik und Milchleistung

Die Parameter Genetik und Milchleistung sind in einem Punkt zusammengefasst, da die genetische Selektion auf eine höhere Milchleistung sich nachweislich nachteilig auf den Gesundheitszustand der Milchdrüse auswirkt (Zadoks et al. 2011). Es ist davon auszugehen, dass die Milchleistung mit dem Auftreten von Mastitiden korreliert (Costa et al. 2019). So sind Holstein Friesian (HF) Kühe in der Regel mit einer hohen Milchleistung assoziiert, aber auch anfälliger für Mastitiden als Züchtungen mit mittlerer Milchleistung, wie zum Beispiel Jersey (JE) Rinder (Washburn et al. 2002; Shaheen et al. 2016). Praktische Studien zeigen, dass die Inzidenz für Mastitis bei Hochleistungskühen (305 Tage Leistung Q75: 8711 kg) höher war als bei Tieren mit niedriger Milchleistung (305 Tage Leistung Q25: 6151 kg) (Moussavi et al. 2012; Hagnestam et al. 2007). Eine wichtige Rolle spielt dabei die Tatsache, dass diese Tiere einem stärkeren metabolischen Stress ausgesetzt sind und folglich auch ein höheres Risiko für Folgeerkrankungen, wie beispielsweise Mastitis haben (Oltenacu und Broom 2010). Insbesondere eine hohe Milchleistung (> 44 Liter/Tag) nach dem Abkalben scheint ein wesentlicher Risikofaktor für eine Neuinfektion (NI) in den Wochen nach der Geburt mit Umwelt-assoziierten Mastitiserregern zu sein (Nitz et al. 2021). Interessanterweise steigt nicht nur die Mastitisinzidenz mit zunehmender Milchleistung an, sondern auch die Neigung zu Mastitisrezidiven (Jamali et al. 2018). Betrachtet man die Zellzahl, die als Indikator für die Eutergesundheit gilt, zeigen sich deutliche Zellzahlunterschiede innerhalb der Züchtungen (Sharma et al. 2011a). Kühe der Rasse Fleckvieh (FV) (2. Laktation (LA), 77.000 Z/ml) haben im Vergleich zu anderen Rassen, wie HF (2. LA, 86.000 Z/ml), JE (2. LA, 112.000 Z/ml) oder Rendena Kühen (2. LA, 98.000 Z/ml) einen niedrigeren Zellgehalt und gelten als Rasse mit dem niedrigsten Zellgehalt (Rupp und Boichard 2003; Vicario et al. 2005; Magro et al. 2023). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Milchleistung und vorrangig die spezialisierte Zucht hochleistender Rinder einen negativen Einfluss auf die Eutergesundheit hat, insbesondere hinsichtlich der Anfälligkeit für Mastitiden (Cheng und Han 2020).

3.2 Laktationsnummer

Der Zellzahlanstieg mit zunehmender Laktationsnummer kann durch einen schlechten Zitzenschluss, die zunehmende Milchleistung und die damit verbundene erhöhte Infektanfälligkeit verursacht werden (Schwarz et al. 2020; Kibebew 2017). Studien haben nachgewiesen, dass Tiere in der zweiten Laktation mit die geringsten (differenzierten) somatischen Zellzahlen (FV, 2. LA, 77.000 Z/ml) haben (Magro et al. 2023). Wohingegen Tiere mit vier oder mehr Laktationen am häufigsten in den Gruppen mit schlechtem Eutergesundheitszustand (Mastitis und chronisch persistierende Mastitis) vertreten waren und höhere Zellzahlen aufwiesen (FV, ≥ 4 . LA, 121.000 Z/ml) (Bobbo et al. 2019; Zecconi et al. 2020; Magro et al. 2023). Zusammenfassend kann man sagen, dass Alter und die daraus resultierende Laktationsnummer das Risiko für intramammäre Infektionen (IMI) negativ beeinflussen (Cheng und Han 2020).

Dennoch hat sich unabhängig von der Laktationsnummer die Zellzahlgrenze von ≤ 100.000 Z/ml sowohl auf Viertel- als auch auf Kuhebene zur Beurteilung von gesunden Vierteln und Eutern etabliert (Winter 2009). Denn meist sind altersassoziierte Veränderungen im Euter nicht der Grund für den Anstieg an somatischen Zellen, sondern dieser lässt sich auf eine erhöhte Infektionsrate bei älteren Tieren zurückführen (Krömker 2007).

3.3 Mastitishistorie

Potenzielle Faktoren wie beispielsweise Epithelschäden im Eutergewebe, die Beeinträchtigung des Immunsystems, der Schweregrad und die Art des Erregers bei einer Mastitis können bei der Beurteilung der Mastitishistorie einer Kuh eine Rolle spielen. Es ist nachgewiesen worden, dass das Vorhandensein von Mastitiserregern im Euter und die dadurch ausgelöste Immunantwort des Wirts für Schäden am Epithel im Euter verantwortlich sind, insbesondere wenn die Mastitis subklinisch oder wiederkehrend verläuft (Costa et al. 2020; Zhao und Lacasse 2008). Somit schädigt jede Mastitis das Euterepithel, zumeist irreversibel, und führt daher zu einer Umgestaltung der Epithelpermeabilität. Infolgedessen verändert sich das osmotische Gleichgewicht in den alveolären Strukturen und es kommt zu einer abweichenden Zusammensetzung der Milch (Ruegg 2017). In welchem Ausmaß sich ein geschädigtes Eutergewebe im Lauf einer Laktation gänzlich regenerieren kann, ist noch nicht vollständig geklärt. Häufig bleiben nach überstandenen klinischen Mastitiden aber Veränderungen (z.B. Knoten, Verhärtungen) im Eutergewebe zurück und eine vollständige Wiederherstellung ist in den meisten Fällen unwahrscheinlich (Fehlings et al. 2012).

Neben den Schäden im Eutergewebe kann das verringerte Abwehrvermögen des angeborenen Immunsystems wegen einer früheren Infektion das erneute Auftreten einer Infektion im Viertel befördern (Green et al. 2002). Die oben aufgeführten möglichen Faktoren decken sich mit den Ergebnissen von Jamali et al. (2018), die in einer Übersichtsarbeit das Wissen über das Risiko für wiederholte Fälle klinischer Mastitis als auch über die Risikofaktoren für das Wiederauftreten von klinischen Mastitiden zusammengefasst haben. Es hat sich herausgestellt, dass eine klinische Mastitis in der Vorlaktation, das Risiko für eine erneute klinische Mastitis in der Folgelaktation um das 1,5- bis 3,8- fache erhöht. Wobei der Schweregrad der Mastitis im vorangegangenen Fall eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Hingegen ist die Erregerart der Erstinfektion entscheidend für das spätere Rezidivrisiko. Eine bestimmte Erregerart oder -gruppe, die zu wiederkehrenden Fällen führt, kann aber nicht klar definiert werden (Jamali et al. 2018).

Die Mastitishistorie kann auch als Entscheidungshilfe für eine antibiotische Behandlung beim selektiven Trockenstellen herangezogen werden, da bereits eine diagnostizierte klinische Mastitis in der vorangegangenen Laktation die Wahrscheinlichkeit für eine erneute Mastitis in der Folgelaktation, vor allem um den Zeitpunkt der Kalbung, erhöht (Wittek et al. 2018; Osterås et al. 2008; Spohr et al. 2014). Allerdings weist die Mastitishistorie laut Kiesner et al. (2016) eine zu geringe Genauigkeit auf, weshalb sie zumindest in Kombination zur Zellzahl verwendet werden sollte.

Der durch die Entzündung hervorgerufene Schaden am Gewebe kann auch Auswirkungen auf die Zellzahl und die Milchleistung des betroffenen Viertels haben. Die Zellzahl, als Ausdruck für die Auswanderung von neutrophilen Granulozyten, kann je nach Ausmaß des Schadens auf Grund der durchlässigeren Blut-Euter Schranke, noch mehrere Wochen nach einer Entzündung erhöht sein (Winter 2009). Sollte eine Infektion nicht vollständig ausheilen, kann es zu dauerhaft erhöhten Zellzahlen kommen und man spricht von einer chronischen Mastitis (Becker und Märtlbauer 2016). Der Schaden am Gewebe könnte darüber hinaus eine Erklärung für die verringerte Milchleistung von Kühen mit schlechter Eutergesundheit (chronisch persistierende Mastitis) sein (Magro et al. 2023). Durchschnittlich sinkt die produzierte Milchmenge eines infizierten Viertels um rund 30% (Krömker 2007). Somit hat die Anzahl an Mastitiden einer Kuh in der vorangegangenen Laktation nicht nur negative Konsequenzen auf die Eutergesundheit in der Folgelaktation, sondern auch auf ihre Milchleistung.

3.4 Morphologie des Euters

Die morphologischen Abweichungen an Euter und Zitzen von Milchkühen sind zahlreich und haben verschiedene Ursachen, wie z.B. Genetik oder Mängel beim Milchentzug (Winter 2009). Da Euter und Zitzen die erste Barriere gegen IMI bilden, haben verschiedene Euter- und Zitzenformen, wie tiefhängende Euter, breite und große Zitzen oder flache Zitzenenden einen Einfluss auf die Mastitisanfälligkeit (Cheng und Han 2020). Erhebliche morphologische Abweichungen können zudem das Verletzungsrisiko erhöhen und eine Exposition für Mastitiserreger aus der Umgebung darstellen (Rupp und Boichard 2003). Tiefhängende Euter haben meist eine höhere somatische Zellzahl als nicht tiefhängende Euter und folglich auch eine höhere Mastitisprävalenz (Hussain et al. 2012; Sharma et al. 2017). Ähnliche Ergebnisse wurden rasseunabhängig sowohl bei JE Kühen und HF Tieren gefunden (Bharti et al. 2015; Bhutto et al. 2010). Da aber die Laktationsnummer als mögliche Einflussgröße bei den beobachteten Tieren meist nicht näher beschrieben war, können keine weiteren Aussagen über eine mögliche altersbedingte Lockerung des Aufhängeapparates gemacht werden.

Eine weitere Abweichung der Morphologie des Euters stellt das Euterödem dar. Ödeme können physiologisch zwei Wochen vor und zwei Wochen nach dem Abkalben auftreten. Die Prävalenz für Euterödem von bayerischen Milchkühen liegt unabhängig vom Laktationszeitpunkt bei 1,1%, wobei die Frühaktation (ersten 60 LT) als Risikofaktor definiert werden konnte (Groh et al. 2022). Hat eine Kuh ein Euterödem, so wird in dieser Zeit das Euter meist unvollständig ausgemolken. Dadurch verbleibt ein hoher Anteil an Restmilch im Euter, was zum Anstieg des Mastitisrisikos führt (Winter 2009). Darüber hinaus wird eine Öffnung und Durchlässigkeit des Zitzenkanals im Zusammenhang mit Euterödemen vermutet, was die Anfälligkeit für IMI weiter erhöht (Wieland et al. 2018). Ödeme entzündlicher Natur treten häufig als Begleitsymptome bei bestimmten Mastitisformen wie parenchymatöser oder gangräneszierender Mastitis auf (Winter 2009).

Es bleibt festzuhalten, dass die Morphologie des Euters und der Zitzen einen erheblichen Einfluss auf die Eutergesundheit der Tiere hat. So führt meist jegliche Abweichung am Euter oder bei den Zitzen von der Norm zu einer Verschlechterung der Eutergesundheit.

3.5 Haltung

Grundlegend kann man zwischen der konventionellen und ökologischen Bewirtschaftungsweise unterscheiden. Die Regelungen für ökologisch wirtschaftende Betriebe zielen auf eine Steigerung des Tierwohles und der Tiergesundheit ab. Die in Deutschland geltende EU-Öko-Basisverordnung und ihre Durchführungsbestimmungen ((VO (EG) 2018/848) und weitere Ergänzungen) sowie weitere verbandsspezifische Richtlinien fordern unter anderem eine angemessene niedrigere Besatzdichte (6,0m² Fläche im Stall und zusätzlich 4,5m² Auslauf), Weidezugang, sobald es die Witterungsbedingungen erlauben und Liegeflächen mit natürlichem Einstreumaterial für jede Milchkuh. Durch den limitierten Einsatz von Antibiotika und die Restriktionen im Einsatz von Futtermitteln, wie beispielsweise Soja- und Rapsextraktionsschrot, können IMI mit bestimmten Erregern begünstigt werden (Vaarst et al. 2003). Darüber hinaus stellen auch das in der ökologischen Bewirtschaftung häufig fortgeschrittene Herdenalter eine besondere Herausforderung für die Eutergesundheit der Milchrindern dar (Hansmann et al. 2019). Folglich wurde das vermehrte Auftreten von Mastitiden auf vielen Bio-Betrieben, auch in Deutschland, als großes Problem beschrieben (Weller und Bowling 2000; Vaarst et al. 2003; Volling et al. 2005; Hansmann et al. 2019).

Neben der Inzidenz von Mastitis gibt es noch weitere Faktoren zur Beurteilung der Eutergesundheit, so wurde in verschiedenen Studien über ökologische Milchviehherden eine Rate von 42 – 56% bei den eutergesunden Tieren sowie eine Neuinfektionsrate während der Laktation von 27 – 29% ermittelt (Müller und Sauerwein 2010; Krömker und Volling 2013). Über die Trockenstehphase hinweg werden Neuinfektionsraten auf ökologischen Betrieben von 32 – 44% und eine Heilungsrate während der Trockenstehphase von 48 – 68% beschrieben (Krömker und Volling 2013; Kiesner et al. 2016). Ergänzend zu den oben genannten Kennzahlen, können mit Hilfe des Grenzwertes von 100.000 Z/ml weitere Parameter sowohl in der Trockenstehphase als auch in der Laktation berechnet werden, um die Eutergesundheit auf Betrieben beurteilen zu können. Hierzu werden je nach Kennzahl verschiedene Probemelkungen (PM) miteinander verglichen. Die Richtlinie des Deutschen Verbandes für Leistungs- und Qualitätsprüfungen e.V. (DLQ) gibt sowohl die Definitionen für die Kennzahlen vor, als auch Ziel- und Warnwerte (DLQ 2020). Die wichtigsten Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit während der Trockenstehperiode und der Laktation sind nachfolgenden dargestellt. Zusätzlich sind die Daten aus der PräRi Studie von Süddeutschland (PräRi 2020) und die Daten des Landeskuratoriums der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V.(LKV) für das Jahr 2021 (LKV Bayern 2021) zum Vergleich angefügt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der ökologischen Betriebe wurden die Kennzahlen einer aktuellen Studie von Hansmann et al. (2019) verwendet, die die Eutergesundheit von 21 ökologischen Betrieben in Norddeutschland evaluiert haben.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, werden in Süddeutschland die Schwellenwerte nicht überschritten, in Bayern ist die Eutergesundheit bei den konventionellen Betrieben tendenziell noch etwas besser als im süddeutschen Durchschnitt. Die ökologischen Betriebe hingegen schneiden am schlechtesten ab.

Tabelle 2 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehphase und in der Laktation mit den Ergebnissen aus dem PräRi Bericht für die Region Süd, sowie den Ergebnissen aus dem LKV Jahresbericht 2021 in Bayern und den Ergebnissen von ökologischen Betrieben von Hansmann et al. (2019)

Kennzahlen	DLQ Schwellenwert	PräRi Süd (n = 723)	Bayern 2021 (n = 16.788)	Hansmann et al. (2019) (ökologisch) (n = 21)
Neuinfektionsrate Trockenstehphase	≥ 30,0%	24,5%	16,7%	34,1%
Heilungsrate in der Trockenstehphase	≤ 50,0%	58,3%	71,0%	50,4%
Anteil eutergesunder Tiere in der Laktation	≤ 50,0%	59,9%	70,2%	45,4%
Anteil mit dtl. erhöhtem Zellgehalt in der Laktation	≥ 15,0%	-	-	-
Anteil chronisch kranker euterkranker Tiere in der Laktation	≥ 5,0%	0,7%	-	1,5%
Neuinfektionsrate in der Laktation	≥ 25,0%	18,9%	13,9%	27,4%

n = Anzahl der geprüften Betriebe

Bei der Betrachtung des Zellgehalts in der Milch in Süddeutschland zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den beiden Haltungformen. Im Median beträgt die ermittelte Zellzahl für die Region Süd 193.000 Z/ml (PräRi 2020), für die Rasse Fleckvieh in Bayern im Durchschnitt 198.000 Z/ml. Für Fleckviehkühe in ökologische Betriebe ergibt sich eine durchschnittliche Zellzahl von 212.000 Z/ml (LKV Bayern 2021).

Verschiedene Fakten erschweren die Vergleichbarkeit von Aussagen über den Gesundheitszustand von Kühen in konventionellen und ökologischen Systemen. Zum einen existieren nur wenige kontrollierte experimentelle Studien ($n = 2$). Die meisten Ergebnisse stützen sich auf Beobachtungsstudien ($n = 45$) (van Wagenberg et al. 2017). Zum zweiten variieren einzelne Studien in einigen Ergebnissen so stark, dass eindeutige Schlussfolgerungen kaum zu ziehen sind (Duval et al. 2020). Des Weiteren erschwert der teilweise zugrunde gelegte Maßstab, wie z.B. „Anzahl der Behandlungen“, eine Bewertung. Er suggeriert, dass sich die Gesundheit von Herden in ökologischen Betrieben im Vergleich zu konventionellen Betrieben verbessert hat (Duval et al. 2020). Dieses Maß ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da die bloße Angabe einer geringeren Anzahl an Behandlungen nicht zwangsläufig mit einer geringeren Krankheitsinzidenz gleichzusetzen ist. Betriebsabhängige unterschiedliche Hürden für die Behandlung kranker Tiere, z.B. auf Grund längerer Wartezeiten für Milch, können die Ergebnisse verfälschen (Wagenaar et al. 2011; Borell und Sørensen 2004). Darüber hinaus wird die Anwendung konventioneller Behandlungen im Allgemeinen von Tierärzten aufgezeichnet, während alternative Behandlungen nicht unbedingt systematisch gemeldet werden. Dies kann die Zahl der in ökologischen Betrieben erfassten Behandlungen möglicherweise verringern (Valle et al. 2007).

Trotz der beschriebenen Probleme hinsichtlich der Datenerhebung und -beurteilung tendieren die Erkenntnisse aus der Literatur zu der Aussage, dass die Eutergesundheit ökologischer Milchviehherden mit der konventionell gehaltenen Herden vergleichbar ist, insbesondere bei einem guten Management (Zapata-Salas et al. 2022; Müller und Sauerwein 2010; Weller und Bowling 2000). Dass hinsichtlich einzelner Parameter dennoch ein Unterschied zugunsten der konventionellen Haltung erkennbar ist, macht deutlich, dass die Haltungsform von Rindern nicht ohne Einfluss auf die Eutergesundheit bleibt (Krömker und Volling 2013).

3.6 Hygienemanagement

Es hat sich herausgestellt, dass die Hygiene am Betrieb maßgeblich die Eutergesundheit beeinflusst (Zapata-Salas et al. 2022). So wurde ein vierstufiger Hygienescore entwickelt, um den Grad der Verschmutzung mit Fäzes in der Euterregion besser einteilen zu können und eine Vergleichbarkeit zwischen den Studien zu schaffen (Schreiner und Ruegg 2002; Cook und Reinemann 2006). Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen mangelhaften betrieblichen Hygienebedingungen und der Verschlechterung der Eutergesundheit hergestellt (Hohmann et al. 2020). Durch die Verschmutzung des Euters steigt die Anzahl der Keime auf der Euterhaut und damit die Gefahr, dass sich die Kuh infiziert und das Euter erkrankt (Svennesen et al. 2019; Giovanni und Zeconi 2002). Die Zitzenhaut ist ein Reservoir für Mikroorganismen, insbesondere für *gram*-positive Bakterien und Koagulase negative Staphylokokken (KNS) (Monsallier et al. 2012). Dies kann zu einem vermehrten Eindringen von pathogenen Bakterien über den Zitzenkanal in das Euter führen. Durch die Verschmutzung des Euters erhöht sich nicht nur die Mastitisinzidenz, sondern auch die Zellzahl (Reneau et al. 2005; Schreiner und Ruegg 2003; Volling et al. 2011). Diverse Haltungs- und Managementfaktoren haben erhebliche Auswirkungen auf die bakterielle Kontamination der Zitzenhaut. Gösling et al. (2019) haben herausgefunden, dass beispielsweise der Zugang zur Weide und die Auswirkungen auf die Eutergesundheit betriebsindividuell differenziert abgeschätzt werden muss, da vor allem die Weidetriebe in Abhängigkeit von Witterungsbedingungen eine entscheidende Rolle spielen. Schlechte Wetterbedingungen und Nässe sind mit erhöhten Zellzahlen in der Herdensammelmilch verbunden (Barnouin et al. 2004). Daher ist davon auszugehen, dass eine Festigung der Weidetriebe für die Eutergesundheit förderlich ist, wenn es die Sauberkeit der Laufwege und damit verbunden auch die Sauberkeit der Liegeflächen und folglich der Tiere verbessert (Barnouin et al. 2004; Kelly et al. 2009; Volling et al. 2011). Als weitere Einflussfaktoren auf die erwähnte bakterielle Kontamination der Zitzenhaut wurden in einer weiteren Studie das Alter des Einstreumaterials und die Frequenz, in der die Liegeflächen der Tiere gereinigt wurden, genannt (Hohmann et al. 2020). Eine zweimal täglich durchgeführte Liegeboxenpflege, das tägliche Erneuern des Einstreumaterials im hinteren Bereich der Liegebox und das Reinigen der Laufgänge mehrmals am Tag verringert die Bakterienbelastung (DeVries et al. 2012; Hohmann et al. 2020).

Wobei die Methode der Laufflächenreinigung ebenfalls eine Rolle spielt und der Abschieberoboter im Vergleich zu Schiebern, zum manuellen Entfernen oder zum Einsatz von Fahrzeugen im Hinblick auf die Eutergesundheit am besten abschneidet (Gösling et al. 2021). Diese Maßnahmen dienen überwiegend einer Verringerung der Keimdichte. Denn die Keimdichte im Einstreu korreliert mit der Keimbesiedelung der Zitzen spitzen und beim Liegen können Krankheitserreger vom Einstreu auf die Zitzenhaut übertragen werden (Lowe et al. 2015; Rowbotham und Ruegg 2016). Zudem gelten das Einstreumaterial und die Fäzes der Rinder als wichtigstes Reservoir und Vektoren für Umwelt-assoziierte Mastitispathogene (Munoz et al. 2006; Zadoks et al. 2005; Patel et al. 2019; Ericsson Unnerstad et al. 2009). Das Einhalten von Richtwerten für Keimzahlen in unbenutzter Einstreu weisen ein verringertes Mastitisrisiko aus. So gilt eine Gesamtkeimzahl von 7×10^8 cfu/g als Richtwert für frisches Stroh und kann zur Beurteilung des Infektionsrisikos durch pathogenen Mikroorganismen im frischen Einstreumaterial herangezogen werden (Krömker et al. 2010). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl Handlungs- als auch Managementfaktoren, die die Hygiene der Herde verbessern, einen großen positiven Einfluss auf die Eutergesundheit haben (Cheng und Han 2020).

3.7 Trockenstellmanagement

Das Trockenstellmanagement stellt eines der zentralsten Ereignisse in Bezug auf die Eutergesundheit dar, denn während der Trockenstehphase können infizierte Viertel ausheilen und das Euter kann sich regenerieren (Krömker und Leimbach 2017; tho Seeth et al. 2015; Zhao et al. 2019). Zugleich aber birgt diese Phase auf Grund der Umbauvorgänge im Eutergewebe ein hohes Risiko für Neuinfektionen vor allem zu Beginn des Trockenstehens (tho Seeth et al. 2015). Infizierte Viertel zum Zeitpunkt nach der Kalbung resultieren bei antibiotisch trockengestellten Vierteln meist aus Neuinfektionen in der Trockenstehphase und weniger aus persistent infizierten Vierteln (Nitz et al. 2021). Darüber hinaus erhöht eine IMI über die Trockenstehzeit das Risiko für eine klinische Mastitis in der frühen Folgelaktation (Pantoja et al. 2009). Für lange Zeit war das „blinde Trockenstellen“ aller Viertel mit antibiotischen Trockenstellern gängige Praxis. Im Zuge neuer gesetzlicher Regelungen in der EU (2019/6) (EU 2019) und auf Basis neuer Erkenntnisse hat sich das selektive Trockenstellen (TS) von euterkranken Tieren etabliert. Für das selektive Trockenstellen gibt es verschiedene Konzepte, die sich hinsichtlich der Kriterien sowohl auf Herden- als auch auf Einzeltierebene geringfügig voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Überblick über drei verschiedene Konzepte zum selektiven Trockenstellen auf Herdenebene

Trockenstellprogramm	(Zellzahl-) Kriterien	Kennzahlen	Keimbestimmung
<i>RAST (TGD, LMU, LfL, 2020)</i>	Theoretische Herdensammelmilch Zellzahl < 200.000 Z/ml in den letzten 3 PM	Neuinfektionsrate in der Trockenperiode < 25%	Bestanduntersuchung bzw. regelmäßige Beprobung: frei von <i>Sc. agalactiae</i> und <i>Sc. canis</i> ; <i>Sc. uberis</i> < 15%, <i>S. aureus</i> < 15%
<i>STAR (TGD Bayern, Merkblatt 2021)</i>	Tankmilchzellzahl < 200.000 Z/ml	Neuinfektionsrate in der Trockenstehperiode < 15%	Kein Nachweis von Kuh-assoziierten Erregern: v.a. <i>Sc. agalactiae</i> und <i>S. aureus</i>
<i>Selektives Trockenstellen in Milchviehbetrieben (tho Seeth et al. 2014)</i>	Betriebsindividuelle Zielsetzung abgeleitet aus Kennzahlen und innerbetriebliche Rahmenbedingungen	Orientierungshilfe für Kennzahlen: Ausheilungsrate > 50% Neuinfektionsrate < 28%	regelmäßige zytobakteriologische Untersuchungen: Kein Nachweis von <i>Sc. agalactiae</i> , <i>Sc. canis</i> , <i>S. aureus</i>

PM, Probemelkung; *S. aureus*, *Staphylokokkus aureus*; *Sc. canis*, *Streptokokkus canis*; *Sc. agalactiae*, *Streptokokkus agalactiae*, *Sc. uberis*, *Streptokokkus uberis*

Zusätzlich können verschiedene diagnostische Hilfsmittel (On-Farm Mastitisschnelltest) und Messindikatoren (somatische Zellzahl, SCC) kombiniert miteinander verwendet werden, um mehr Informationen über das Einzeltier und dessen Genesungsaussichten zu generieren (Müller et al. 2023). Denn weitere Risikofaktoren wie die Laktationsnummer oder die Anzahl an Mastitisvorbehandlungen sollten ebenfalls in die Entscheidung bezüglich des selektiven Trockenstellen einfließen (Kiesner et al. 2016). Das Ziel aller selektiven Konzepte ist der gezielte antibiotische Einsatz von Trockenstellern bei therapiewürdigen Kühen mit infizierten Vierteln und nicht die wahllose Behandlung gesunder Tiere (Müller et al. 2023).

Während der Trockenstehphase kann auch ein Zitzenversiegler sinnvoll sein. Der Einsatz von internen Zitzenversiegler verhindert das Eindringen von Keimen über den Strichkanal in Folge eines mangelnden Verschlusses durch den Kreatinpfropf und senkt somit das Risiko für Neuinfektionen während der Trockenstehperiode (Winter 2009). Ab einer erhöhten Neuinfektionsrate während der Trockenstehperiode von über 15% wird daher in den meisten Fällen ein interner Zitzenversiegler angeraten (tho Seeth et al. 2014). Studien, die sich mit der bakteriologischen Heilung von infizierten Vierteln über die Trockenstehperiode beschäftigt haben, zeigen, dass die Art des Pathogens einen weiteren Risikofaktor für die Ausheilung darstellt. So profitiert nicht, wie bisher angenommen, jedes infizierte Viertel vom antibiotischen TS. Lediglich Viertel, die mit *Streptokokkus* spp., *Trueperella pyogenes*, *Corynebacteriaceae*, *Bacillus* spp. und *Enterokokkus* spp. infiziert waren, zeigten eine signifikant bessere Heilung. Viele Erreger, wie KNS oder Coliforme, besitzen eine mit antibiotischen Trockenstellern vergleichbare Selbstheilungsrate und erfordern daher nicht zwingend einen antimikrobiellen Einsatz (Müller et al. 2023). Zudem sind manche Erreger, wie *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*) auf Grund ihrer Virulenzfaktoren, wie Biofilmbildung und antimikrobielle Resistenzen, meist nur schwer für übliche Antibiotika zugänglich (Zigo et al. 2022). Besonders solche Pathogene könnten in Zukunft von alternativen Behandlungsmöglichkeiten, die direkt auf die Biofilmbildung abzielen, profitieren (Asli et al. 2017).

Auch die Jahreszeit spielt beim Trockenstellen eine entscheidende Rolle. Kühe, die in den Sommermonaten kalben und folglich im Frühjahr (März bis Mai) trockengestellt werden, haben eine geringere Chance auf eine Ausheilung als Tiere im Herbst (September bis November) (Müller et al. 2023). Als mögliche Ursachen für saisonale Effekte gelten der Hitzestress (Vitali et al. 2020) und die stärkere Exposition gegenüber Umwelt-assoziierten Mastitispathogenen in den Sommermonaten (Zhang et al. 2016). Das Trockenstellmanagement ist daher überaus entscheidend im Hinblick auf die Eutergesundheit der Milchkuh in der Folgelaktation und sollte betriebsindividuell auf die neuesten Erkenntnisse abgestimmt werden, um die Tiergesundheit zu verbessern und gleichzeitig Einsparungen im Antibiotikaverbrauch zu ermöglichen.

3.8 Mastitismanagement

Die Hauptstrategie in der Behandlung klinischer Mastitiden liegt in den meisten Betrieben in der antibiotischen Behandlung (Hossain et al. 2017). Verschiedene Gründe, wie der finanzielle Verlust oder der übermäßige Einsatz von Antibiotika, führen zu anderen Behandlungsstrategien, wie der selektiven Behandlung bei Mastitiden (Cheng und Han 2020). Der selektive Einsatz von Antibiotika bei Mastitis in Abhängigkeit des verursachenden Mastitispathogens, beispielsweise Abstriche bei milden und moderaten *gram*-negativen Infektionen, können zu einem reduzierten Antibiotikaverbrauch führen (Jong et al. 2023a). Solche Erreger verfügen in der Regel über eine hohe spontane Selbstheilungsrate (Schmenger und Krömker 2020). Die Spontanheilung verläuft aber je nach Mastitiserreger unterschiedlich, so beläuft sich die spontane bakteriologische Heilung von *S. aureus* Infektionen gegen 0%, bei einer Infektion mit *Escherichia coli* (*E. coli*) hingegen liegt diese bei 90% (Ruegg 2021). Darüber hinaus können weitere Einsparungen bei Kultur negativen, als auch nicht bakteriell bedingten klinischen Mastitiden gemacht werden, da in diesen Fällen keine antibiotische Behandlung erforderlich ist (Ruegg 2018). Somit zeigt sich, dass bei Reduktionen in der Mastitistherapie zwingend eine Pathogenidentifikation notwendig ist (Jong et al. 2023a). Zusätzlich sollen kuhindividuelle Informationen in die Behandlungsentscheidung mit einfließen, denn sowohl die Anzahl an Mastitisfällen in der Vergangenheit als auch der Zellzahlverlauf scheinen einen Einfluss auf den Behandlungserfolg zu nehmen (Jong et al. 2023b; Ruegg 2018). Es hat sich beispielweise herausgestellt, dass eine Mastitis - unabhängig vom Erreger - geringere bakteriologische Heilungschancen hat, wenn mindestens ein weiterer Fall von klinischer Mastitis in derselben Laktation vorausging (Pinzón-Sánchez und Ruegg 2011). Daher ist eine gute Dokumentation eines jeden Mastitisfalls im Bestand anzuraten. Gleichbleibend hohe Zellzahlen über mehrere Aufzeichnungen hinweg deuten auf eine chronische subklinische Mastitis hin. In solchen Fällen ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine intramammäre antibiotische Behandlung zu einer bakteriologischen Heilung führt, eher gering (Jong et al. 2023b). *S. aureus* kann im Euter verbleiben und dort zu derartigen chronischen intramammären Infektionen führen, die nur zeitweise klinische Symptome verursachen (Sol et al. 2000).

Für leichte oder moderate Mastitiden mit konstant hohen Zellzahlen oder einer vorausgehenden Mastitishistorie konnte mit dem Einsatz von Entzündungshemmern (NSAID) im Vergleich zur antimikrobiellen Behandlung kein Unterschied in der Heilungsrate festgestellt werden (Krömker et al. 2021). Dennoch ist anzumerken, dass noch keine Einigkeit über die Anzahl an Fälle von klinischer Mastitis in der Vergangenheit und der Schwellenwert für die SCC, die berücksichtigt werden sollten, vorherrscht. Des Weiteren fehlen Angaben, ob die Informationen auf Kuh- oder Viertelebene und innerhalb von welchem Zeitrahmen die Informationen ausgewertet werden sollen (Jong et al. 2023b). Wenn jedoch die Wahrscheinlichkeit einer klinischen Heilung als gering eingeschätzt wird, sollte auf eine antimikrobielle Behandlung verzichtet werden (Ruegg 2018).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das selektive Behandeln von milden und moderaten klinischen Mastitiden drauf abzielt, *gram*-negative IMI von *gram*-positiven zu unterscheiden und daraufhin nur *gram*-positive Fälle für eine antibiotische Behandlung in Betracht zu ziehen. Alle schweren klinischen Mastitiden sollten sofort und im Idealfall systemisch behandelt werden, dabei kann die Notwendigkeit für eine antibiotische Therapie gegebenenfalls nach der Erregeridentifikation neu beurteilt werden. Die korrekte Beurteilung von behandlungswürdigen Mastitisfällen, die von einer antibiotischen Therapie profitieren, ist folglich das Ziel der selektiven Mastitistherapie (Jong et al. 2023b). Außerdem scheint im Hinblick auf eine Verbesserung der Eutergesundheit die beste Strategie in der Vermeidung von Mastitiden und intramammären Infektionen zu liegen. Hierfür gibt es zahlreiche Maßnahmen wie Sitzendippen, Säuberung der Lauf- und Liegeflächen oder die Wartung der Melkeinrichtungen, die als Prophylaxe angesehen werden (Winter 2009). Vor allem ökologisch wirtschaftende Betriebe scheinen ihr Management dahingehend umgestellt zu haben, um die Prävention von Krankheiten zu verbessern (Duval et al. 2020). Zu weiteren Methoden gehören auch der Weidezugang, eine bessere Liegeboxenpflege, das Verwenden von Stroh als Einstreumaterial und eine intensiveres Monitoring der Eutergesundheit während des Melkens (Vaarst et al. 2006). So können häufig Behandlungen mit langen Wartezeiten während der Laktation vermieden werden.

3.9 Tierbeobachtung

Einen wesentlichen Beitrag zur Erhaltung der Eutergesundheit kann die Tierbeobachtung leisten. Die Diagnosestellung bei Euterproblemen sollte frühzeitig, genau und schnell erfolgen, um entweder einer Mastitis vorzubeugen oder um frühzeitig Therapie- und Managemententscheidungen treffen zu können (Krömker et al. 2013; Sharun et al. 2021). Unterstützend können dabei konventionelle (wie z.B.: California Mastitis Test, SCC) oder auch fortgeschrittene diagnostische Tests (wie z.B.: Laktoferrin, Milch Amyloid A, Sequenzierung) zur Anwendung kommen (Chakraborty et al. 2019). Das schnelle und frühzeitige Erkennen von euterkranken Tieren im Bestand stellt sich als entscheidender Faktor für den Therapieerfolg heraus.

Zum einen wird dadurch die bakteriologische Heilung von IMI verbessert, denn mit zunehmender Infektionsdauer sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Heilung. Außerdem können von einem persistent infizierten Viertel ausgehend weitere benachbarte Drüsenkomplexe oder andere Kühe aus der Herde erkranken (Gindhart 2014; Keefe 2012).

Des Weiteren ist bei schweren klinischen Mastitiden die schnelle Behandlung wichtig, denn diese gehen häufig mit großflächigen irreparablen Gewebeschäden am Euter einher und können nicht selten zu Bakteriämie und zum Tod des Tieres führen (Fehlings et al. 2012; Brennecke et al. 2021). Eine zuverlässige und schnelle Identifikation von behandlungswürdigen Tieren, sowie therapiebedürftiger Mastitiserreger verspricht eine Einsparung von Antibiotika bei klinischen Mastitiden um rund 50% und bei antibiotischen Trockenstellern um rund 30%. Weitere Einsparungen können dann unter anderem durch den Einsatz von therapeutischen Alternativen erzielt werden (Krömker und Leimbach 2017). Bei manchen ökologisch wirtschaftende Betrieben deuten Studien darauf hin, dass diese verstärkt auf frühe Anzeichen von Krankheiten achten, was zu einem früheren Eingreifen und einer besseren Heilung führt (Valle et al. 2007; Vaarst und Bennedsgaard 2002). Dadurch können teilweise antibiotische Behandlungen mit langen Wartezeiten für Milch vermieden werden.

Auch ein Automatisches Melksystem (AMS) kann indirekt bei der Tierbeobachtung unterstützen. Obwohl der Einsatz eines AMS nicht direkt als Strategie zur Kontrolle der Eutergesundheit angesehen wird, kann sich ein AMS dennoch auf die Mastitisüberwachung und somit auf den SCC auswirken (Dufour et al. 2011). Im Gegensatz zum konventionellen Melksystemen muss die Inspektion, Beurteilung und ggf. die Entscheidung die veränderte Milch zu separieren, automatisch durch das AMS erfolgen (Mollenhorst et al. 2010). Diese Entscheidung erfolgt meist sensorbasiert, für jedes AMS-System individuell, auf Grund unterschiedlicher erhobener Parameter, wie zum Beispiel elektrische Leitfähigkeit, somatische Zellzahlbestimmung und Milchleistung. Die dabei vom System gesammelten Daten werden den Landwirten als Warnliste ausgegeben (van der Voort et al. 2021). Es gibt aber keine einheitliche und direkte Warnung speziell für klinische Mastitiden, daher sollte eine weitere Prüfung der auffälligen Tiere durch den Landwirt erfolgen (Bausewein et al. 2022). Der Goldstandard für das Erkennen von Milch mit abnormalem Charakter ist der Befund durch das Melkpersonal. Schätzungsweise finden Melktechniker 80% der klinischen Mastitisfälle von Kühen, die im Melkstand gemolken werden (Hillerton 2000). In einer Studie wurden daher die Sensitivität und Spezifität für das Erkennen von klinischen Mastitiden in unterschiedlichen AMS-Systemen erhoben und verglichen. Alle Systeme erzielten die notwendige Sensitivität von 70%, die vorgeschrieben ist. Eine mit der menschlichen Leistung vergleichbare Sensitivität von 80% erreichten nur drei der vier getesteten Systeme, nämlich Lely, GEA und Lemmer-Fullwood. Keiner der vier Systeme erlangten eine Spezifität von > 99%, die zu erwarten wäre. Niedrigere Spezifitäten können zu einem erhöhten Arbeitsaufwand für die Landwirte führen, um potenzielle falsch positive Mastitisfälle festzustellen (Bausewein et al. 2022). Um folglich eine gute Eutergesundheit auch bei der Nutzung von AMS-Systemen zu garantieren, sollte die eingesparte Zeit durch den Wegfall des Melkens in die Tierbeobachtung investiert werden (Krömker 2007).

Besonders beobachtungswürdig erscheinen auch Kühe in der Transitphase. So haben Tiere in diesem Zeitintervall, das sich drei Wochen vor bis drei Wochen nach der Abkalbung erstreckt, ein höheres Mastitisrisiko (Cheng und Han 2020). Ursache hierfür ist die durch erhöhten oxidativen Stress und durch geringere antioxidative Abwehr bedingte Immunsuppression in diesem Zeitraum (Sharma et al. 2011b). So kann neben der Laktationsnummer und der Mastitishistorie einer Kuh auch der Laktationszeitpunkt eine wirksame Bakterienabwehr schwächen (Ruegg 2021). Daher treten IMI häufiger um den Zeitpunkt der Abkalbung oder in der Früh-laktation auf (Visscher et al. 2016).

Sowohl Versen et al. (2021) als auch Volling (2011) identifizierten in ihren Arbeiten wichtige Kriterien, die Betriebe mit hoher Lebensleistung (> 35.000 kg im lebenden Bestand) bzw. mit niedrigen Herdensammelmilchzellgehalten (88.000 Z/ml) gemeinsam haben. Zunächst stellt sich heraus, dass bei überdurchschnittlich lebensleistenden Betrieben das Betreuungsverhältnis bei 38 Milchkühen pro Arbeitskraft liegt und die Betriebe mit guter Eutergesundheit im Durchschnitt 41 Milchkühe hielten. Außerdem erwies sich eine ständige Beobachtung des Melkvorgangs als vorteilhaft für die Eutergesundheit, da es mit einer ständigen Kontrolle des Milchentzugs einhergeht. Das Verlassen des Melkstands hingegen, um beispielsweise die Kälber zu versorgen, ist daher nicht ratsam. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auf Betrieben mit guter Eutergesundheit das Melken durch einen Hauptmelker erfolgt. Wird das Melken häufig von wechselnden Fremdarbeitskräften durchgeführt oder wechselt die Qualität der Melkarbeit, so scheint sich das negativ auf die Herdensammelmilchzellzahl (300.000 Z/ml) niederzuschlagen (Barnouin et al. 2004; Volling 2011).

3.10 Alternative Behandlungs- und Prophylaxemöglichkeiten bei Biofilm-assoziierten Mastitispathogenen

Neue Erkenntnisse über die Virulenzstrategien und Kommunikationstechniken von Mastitisserregern ermöglichen den Einsatz von alternativen Behandlungs- und Prophylaxemöglichkeiten in der Eutergesundheit. Bei einigen Erregern ist die Ausbildung eines sog. Biofilms nachgewiesen worden. Im Allgemeinen werden Biofilme als eine kohärente Ansammlung von Zellen definiert, die von einer selbstproduzierten biopolymeren Matrix umgeben sind (Stewart und Costerton 2001; Burmølle et al. 2010). Eine genauere Definition von Donlan und Costerton (2002) beschreibt den Biofilm als eine mikrobielle sessile Gemeinschaft, welche durch Zellen charakterisiert ist, die irreversibel an ein Substrat, eine Grenzfläche oder aneinander gebunden sind. Die Zellen sind dabei in eine Matrix von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet, die sie selbst produziert haben. Sie weisen einen veränderten Phänotyp in Bezug auf die Wachstumsrate und Gentranskription auf. Dadurch können „Nicht - Biofilm“ Populationen, wie Zellen mit planktonischem Verhalten besser abgegrenzt werden. Es wird angenommen, dass der Biofilm die standardmäßige Wachstumsform der Bakterien ist (Flemming et al. 2016). Wenn Mikroorganismen in dieser Lebensform wachsen, werden sie toleranter gegenüber Opsonophagozytose und herkömmlichen Antibiotika (Stewart und Costerton 2001) und sind 100 – 1000 mal weniger empfindlich gegenüber Antibiotika als ihre planktonischen Gegenspieler (Donlan 2000).

Diese bakterielle Toleranz und Persistenz ist mit ein Grund für die Entstehung einer Chronizität von Krankheiten (Bürki et al. 2015). Die Biofilmbildung kann in fünf Schritte unterteilt werden. Vor allem aber bei der Reifung (Schritt 4) spielt der Kommunikationsmechanismus von Zelle zu Zelle (Quorum Sensing) eine wichtige Rolle. Diese Kommunikation wird durch kleine diffusionsfähige oder transportierte Moleküle (Signalmoleküle) vermittelt, die als Autoinduktoren (AI) bekannt sind und von den Bakterien kontinuierlich produziert werden. Als Folge dieses interzellulären Kommunikationsmechanismus werden die Bakterien synchronisiert, um bestimmte phänotypische QS Profile zu exprimieren. So trägt QS zur Biofilmentwicklung und -ausbreitung bei (Guzmán-Soto et al. 2021).

Untersuchungen zeigen, dass diese Art der Kommunikation bei immer mehr Bakterienarten nachgewiesen wird. Zum Beispiel bei *S. aureus*, *E. coli*, *Enterokokkus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* sind QS Signalmolekülsysteme gut charakterisiert (Vollstedt und Streit 2021). Pedersen et al. (2021) fassen den aktuellen Stand der Wissenschaft in Bezug auf die Biofilmforschung bei Mastitis zusammen. Der Schwerpunkt der Forschung liegt nach wie vor auf der *in vitro* Biofilmbildung von Mastitiserregern bei Rindern, aber auch auf der Untersuchung von Antibiotikaresistenzen, molekularen Untersuchungen biofilmbezogener Gene und der Suche nach potenziellen Behandlungen und Impfstoffen. Die meisten dieser Arbeiten konzentrieren sich dabei auf den Erreger *S. aureus*. Zahlreiche *in vitro* Studien untersuchen die Fähigkeit zur Biofilmbildung von Mastitiserregern, die aus Milchproben isoliert wurden. In nur zwei *in vivo* Studien wurden bakterielle Biofilme direkt im Euter von Rindern mit Mastitis identifiziert (Schönborn und Krömker 2016; Hensen et al. 2000). Nachteil dieser Methode ist zum einen das Risiko einer Kontamination aus der Umwelt und zum anderen, dass nur Bakterien nachgewiesen werden können, die in der Milch vorhanden sind oder in diese freigesetzt werden (Pedersen et al. 2021). Bakterien, die aber im Eutergewebe eingebettet oder eingekapselt sind und Bakterien mit geringer Ausscheidung sind in Milchproben möglicherweise nicht nachweisbar (Krömker et al. 2008). Selbst wenn Bakterien aus Milchproben isoliert werden und in der Lage sind *in vitro* einen Biofilm zu bilden, liefert dies keine Informationen über den Phänotyp der Bakterien *in vivo* im infizierten Euter. Gründe sind unter anderem die Umgebung im Wirtsgewebe, den Wechselwirkungen mit dem Immunsystem und der Antibiotikabehandlung, die unter Laborbedingungen nicht vollständig nachgeahmt werden können. Außerdem bestehen große physikalische Unterschiede zwischen Biofilmen im Labor und im Organismus selbst (Pedersen et al. 2021). Die nachfolgende Tabelle 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Mastitiserreger und deren Fähigkeit einen Biofilm zu bilden.

Tabelle 4 Überblick über Mastitispathogene und deren Fähigkeit zur Biofilmbildung modifiziert nach Gomes et al. (2016)

Pathogen	Mastitistyp	Biofilmbildung	Quelle
<i>S. aureus</i>	Subklinische Mastitis	+	Campos et al. (2022); Darwish and Asfour (2013); Fabres - Klein et al. (2015)
KNS	Subklinische Mastitis	+	Darwish ans Asfour (2013);
<i>E. coli</i>	Klinische Mastitis	+	Costa et al. (2014); Milanov et al. (2015)
<i>E. faecalis</i>	Klinische Mastitis	+	Elhadidy und Zahran (2014)
<i>Sc. uberis</i>	Klinische Mastitis	+	Crowly et al. (2011); Kroemker et al. (2014)
<i>Sc. dysgalactiae</i>	Klinische Mastitis	+	Olson et al. (2002)
<i>Sc. agalactiae</i>	Mastitis	+	Rosini und Margarit (2015)

+, biofilmbildende Bakterien; KNS, Koagulase negative Staphylokokken; *E. coli*; *Escherichia coli*; *E. faecalis*; *Enterokokkus faecalis*; *Sc. uberis*; *Streptokokkus uberis*; *Sc. dysgalactiae*; *Streptokokkus dysgalactiae*; *Sc. agalactiae*, *Streptokokkus agalactiae*

Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl die Anzahl an Untersuchungen und die dadurch gewonnenen Erkenntnisse zur Biofilmbildung im Euter von Milchkühen als auch die Untersuchungen zur Zellkommunikation zunehmen. Dennoch ist noch nicht hinreichend nachgewiesen, dass alle pathogenen Mastitiserreger im Euter der Milchkuh im Rahmen des Mastitisgeschehens einen Biofilm *in vitro* ausbilden oder sich mittels AI verständigen.

Der enorme Wissenszuwachs in den Bereichen Biofilm und QS führt zu neuen Möglichkeiten von potenziellen Behandlungsalternativen und Impfstoffen gegen Mastitis beim Rind. So beinhalten manche Impfstoffe unter anderem Bestandteile wie den *Biofilm Adhesion Component* (BAC) von *Streptokokkus uberis* (*Sc. uberis*) (Collado et al. 2018) oder den *S. aureus* Stamm (SP 140), der sehr stark biofilmproduzierend ist (Piepers et al. 2011). Mögliche Einsparungen von Antibiotika können so mit Hilfe von Impfreimen gegen wichtige Mastitiserreger, wie z.B. *S. aureus*, *Streptokokkus uberis* (*Sc. uberis*) oder *E. coli* gemacht werden (McMullen et al. 2021). Andere Lösungen bietet die Abschwächung der QS Signalkaskade und die Blockade bakterieller Kommunikation mittels Quorum Quenching (QQ) oder Quorum Sensing Inhibition (QSI). Praxistaugliche Anwendung im Rinderbereich finden derzeit phytotherapeutische Produkte mit thiosulfurhaltigen Zusammensetzungen, insbesondere *Propyl-Propan-Thiosulfonat* (PTSO) und *Propyl-Propan-Thiosulfinat* (PTS), die auf diesem Wirkprinzip zur Behandlung von Infektionen und die Reduzierung und Abbau von Biofilmen eingesetzt werden (Streefland und DeRooij 2021). PTSO und PTS sind organische Schwefelverbindungen, die als Sekundärmetaboliten in vielen Pflanzenarten, wie der Gattung *Allium* spp. (z.B.: Lauch, Knoblauch, Zwiebel) vorkommen (Poojary et al. 2017; Cascajosa-Lira et al. 2021). Häufig fehlen aber randomisierte Kontrollstudien, die die Wirkung der Produkte nachweisen, die über den Placebo Effekt hinausgehen (Krömker und Leimbach 2017). Folglich handelt es sich bei Impfstoffen oder pflanzlichen Verbindungen um alternative Möglichkeiten zur Reduktion von Euterproblemen bei Rindern, die keine antimikrobiellen Wirkstoffe enthalten.

4 Erweitertes Material und Methoden

Ziel der retrospektiven Pilotstudie war es, mittels standardisiert erhobener Kennzahlen aus der Milchleistungsprüfung (MLP) des LKV Milchleistungsparameter und Parameter zur Eutergesundheit von ökologischen und konventionellen Milchkühen in Bayern zu sammeln und laktationsvergleichend zu bewerten. Diese Daten sollten mit Milchproben vor (21 Tage) und nach dem Trockenstellen (± 7 LT) und einem Euterscoring am 7. Laktationstag (LT) jeder Milchkuh, sowie den Behandlungs- und Managementdaten der Tiere erweitert werden.

In dieser Feldstudie wurden zwei Bachelorarbeiten durchgeführt und folgenden zwei Themen behandelt: „Retrospektiven Bewertung der Wirksamkeit von *Animal Health Vision* (AHV) Zusatzfuttermittel auf die Eutergesundheit vor und nach dem Trockenstellen bei Milchkühen.“ (Schmidt 2022) und „Erfassung des Gesundheitszustandes von Fleckviehkühen anhand eines Euter- und Pansenscorings und Veränderungen nach der Eingabe der *Animal Health Vision* Lösungen auf zwei bayerischen Milchviehbetrieben.“ (Müller 2022)

Alle erhobenen und ausgewerteten Daten sollen einen möglichen Aufschluss über die Einsatzmöglichkeiten der Produkte geben, um eine mögliche Handlungsempfehlung für Tierärzte und Landwirte ableiten zu können. Eine Schlussfolgerung auf die unmittelbare Wirksamkeit der Produkte ist nicht beabsichtigt.

4.1 Übersicht über die teilnehmenden Betriebe und deren Milchkühe

Auf Grund des Antibiotikaminimierungskonzeptes wollten zwei bayerische Milchviehbetriebe mit der Leittrasse Fleckvieh ihren peripartalen Antibiotikaeinsatz reduzieren. Die beiden teilnehmenden Betriebe haben ihr Trockenstell- und Mastitismanagement umgestellt und sich zum überwiegenden Einsatz von alternativen Methoden bei ihren Milchkühen entschieden. In der retrospektiven Auswertung wurden die Tiere berücksichtigt, die mindestens eine Laktation und im ausgewählten Zeitraum ihren Kalbetermin hatten. Darüber hinaus wurden nur die Tiere in die Auswertung inkludiert, welche ohne antibiotischen Trockensteller, aber mit internem Zitzenversiegler trockengestellt wurden. Die Eingaben und Untersuchungen fanden im Zeitraum 27.09.2021 bis 27.07.2022 statt. Im genannten Zeitraum hat der ökologische Betrieb 20 Tiere und der konventionellen Betrieb 18 Tiere mit den Produkten versorgt. Auf Grund dieser Herangehensweise liegt keine vergleichende Kontrollgruppe vor.

4.1.1 Der konventionelle Betrieb

Der konventionelle Betrieb befindet sich im Landkreis Freising, Bayern, Deutschland und ist ein Familienbetrieb mit wechselnden Fremdarbeitskräften. Die Kühe verfügen über einen Laufstall mit Tiefboxen, welche mit Stroh eingestreut werden. Die Tiere werden zweimal am Tag in einem Doppel - Sechser Fischgrätenmelkstand gemolken und im Anschluss mit einem jodhaltigem Dippmittel PVP-Jod (3.000 ppm) gedippt.

Das Melken wird überwiegend von wechselnden Fremdarbeitskräften durchgeführt und der Melkstand wird zeitweise verlassen, um zeitgleich die Kälber zu tränken. Die verwendete Zeit, die der Betriebe im Durchschnitt von 2,0 Arbeitskräften (Ak) für die Stallarbeit inklusive der Futteranmischung aufwendet wird, beläuft sich auf insgesamt zwölf Stunden pro Tag (6h/AK/d) mit einem Betreuungsverhältnis von 47 Milchkühen pro Arbeitskraft.

In Tabelle 5 ist ein Überblick über die Betriebskennzahlen des konventionellen Betriebes im Jahr 2021 gegeben.

Tabelle 5 Überblick über die Betriebskennzahlen des konventionellen Betriebes im Jahr 2021

Betriebskennzahlen 2021		
Kriterien	Herde	Ausgewertete Tiere
Anzahl an laktierenden Kühen	94	18
Durchschnittliche 305 Tageleistung pro Kuh im Jahr in kg	9.336	9.249
Durchschnittliche Zellzahl pro ml	255.000	221.000
Durchschnittliche Laktationszahl	4,3	3,4

Der konventionelle Betrieb weist eine überdurchschnittliche Milchleistung auf, während die Zellzahl eher über dem Durchschnitt liegt. Im Herdenvergleich wurden v.a. jüngere Tiere ausgewertet.

Die ausgewerteten Tiere machten einen Anteil von 19,1% aus der Gesamtherde aus. Diese Gruppe war gemessen an der durchschnittlichen Laktationszahl von 3,4 deutlich jünger als der Herdendurchschnitt, denn neun der 18 Tiere befanden sich in der 2. Laktation (siehe Abbildung 2). Ebenso wiesen die ausgewerteten Tiere 2021 im Vergleich zur Herde eine geringgradig bessere Eutergesundheit auf, beurteilt anhand der durchschnittlichen Zellzahl von 221.000 Z/ml.

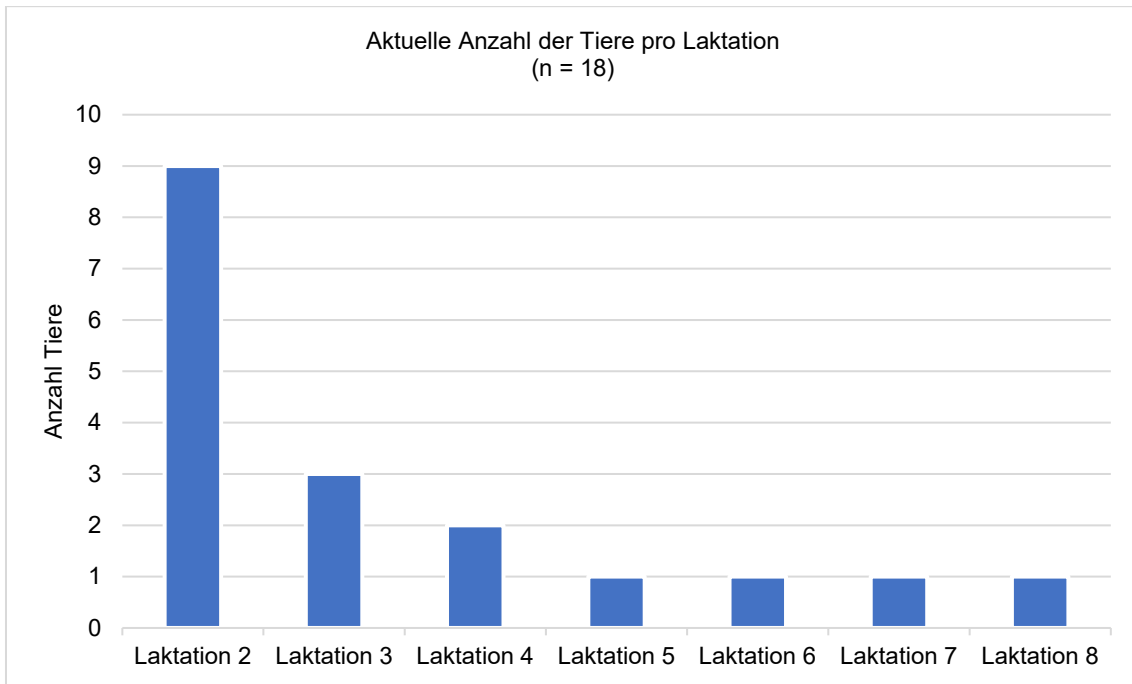


Abbildung 2 Verteilung der ausgewerteten Tiere des konventionellen Betriebes aufgeschlüsselt nach der aktuellen Laktationsnummer in der Laktation 2022

4.1.2 Der ökologische Betrieb

Der ökologisch wirtschaftende Betrieb befindet sich im Landkreis Freising, Bayern, Deutschland und ist ein Familienbetrieb. Die Kühe verfügen über einen Laufstall mit Hochboxen und Weidegang und werden von einem automatischen Melksystem gemolken und die Zitzen werden im Anschluss in ein chlorhexidinhaltiges Dippmittel getaucht. Die Umstellung auf eine ökologische Bewirtschaftung erfolgte 2017. Die verwendete Zeit, die von der Familie im Durchschnitt von 1,6 Arbeitskräften (Ak) für die Stallarbeit inklusive der Futteranmischung aufwendet wird, beläuft sich auf insgesamt neun Stunden pro Tag (5,6h/Ak/d). Das Betreuungsverhältnis liegt bei 46 Milchkühen pro Arbeitskraft.

In Tabelle 6 ist ein Überblick über die Betriebskennzahlen des ökologischen Betriebes im Jahr 2021 gegeben.

Tabelle 6 Überblick über die Betriebskennzahlen des ökologischen Betriebes im Jahr 2021

Betriebskennzahlen 2021		
Kriterien	Herde	Ausgewertete Tiere
Anzahl an laktierenden Kühen	74	20
Durchschnittliche 305 Tageleistung pro Kuh im Jahr in kg	7.581	8.292
Durchschnittliche Zellzahl pro ml	144.000	107.000
Durchschnittliche Laktationszahl	2,8	4,9

Der ökologische Betrieb hat für diese Betriebssparte und Kuhzahl eine überdurchschnittliche Milchleistung. Im Herdenvergleich werden v.a. ältere Tiere ausgewertet.

Der Anteil an ausgewerteten Tieren beträgt 27,0%. Diese 20 Tiere haben eine durchschnittliche Laktationsnummer von 4,9 Laktationen und sind damit deutlich älter als die restliche Herde (siehe Abbildung 3). Die 305 Tage Leistung war geringgradig höher, was mit der höheren Laktationszahl der ausgewerteten Tiere korreliert. Ebenso war die durchschnittliche Zellzahl dieser Tiere ebenfalls auf einem sehr guten Niveau.

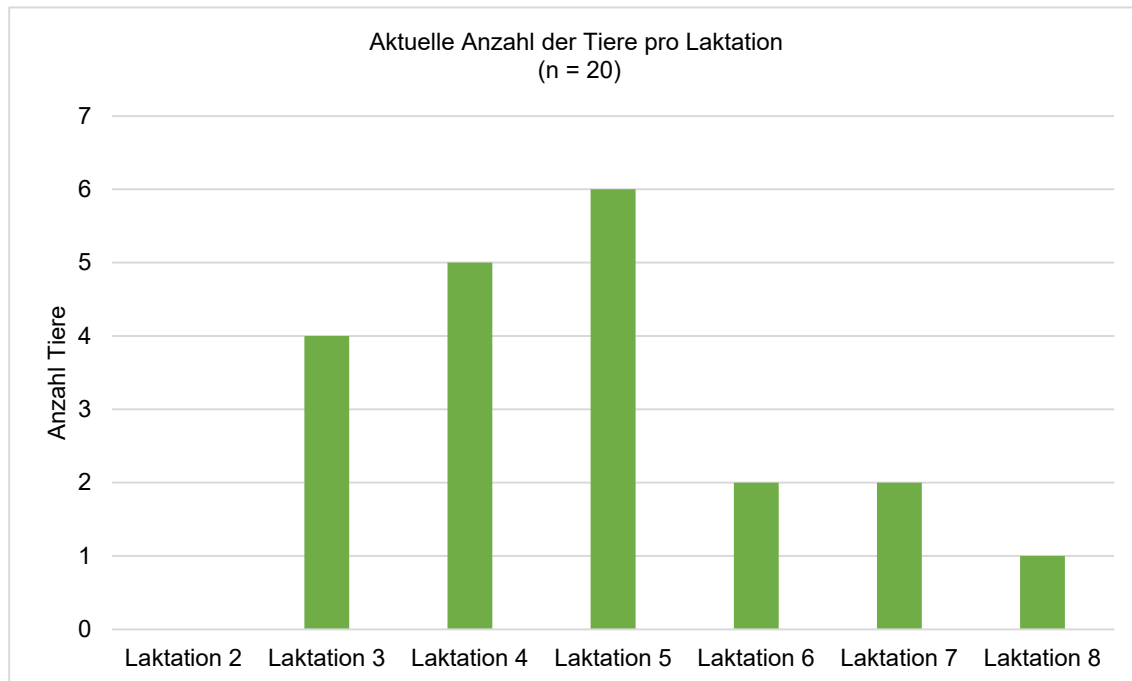


Abbildung 3 Verteilung der ausgewerteten Tiere des ökologischen Betriebes aufgeschlüsselt nach der aktuellen Laktationsnummer in der Laktation 2022

4.2 Praktische Umsetzung und Datengrundlage

Die ausgewerteten Tiere wurden mit verschiedenen Produkten der Firma *AHV* versorgt, dies ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Tiere wurden mit internem Zitzenversiegler (ITS) und ohne antibiotischen Trockensteller trockengestellt. Zyto - bakteriologische Milchproben wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten (21 Tage vor dem Trockenstellen (TS); ± 7 Tage p.p.) von jedem laktierendem Viertel entnommen. Am konventionellen Betrieb waren zwei Tiere dreistrichig, daher wurden dort insgesamt 70 Viertel von 18 Tieren zyto - bakteriologisch untersucht. Am ökologischen Betrieb wurden 80 Viertel von 20 Tieren beprobt. Vor der Entnahme der konventionellen Milchproben wurden die Zitzen gründlich gereinigt und mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Die ersten Milchstrahlen wurden verworfen. Danach wurden konventionelle Milchproben durch manuelles Melken in vorgefertigten Röhrchen von der Firma *bovicare* (*bovicare GmbH*, Bernau, Deutschland) gesammelt, gemäß den Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) (Fehlings 2009). Die Proben wurden in das Milchlabor „*bovicare*“ zur bakteriologischen Untersuchung nach den Richtlinien der DVG und zur SCC-Bestimmung gesendet (Fehlings 2009). Die Zählung der SCC erfolgte mittels eines fluorometrischen Verfahrens mit dem *Fossomatic 5000* (*Foss GmbH*, Hamburg, Deutschland).

Ein Euterscoring wurde bei allen ausgewerteten Tieren um ± 7 Tage p.p. durchgeführt (Abbildung 4).

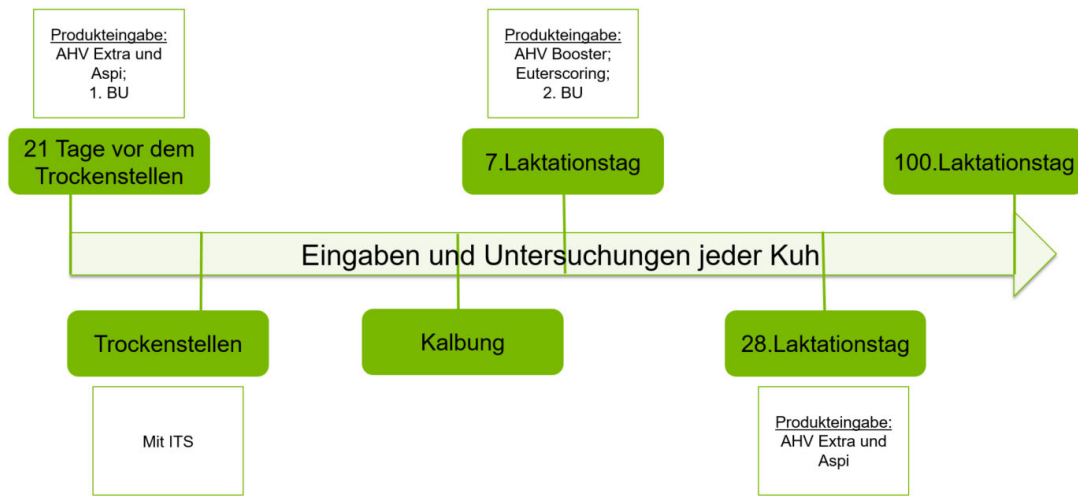


Abbildung 4 Eingaben und Untersuchungen jeder ausgewerteten Kuh im zeitlichen Verlauf
ITS, Interner Zitzenversiegler; BU, Zyto - bakteriologische Untersuchung; AHV, Animal Health Vision

Bei den ausgewerteten Tieren mit klinischer Mastitis wurde in der Laktation 2022 zunächst eine Erstversorgung mit AHV Produkten durchgeführt. Diese ist in Abbildung 5 dargestellt.

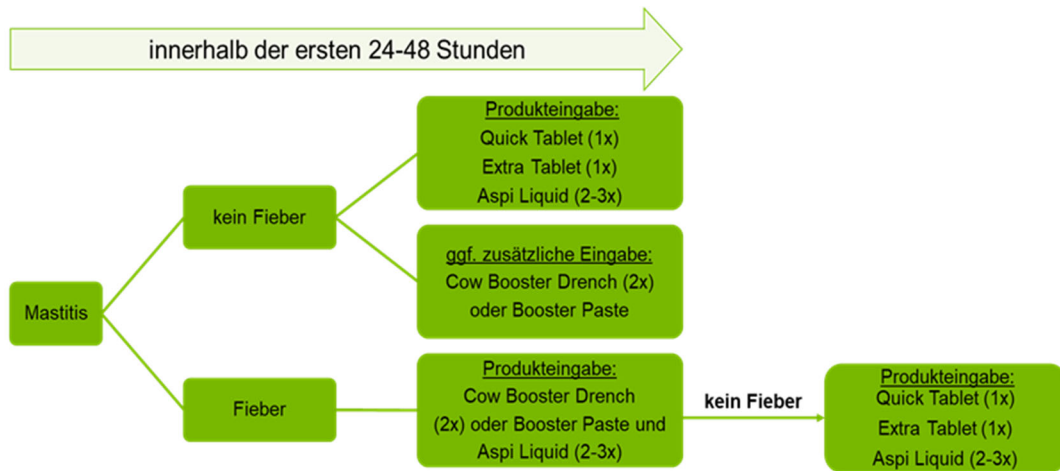


Abbildung 5 Animal Health Vision Erstversorgung bei den ausgewerteten Tieren mit akuter Mastitis in der Laktation 2022

Die Produkte des Biotechnologieunternehmens AHV sind Ergänzungsfuttermittel und bestehen aus pflanzlichen, bioaktivierten Molekülen, wodurch sich bei deren Gabe keine Wartezeit ergibt (Müller 2022). In der Tabelle 7 ist eine Übersicht über wichtige Inhaltsstoffe der verwendeten Produkte gegeben.

Tabelle 7 Übersicht über wichtige Inhaltsstoffe der verwendeten *Animal Health Vision* Produkte modifiziert nach Müller (2022)

AHV Extra und Quick	AHV Aspi	AHV Booster
Dicalciumphosphat	Dicalciumphosphat, Calciumcarbonat	Natriumbikarbonat
Weidenrinden	Weidenrinden	Calciumcarbonat, Dicalciumphosphat, Calciumstearat, Monocalciumphosphat
Calciumcarbonat	Magnesiumstearat, Magnesiumchlorid	Traubenzucker
Magnesiumstearat	Niacinamid (Vitamin B3)	Hefen (Bierhefe)
Niacinamid (Vitamin B3)	Ingwerwurzel	Inulin (Zichorien)
Traubenzucker	Hefen (Bierhefe)	Magnesium, Magnesiumstearat,
Inulin (Zichorien)	Natriumcitrat, Natriumchlorid	Maltodextrin
PTS / PTSO	Kaliumchlorid	-

AHV, Animal Health Vision; PTS, Propyl-Propan-Thiosulfinat; PTSO, Propyl-Propan-Thiosulfonat

Die Datengrundlage stellten die Daten aus der MLP dar, die monatlich vom LKV Bayern erhoben wurden. Die erhobenen Daten konnten retrospektiv für die Auswertung verwendet werden. Für beide Betriebe lagen die Daten zur MLP der Jahre 2021 und 2022 vor, sowie die einmal jährlich erfassten Stichtagsdaten der Jahre 2021 und 2022.

Die Datenerhebung erfolgte auf Einzeltierebene, diese sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Am ökologischen Betrieb wurden 20 Milchkühe und am konventionellen Betrieb wurden Daten von 18 Milchkühen zur MLP retrospektiv und laktationsvergleichend ausgewertet.

So wurde von jeder Kuh die letzte PM vor dem Trockenstellen vor der Laktation 2021 und 2022 als auch die ersten drei Probemelkungen in der Laktation 2021 und 2022 analysiert. Bei neun Tieren des konventionellen Betriebes gab es keine letzte PM vor dem TS 2021, da diese Tiere zu dem genannten Zeitpunkt hochtragende Kalbinnen waren. Dementsprechend hatten diese neun Tiere in ihrem Leben erst eine Trockenstehperiode, die sich zwischen ihrer 1. und 2. Laktation erstreckte. Daher konnten sie bei der Auswertung des Infektionsgeschehens über die Trockenstehperiode nicht berücksichtigt werden.

Zusätzlich wurden auf beiden Betrieben Daten auf Einzeltierebene generiert. Diese umfasst ein Euterscoring um den 7. Laktationstag jeder Milchkuh. Die Erkrankungen, sowie das Trockenstellmanagement in der Laktation 2021 und Laktation 2022 für die ausgewerteten Tiere wurde von den Betrieben dokumentiert und abgefragt. Um erste Einblicke zu bekommen wurde nur am konventionellen Betrieb bei einer geringen Stichprobe eine 16S rRNA Sequenzierung durchgeführt. Für die vorliegende Auswertung wurden die Daten codiert und anonymisiert. Ein Überblick über die erhobenen Daten ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8 Überblick über die erfassten Daten der Tiere und Betriebe

Individuelle Kuhdaten	
Laktationsnummer	Dokumentation
Laktationstag	aus jeder Probemelkung
Milchmenge in kg	aus jeder Probemelkung
Fett in %	aus jeder Probemelkung
Eiweiß in %	aus jeder Probemelkung
Zellzahl in 1000 / ml	aus jeder Probemelkung
Trockenstellmanagement	Dokumentation
100 Tage Leistung in aktueller und vorangegangener Laktation	Berechnung aus jeder Probemelkung
Erfasste Erkrankungen in aktueller und vorangegangener Laktation	
Mastitis	Dokumentation
Untersuchungen	
Zyto - Bakteriologische Milchuntersuchungen	Zeitpunkt 1) 21d vor TS Zeitpunkt 2) ± 7d p.p.
Euterscoring	Zeitpunkt: ± 7. p.p.
Individuelle Zusatzparameter	
16S rRNA Sequenzierung	Betrieb Konventionell

TS, Trockenstellen; p.p., post partum

4.3 Datenbearbeitung und Berechnung ausgewählter Parameter

Die monatlichen Daten der MLP der Laktationen 2021 und 2022 sowie der Jahres-Stichtagsdaten des Jahres 2021 des LKV lagen in Excel vor. Die dokumentierten Daten aus dem Euterscoring, die Ergebnisse aus den Viertelgemelksproben, sowie die Angaben zum Management und den Behandlungen wurden ebenfalls in Excel konvertiert. Die Zusammenfassung und Bereinigung der Daten erfolgte mit dem Programm Excel Microsoft Office Professional Plus 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington).

4.3.1 Parameter zur Evaluation der Eutergesundheit um die Trockenstehphase und während der Laktation

Insgesamt wurden auf beiden Betrieben insgesamt $n = 286$ Probemelkungen von allen beobachteten Tieren ausgewertet. Für die Darstellung der Zellzahlverläufe während der Laktation wurden zusätzlich einmalig noch die 4. und 5. PM ($n = 152$) aller beobachteten Tiere in der Laktation 2021 und 2022 ausgewertet und dargestellt.

4.3.1.1 Definitionen und Kennzahlen in der Eutergesundheit

Zur Beurteilung des Infektionsgeschehens innerhalb der Trockenstehphase lassen sich die Tiere anhand der letzten PM vor dem Trockenstellen und der ersten PM in der darauffolgenden Laktation in folgende Kategorien einteilen (siehe Abbildung 6).

- Die *neuinfizierten Tiere* in der Trockenstehphase beschreibt Tiere mit einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml Milch in der ersten PM nach der Kalbung und einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch zum Trockenstellen.
- Die *ausgeheilten Tiere* in der Trockenstehphase beschreibt Tiere mit einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch in der ersten PM nach der Kalbung und einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml Milch zum Trockenstellen.
- Die *eutergesund gebliebenen Tiere* in der Trockenstehphase beschreibt Tiere mit einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch in der ersten PM nach der Kalbung und einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch zum Trockenstellen.
- Die Kennzahl *chronisch kranken Tiere* in der Trockenstehphase beschreibt Tiere mit einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml Milch in der ersten PM nach der Kalbung und einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml Milch zum Trockenstellen.

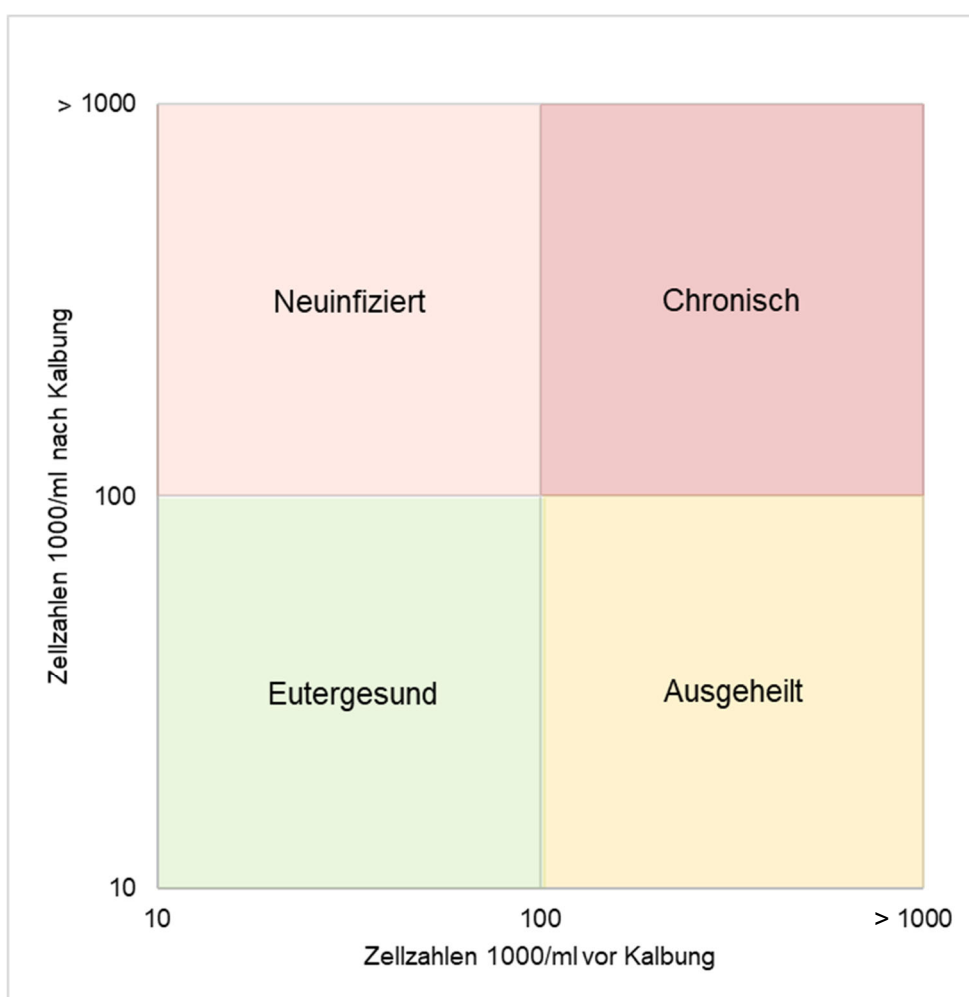


Abbildung 6 Überblick über die Kategorien zur Beurteilung des Infektionsgeschehens über die Trockenstehphase modifiziert nach Zeiler und Bechter (2019)

Entsprechend der Richtlinie 2.0: „Definition und Berechnung von Kennzahlen und zugehörigen Vergleichswerten zur Durchführung der betrieblichen Eigenkontrolle und des nationalen Tierwohlmonitorings“, herausgegeben durch den DLQ (2020), wurden folgende Kennzahlen mithilfe der Ergebnisse aus den Milchleistungsprüfungen des jeweiligen Prüfzeitraumes berechnet.

- Neuinfektionsrate in der Trockenstehphase (absolut, %)
Die Kennzahl *Neuinfektionsrate* in der Trockenstehphase beschreibt den Anteil der Tiere mit einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml Milch in der ersten PM nach der Kalbung an allen Tieren, die mit einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch trocken gestellt wurden.
- Heilungsrate in der Trockenstehperiode (absolut, %)
Die Kennzahl *Heilungsrate* in der Trockenstehphase beschreibt den Anteil der Tiere mit einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch in der ersten PM nach der Kalbung an allen Tieren, die mit einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml Milch trocken gestellt wurden.
- Neuinfektionsrate in der Laktation (absolut, %)*
Die Kennzahl *Neuinfektionsrate* in der Laktation beschreibt den Anteil der Tiere mit einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml Milch in der aktuellen PM an allen Tieren mit einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch in der vorherigen PM.
- Anteil eutergesunder Tiere in der Laktation (absolut, %)*
Die Kennzahl *Anteil der eutergesunden Tiere* beschreibt den Anteil der Tiere mit einem Zellgehalt ≤ 100.000 Z/ml Milch an allen laktierenden Tieren in der aktuellen PM.
- Anteil Tiere mit dtl. erhöhtem Zellgehalt in der Laktation (absolut, %)*
Die Kennzahl *Anteil der Tiere mit einem deutlich erhöhten Milchzellgehalt* bezeichnet die Tiere mit einem Zellgehalt > 400.000 Z/ml Milch an allen laktierenden Tieren in der aktuellen PM.
- Anteil chronisch kranker Tiere in der Laktation (absolut, %)
Die Kennzahl *Anteil chronisch euterkranker Tiere* mit schlechten Heilungsaussichten beschreibt den Anteil der Tiere, die jeweils einen Zellgehalt > 700.000 Z/ml Milch in den vergangenen drei aufeinanderfolgenden Probemelkungen aufweisen, an allen aktuell laktierenden Tieren.

Darüber hinaus wurde eine weitere Kennzahl eingeführt und berechnet:

- Anteil Tiere mit erhöhtem Zellgehalt in der Laktation (absolut, %)*
Die Kennzahl *Anteil der Tiere mit einem erhöhten Milchzellgehalt* bezeichnet die Tiere mit einem Zellgehalt > 100.000 Z/ml und ≤ 400.000 Z/ml Milch an allen laktierenden Tieren in der aktuellen PM.

* Da bei den ausgewerteten Tieren mehrere Probemelkungen während der Laktation im Beobachtungszeitraum vorhanden sind, wurde sowohl die Entwicklung der Kennzahlen für die 1. PM zur 2. PM als auch die Entwicklung von der 2. PM zur 3. PM ermittelt und daraus der Durchschnitt gebildet.

4.3.1.2 Inzidenz und Behandlung von Mastitiden in den ersten 100 Laktationstagen

Es wird zwischen Inzidenz, also das Auftreten von Neuinfektionen während der Laktation als auch der Prävalenz, die die Anzahl an Krankheitsfällen darstellt, unterschieden (Weiß 2019).

Die *Inzidenz* beschreibt im allgemeinen Änderungen über einen längeren Zeitraum und kann folglich als Neuerkrankungsrate bezeichnet werden. Bei der kumulativen Inzidenz handelt es sich um die Wahrscheinlichkeit für ein beliebiges Tier während des Beobachtungszeitraums zu erkranken. Die kumulative Inzidenz (*InK*) bezieht sich nur auf Erkrankungen, die während dem Beobachtungszeitraum maximal einmal pro Tier auftreten. Die Krankheitsdauer bleibt unberücksichtigt. Seien N_0 die Größe der Population und I die Anzahl der Neuerkrankungen (Inzidenzfälle), dann gilt die Berechnung nach Formel 1 (Weiß 2019).

Formel 1 Die Berechnung von Inzidenzen

$$InK = \frac{I}{N_0} \quad (\text{Weiß 2019})$$

Anzahl an alternativen Mastitiserstversorgungen und Behandlungen mit Antibiotika (absolut)

Die Behandlungen wurden von den Landwirten dokumentiert und ausgewertet. Eine weiterführende Kategorisierung hinsichtlich der Art und des Schweregrades der Mastitis wurde nicht durchgeführt.

4.3.1.3 Zyto - bakteriologische Untersuchungen (BU) zu zwei Zeitpunkten (21 Tage vor dem Trockenstellen, ± 7 . Laktationstag)

Auf Basis der Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung wurden die Ergebnisse „ohne besonderen Befund“ (o.b.B.) und „aseptisch“ als „negativ“ zusammengefasst. Im Anschluss wurden die Befunde auf Viertelebene anhand ihrer bakteriologischen und zytologischen Befunde evaluiert und in eine der vier Kategorien eingeteilt. So konnten die Viertel eine normale Sekretion, eine latente Infektion, eine unspezifische oder eine Mastitis aufweisen. Detailliertere Informationen bezüglich der Probenentnahme und Evaluation sind aus dem Material und Methodenteil der Publikation zu entnehmen.

Darüber hinaus wurde bei bakteriologisch positiven Vierteln, d.h. Viertel mit latenter Infektion oder Mastitis, ermittelt, ob es sich um eine *persistente Infektion* (PI) oder eine *Neuinfektion* (NI) handelt. Eine NI lag vor, wenn in der 2. bakteriologischen Untersuchung (BU) (± 7 . LT) ein Erreger kultiviert wurde, der in der 1. BU (21d vor TS) noch nicht vorhanden war. Das Viertel kann dabei auch erregerfrei (negativ) gewesen sein. Umgekehrt wurde eine persistierende Infektion festgestellt, wenn dieselbe Erregerart sowohl in der 1. BU als auch in 2. BU nachgewiesen wurde.

Zusätzlich wurde die *bakteriologische* und *zytologische Heilungsrate* der Euterviertel über die Trockenstehperiode untersucht. Eine bakteriologische Heilung lag vor, wenn der Erreger aus der 1.BU in der 2. BU nicht mehr nachweisbar war. Bei der zytologischen Heilung nahm die Zellzahl von über 100.000 Z/ml in der 1.BU auf unter 100.000 Z/ml in der 2.BU ab.

4.3.2 Parameter Milchleistung

Zudem wurden aus den monatlichen Milchleistungsprüfungen die *100 Tage Leistung* (kg) mittels der ICAR Methode (<https://www.icar.org/>) berechnet:

Die Berechnung der 100 Tage Leistung erfolgt in Bayern nur für die Erstlaktierenden (persönliche Mitteilung Dr. Kammer, 26.01.2022). Die Berechnung der 100 Tage Leistung erfolgt mittels der definierten Test Intervallmethode nach Sargent (1968), diese ist in Formel 2 dargestellt.

Formel 2 Berechnung der kumulativen Milchleistung

$$MY = I_0 M_1 + I_1 \times \frac{(M_1 + M_2)}{2} + I_2 \times \frac{(M_2 + M_3)}{2} + I_{n-1} \times \frac{(M_{n-1} + M_n)}{2} + I_n M_n$$

MY = milk yield, Milchleistung

M₁, M₂, M_n = sind das auf eine Dezimalstelle gerundete Gewicht der gemolkene Milch in den 24 Stunden des Erfassungstages.

I₁, I₂, I_{n-1} = sind die Intervalle in Tagen zwischen den Aufzeichnungsdaten.

I₀ = Intervall in Tagen zwischen dem Datum des Laktationsbeginns und dem Datum der ersten Aufzeichnung.

I_n = Intervall in Tagen zwischen dem letzten Aufzeichnungsdatum und dem Ende der Laktationsperiode.

Um eine detailliertere Vergleichbarkeit der Tiere in beiden Laktationen zu bekommen, wurde für alle Tiere in der Laktation 2021 und 2022 die 100 Tage Leistungen berechnet. Die 100 Tage Leistung ist in diesem Fall der 305 Tage Leistung vorzuziehen, da mit dem 100. LT der Beobachtungszeitraum der Tiere endete und dadurch möglicherweise bessere Aussagen im Hinblick auf die Wirkung der Produkte gemacht werden können.

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM ® SPSS Statistics (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Abhängig von den Eigenschaften der Variablen (metrisch, ordinal oder nominal) wurden spezifische statistische Testverfahren ausgewählt, um Lage und Verteilung der Daten zwischen diesen Variablen zu untersuchen. Bei zwei Datensätzen, den Zellzahlverläufen und der Erregerverteilung, wurde eine rein deskriptive Auswertung durchgeführt und u.a. in Form von Boxplots dargestellt.

Um Unterschiede in der prozentualen Veränderung der 100 Tage Leistung zwischen den Laktationsnummern nachzuweisen wurde der Kruskal-Wallis-Test für mehrere unabhängige Stichproben für nicht normalverteilte Daten mit anschließenden Mann-Whitney-U-Tests bei unabhängigen Stichproben zum paarweisen Vergleich unter Nutzung der Bonferroni-Korrektur verwendet. Bei den Unterschieden in der prozentualen Veränderung der 100 Tage Leistung zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Um auf Unterschiede in kategorischen Variablen zwischen den Laktationen 2021 und 2022 zu untersuchen, wurde der Exakte Fisher Test für zwei oder mehr unabhängige Stichproben errechnet. So fand der Exakte Fisher Test Anwendung bei der Neuinfektionsrate und der Heilungsrate sowohl in der Trockenstehperiode als auch in der Laktation, der Zellzahlverteilung in den ersten drei Probemelkungen, der Klassifizierung der Eutergesundheit und der Inzidenz von Mastitiden.

Des Weiteren wurden Unabhängigkeiten zwischen den beiden Haltungsformen konventionell und ökologisch in den Bereichen bakteriologische und zytologische Heilung, dem Hygienescore und der palpatorischen Untersuchung mittels Exaktem Fisher Test geprüft.

Darüber hinaus wurden Unabhängigkeiten im Infektionsgeschehen in der Trockenstehperiode 2022 zwischen Tieren mit unterschiedlichen Anzahlen an Mastitisbehandlungen in den Vorlaktationen ebenfalls mittels Exaktem Fisher Test geprüft.

Im Themengebiet des Tiergesundheitsmonitoring wurden die Unabhängigkeit in der Zellzahl bei Tieren mit und ohne Euterödem und bei Tieren mit und ohne tiefhängendem Euter und dem Hygienescore mittels Exaktem Fisher Test getestet.

Alle p-Werten unter 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

5 Erweiterte Ergebnisse

5.1 Milchleistung

Vergleich man die 100 Tageleistung von 2021 mit 2022, konnten alle ausgewerteten Tiere ($n = 18$) im Durchschnitt um + 15,0% zulegen (Tabelle A1). Die prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung unterschied sich statistisch signifikant zwischen den Laktationsnummern der Kühe (Kruskal - Wallis - $H = 12,673$; $p < 0,001$). Der anschließend durchgeführte Mann - Whitney - U Test mit der Korrektur nach Bonferroni zeigte, dass sich sowohl die 4. Laktationsnummer ($z = 2,684$; $p \approx 0,04$) und 5. Laktationsnummer ($z = 2,907$; $p \approx 0,02$) von der 2. Laktationsnummer signifikant unterschieden. Man kann annehmen, dass die prozentualen Veränderungen in der 100 Tage Leistung vor allem der starken Zunahme der Milchleistung in der 2. Laktation geschuldet sind (im Median + 32,5%). Bei Tieren mit mehr als 4 Laktationen (im Median: 4. Laktation, - 11,1%; ≥ 5 . Laktation, - 2,6%) reduzierte sich die 100 Tage Leistung (siehe Abbildung 7).

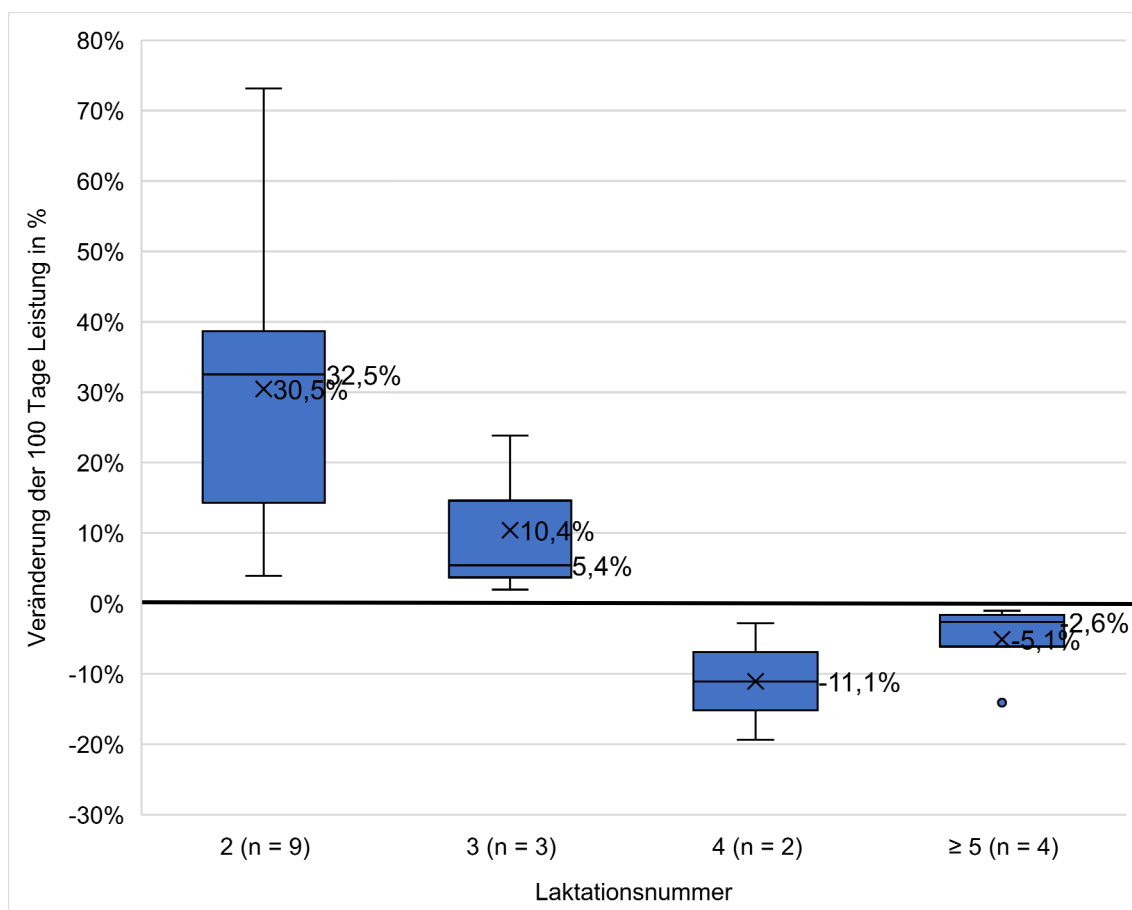


Abbildung 7 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des konventionellen Betriebes nach Laktationen sortiert.

Betrachtete man die prozentualen Veränderungen der 100 Tage Leistung nicht anhand der Laktationsnummern, sondern ob die Tiere in der Laktation 2022 behandelt wurden, ergaben sich folgende Ergebnisse (Abbildung 8).

Tiere mit einer Behandlung in den ersten 100 Laktationstagen hatten geringere prozentuale Veränderungen (Median 7,4%, $n = 10$), als Tiere ohne eine Behandlung (Median 18,2%, $n = 8$). Dennoch wiesen behandelte Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren in der Laktation 2022 keine statistisch signifikanten Unterschiede in der prozentualen Veränderung in der 100 Tage Leistung auf (Konv: exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = 30,500$, $p \approx 0,41$). Die auftretenden Krankheiten, die am konventionellen Betrieb in der Laktation 2022 zur Behandlung geführt hatten, waren überwiegend Mastitiden gefolgt von Gebärmutterentzündungen und Ketosen.

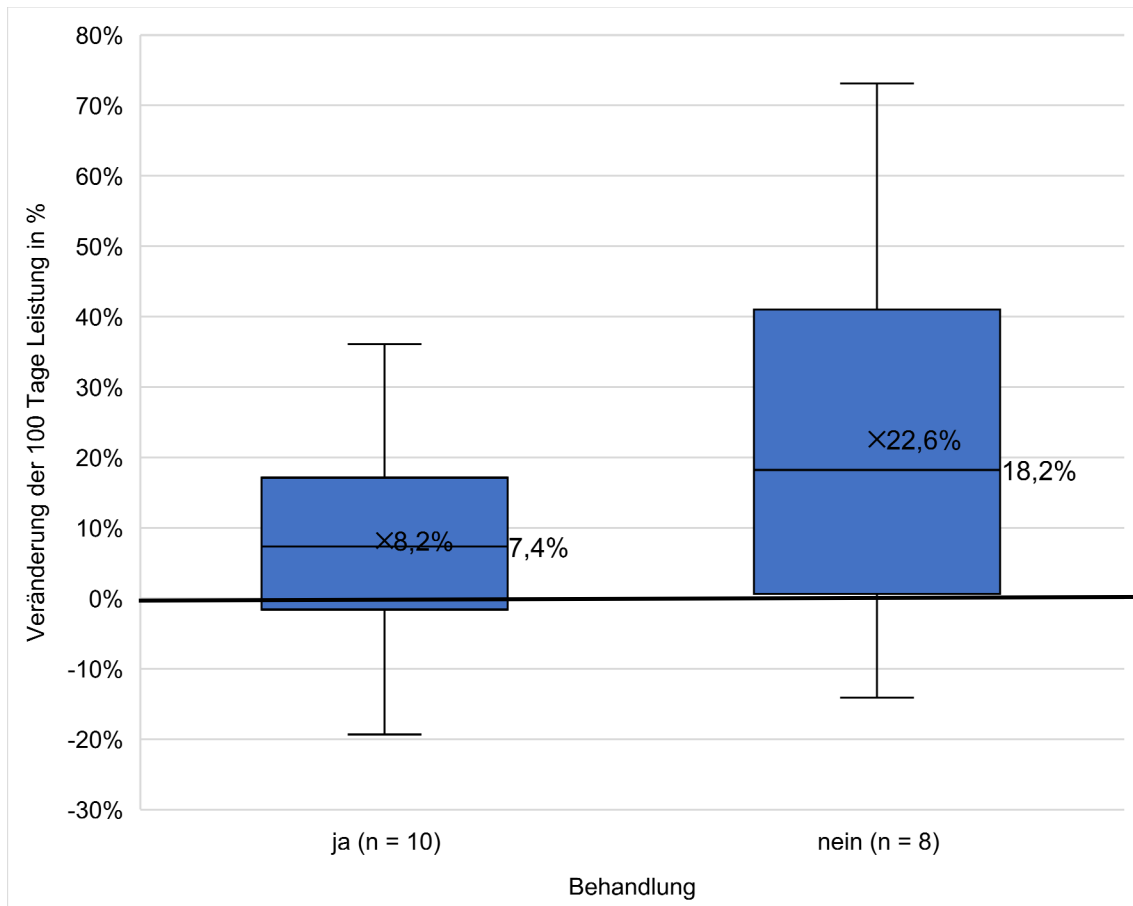


Abbildung 8 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des konventionellen Betriebs nach Behandlungen sortiert

Im Gegensatz zum konventionellen Betrieb konnte am ökologischen Betrieb keine durchschnittliche Steigerung der 100 Tage Leistung beobachtet werden (- 8,0%; Tabelle A2). Die ausgewerteten Kühe am ökologischen Betrieb waren deutlich älter (durchschnittlich 4,9 Laktationen, Abbildung 3) als jene am konventionellen Betrieb (3,4 Laktationen; Abbildung 2), sodass eine Veränderung der 100 Tage Leistung nicht zu erwarten war. Die Laktationsnummer der Tiere schien also keinen Einfluss zu haben ($p \approx 0,93$) (Abbildung 9).

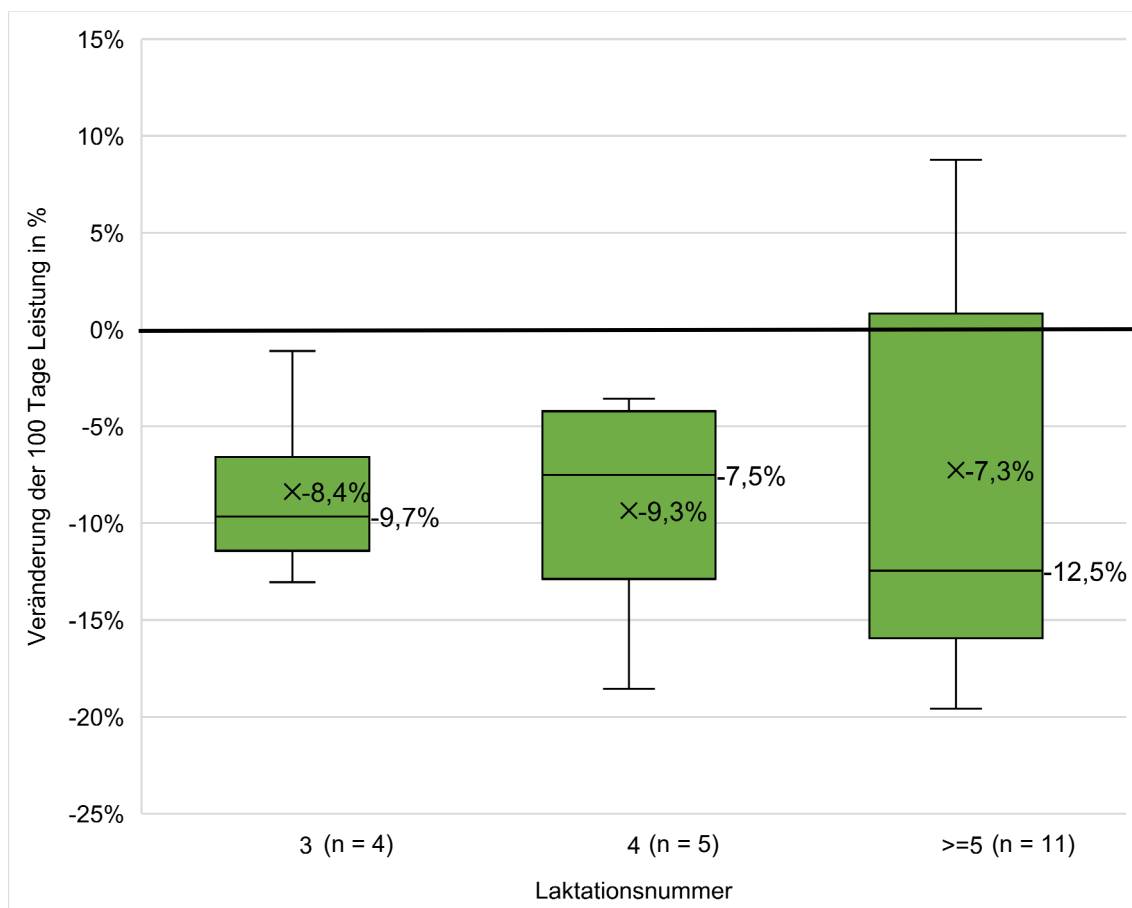


Abbildung 9 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des ökologischen Betriebes nach Laktationen sortiert

In Abbildung 10 sind die prozentualen Veränderungen der 100 Tage Leistung nicht anhand der Laktationsnummern dargestellt, sondern ob die Tiere in der Laktation 2022 behandelt wurden. Behandelte Tiere in der Laktation 2022 wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der prozentualen Veränderung in der 100 Tage Leistung auf im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Öko: exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = 45,000$; $p \approx 0,71$). Die auftretenden Krankheiten, die am ökologischen Betrieb zur Behandlung geführt hatten, waren überwiegend Mastitiden, gefolgt von Hypokalzämie und Nachgeburtshaltungen.

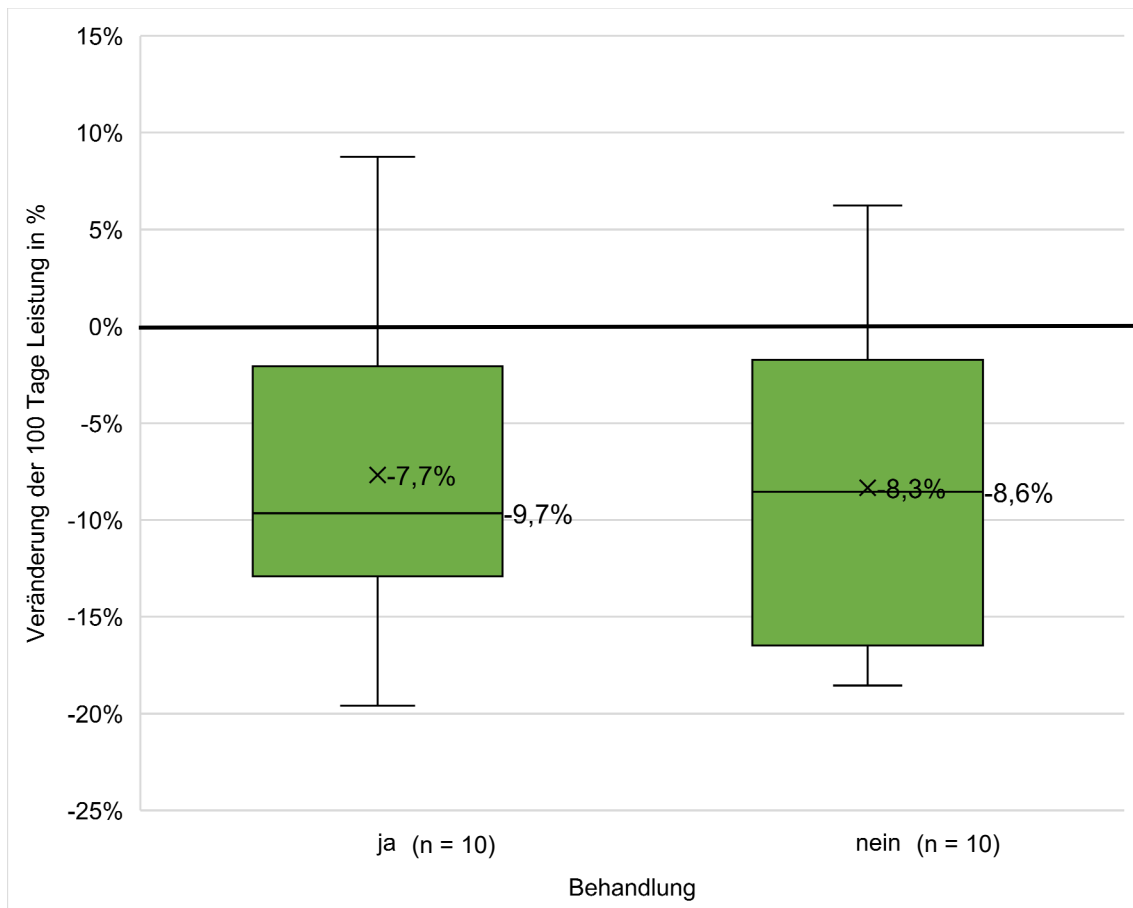


Abbildung 10 Prozentuale Veränderung der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation des ökologischen Betriebs nach Behandlungen sortiert

5.2 Eutergesundheit

Die Ergebnisse im Bereich der Eutergesundheit wurden zwischen den Zeitpunkten in der Trockenstehperiode und in der Laktation gesondert betrachtet.

5.2.1 Entwicklung und Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehperiode

Anhand der vorliegenden Betriebsdaten zum Zeitpunkt des Trockenstellens wurde analysiert, welche Kriterien auf Herdenebene bei den jeweilig aufgeführten Konzepten zum selektiven Trockenstellen von beiden Betrieben erfüllt wurden (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Auswertung der betrieblich getrennten Beurteilungskriterien für die verschiedenen Konzepte zum selektiven Trockenstellen

Trockenstellprogramm	Betrieb Konventionell	Betrieb Ökologisch
RAST (TGD, LMU, LfL, 2020)		
STAR (TGD Bayern, Merkblatt 2021)		
Selektives Trockenstellen in Milchviehbetrieben (tho Seeth et al. 2014)		

Der ökologische Betrieb war auf Grund seiner guten Eutergesundheit auf Herdenebene für die meisten Konzepte zum selektiven Trockenstellen grundsätzlich geeignet. Dennoch stellte der Nachweis des Kuh-assoziierten Erregers *S. aureus* für die Vorgehensweise beim selektiven Trockenstellen nach STAR und tho Seeth et al. (2014) einen potenziellen Hinderungsgrund dar. Der konventionelle Betrieb hingegen war auf Herdenebene laut den drei vorgestellten Konzepten zum selektiven Trockenstellen grundsätzlich nicht geeignet. Die Gründe hierfür waren die zu hohe Neuinfektionsrate in Kombination mit einer zu geringen Ausheilungsrate. Außerdem lag die Herdensammelmilchzellzahl in 4 von 5 PM vor dem Trockenstellen über dem Grenzwert von 200.000 Z/ml. Wie sich bei der Beurteilung der Betriebskennzahlen 2021 (Tabelle 5) bereits andeutete, zeigte sich hier nochmal deutlicher, dass der konventionelle Betrieb über eine beobachtungswürdige Eutergesundheit verfügte. Dennoch wurde auf einen antibiotischen Trockensteller bei den ausgewerteten Tieren verzichtet.

Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit während der Trockenstehphase

Im Folgenden wurden die wichtigsten Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehperiode für beide Betriebe getrennt in Tabelle 10 und Tabelle 11 zusammengefasst.

Während der Trockenstehphase zeigte sich auf beiden Betrieben eine Zunahme der Neuinfektionsrate (konventionell: $p \approx 0,49$; ökologisch: $p = 1$) und eine Abnahme der Heilungsrate (konventionell: $p \approx 0,45$; ökologisch: $p \approx 0,20$). Vor allem im konventionelle Betrieb war eine sehr starke Zunahme der Neuinfektionsrate während der Trockenstehphase zu verzeichnen.

Tabelle 10 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehperiode 2021 und 2022 für den konventionellen Betrieb

Kennzahlen in der Trockenstehperiode	Infektionsgeschehen TS 2021 ($n = 9$)	Infektionsgeschehen TS 2022 ($n = 9$)	Differenz Konventionell 2022 / 2021
Neuinfektionsrate	33,0% (1/3)	75,0% (3/4)	+ 42,0%
Heilungsrate	33,0% (2/6)	0,0% (0/5)	- 33,0%

(FETT) = die fett gedruckten Zahlen geben die absoluten Zahlen wieder; TS, Trockenstehperiode

Tabelle 11 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Trockenstehperiode 2021 und 2022 für den ökologischen Betrieb

Kennzahlen in der Trockenstehperiode	Infektionsgeschehen TS 2021 (<i>n</i> = 20)	Infektionsgeschehen TS 2022 (<i>n</i> = 20)	<i>Differenz Ökologisch 2022 / 2021</i>
Neuinfektionsrate	12,5% (1/8)	18,2% (2/11)	+ 5,7%
Heilungsrate	66,7% (8/12)	33,3% (3/9)	- 33,4%

(**FETT**) = die fett gedruckten Zahlen geben die absoluten Zahlen wieder; TS, Trockenstehperiode

In der Abbildung 11 dargestellt sind die 38 Tiere aus beiden Betrieben sortiert nach der Anzahl ihrer Mastitisbehandlungen (MB) aus den Vorlaktationen. Die Anzahl an Mastitisbehandlungen in den Vorlaktationen der Kühe unterschieden sich statistisch signifikant vom Infektionsgeschehen über die Trockenstehperiode 2022 (Exakter Fisher Test = 15,891; $p \approx 0,02$). Es kann von einem signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl an Mastitisvorbehandlungen und dem Infektionsgeschehen über die Trockenstehperiode ausgegangen werden. Es wurde deutlich, dass je mehr Behandlungen die Tiere in der Vorlaktation hatten, umso höher war der Anteil an chronisch kranken und neuinfizierten Tieren.

Somit waren Tiere mit mehr Mastitisvorbehandlungen weniger häufig über die Trockenstehperiode eutergesund oder ausgeheilt.

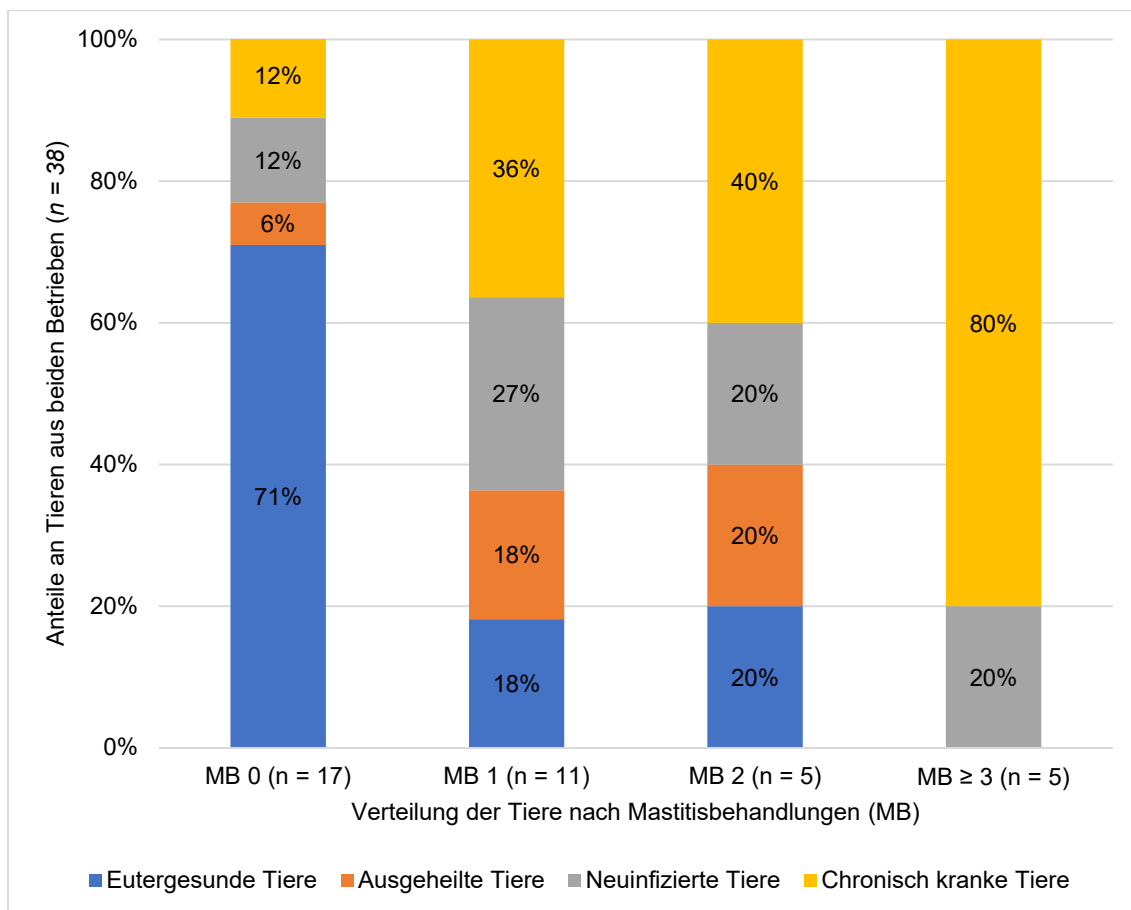


Abbildung 11 Verteilung der Tiere des konventionellen und ökologischen Betriebes (gemeinsam dargestellt) anhand des Infektionsgeschehens in der Trockenstehphase 2022 nach den Mastitisbehandlungen aus den Vorlaktationen

Zellzahlverläufe um die Trockenstehphase

Die Zellzahlverläufe um die Trockenstehphase sind anhand der Probemelkungen der ausgewerteten Tiere für beide Betriebe getrennt in der Abbildung 12 bzw. Abbildung 13 dargestellt. Die deskriptive Analyse ist in der Tabelle A3 im Anhang abgebildet.

Vergleicht man den Zellzahlverlauf beider Laktationen am konventionellen Betrieb so zeigte sich, dass in beiden Laktationen ein Zellzahlanstieg nach dem Abkalben zu verzeichnen war. Jedoch war dieser Anstieg 2022 deutlicher als 2021, wobei 2022 die Tiere bereits mit einer deutlich höheren Zellzahl trockengestellt wurden. Nach der Abkalbung hatten sie einen Zellzahlmedian von rund 400.000 Z/ml in der Laktation 2022. In dieser Auswertung am konventionellen Betrieb konnten nur neun Tiere miteinbezogen werden. Bei den fehlenden neun Tieren gab es keine letzte PM vor dem TS 2021, da diese Tiere zu dem genannten Zeitpunkt hochtragende Kalbinnen waren. Dementsprechend hatten diese neun Tiere in ihrem Leben erst eine Trockenstehperiode, die sich zwischen ihrer 1. und 2. Laktation erstreckte. Daher konnten sie bei der Auswertung des Infektionsgeschehens über die Trockenstehperiode nicht berücksichtigt werden.

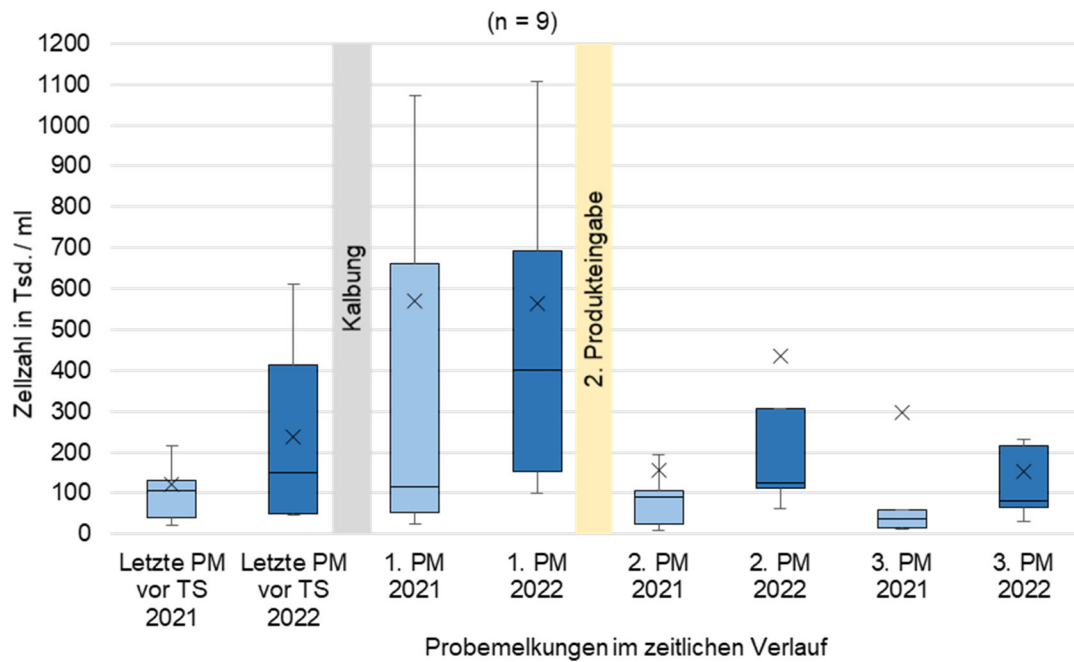


Abbildung 12 Zellzahlverlauf vor dem Trockenstellen und in der darauf folgenden Früh lactation in den Jahren 2021 und 2022 beim konventionellen Betrieb

n, Anzahl Tiere; PM, Probemelkung; TS, Trockenstellen; 2. Produkteingabe, *AHV Extra* und *Aspi*

Im ökologischen Betrieb konnte 2021 als auch 2022 während der Trockenstehperiode eine Zellzahlreduktion beobachtet werden, wobei das Niveau 2022 höher war als 2021. In der Laktation waren deutliche Unterschiede zu erkennen, während 2021 das Zellzahl Niveau konstant niedrig war, schwankte der Zellzahl Verlauf 2022.

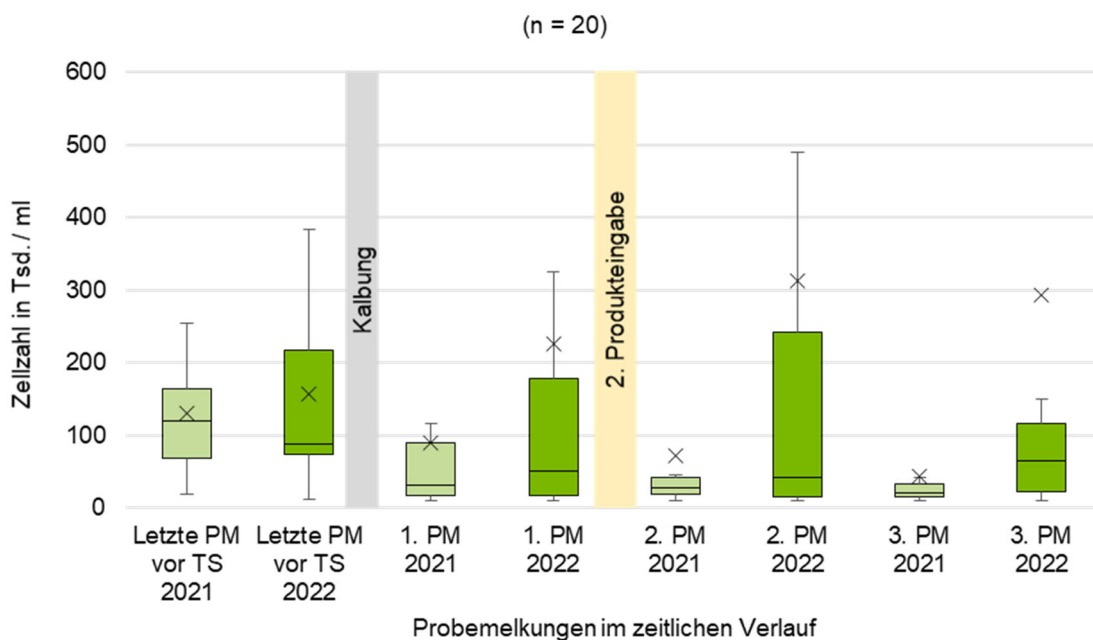


Abbildung 13 Zellzahlverlauf vor dem Trockenstellen und in der darauf folgenden Früh lactation in den Jahren 2021 und 2022 beim ökologischen Betrieb

n, Anzahl Tiere; PM, Probemelkung; TS, Trockenstellen; 2. Produkteingabe, *AHV Extra* und *Aspi*

Zyto - bakteriologische Milchprobenuntersuchungen

Eine detaillierte Verteilung der Pathogene in den zyto - bakteriologischen Milchprobenuntersuchungen ist für beide Betriebe getrennt in Tabelle 12 und Tabelle 13 abgebildet.

Am konventionellen Betrieb wurden 18 Tiere mit insgesamt 70 laktierenden Vierteln zu zwei Zeitpunkten beprobt. Zum Zeitpunkt 21 Tage vor dem Trockenstellen (1. BU) wurden insgesamt 28,6% ($n = 20$) Viertel mit pathogenen Mastitiserregern detektiert, darüber hinaus wurden 50 Viertel (71,4%) als negativ eingestuft. Nach der Trockenstehperiode wurden die Tiere um den 7. LT (2. BU) erneut beprobt. Hierbei wurde bei insgesamt 16 (22,9%) der 70 Viertel ein mastitispathogener Erreger nachgewiesen. Die restlichen Viertel waren negativ (77,1%). Die Erregerverteilung zu beiden Zeitpunkten unterschied sich kaum, so machten die Viertel mit KNS (1. BU 14,3%, 2. BU 10,0%) den zweitgrößten Anteil aus, gefolgt von *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*) (1. BU 11,4%, 2. BU 10,0%) und *Sc. uberis* (1. BU 2,9%, 2. BU 2,9%). Die Befunde KNS und *C. bovis* sind als minor pathogene Keime einzuschätzen und weniger bedrohlich für die Eutergesundheit als der major pathogene Keim *Sc. uberis*. Obwohl wie aus Tabelle 12 zu entnehmen ein Großteil ($n = 50$) der Befunde der Viertel „negativ“ waren, lag dennoch unter dem Einbezug der Zellzahl der Anteil an Vierteln mit normaler Sekretion darunter (52,9%). Möglicherweise konnte in den 13 Vierteln mit unspezifischer Mastitis (18,6%) keine Erreger (mehr) nachgewiesen werden oder es kamen andere Gründe für eine Zellzahlerhöhung in Betracht, wie z.B.: Stress oder Futterumstellung (siehe Abbildung 14).

Tabelle 12 Detektierte Pathogene aus den Viertelgemelksproben in der 1. und 2. BU am konventionellen Betrieb

n Zahl (%) der isolierten Pathogene				
Pathogen	1. BU (21d vor TS)	2. BU (\pm 7.LT)	PI ¹	NI ²
<i>Streptokokkus uberis</i>	2 (2,9%)	2 (2,9%)	0 (0,0%)	2 (100,0%)
KNS	10 (14,3%)	7 (10,0%)	0 (0,0%)	7 (100,0%)
<i>Straphylokokkus aureus</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Coliforme	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Corynebacterium bovis</i>	8 (11,4%)	7 (10,0%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)
<i>Enterokokkus spp.</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Summe positiver Befunde	20 (28,6%)	16 (22,9%)	2 (12,5%)	14 (87,5%)
Negativ	50 (71,4%)	54 (77,1%)		

BU, zyto - bakteriologische Untersuchung, TS, Trockenstehperiode, ¹ Persistierende Infektionen wurden definiert als eine intramammäre Infektion mit der gleichen Erregerart/Gattung in 1.BU und 2.BU ² Neuinfektionen wurden definiert als eine intramammäre Infektion mit einer anderen Erregerspezies/-gattung bei 1.BU als 2.BU; KNS, Koagulase negative Staphylokokken

Um einen noch detaillierteren Einblick in die Eutergesundheit der Milchkühe zu bekommen, wurde bei einer geringen Stichprobe ($n = 8$ Kühe) am konventionellen Betrieb zusätzlich eine 16S rRNA Sequenzierung um den 7.LT durchgeführt. Für die Proben wurden ein Tupfer aus dem Strichkanal und eine steril gewonnene Milchprobe aus der Euterzisterne jedes Viertels entnommen. Die Ergebnisse wurden dann im Kontext zu den zyto - bakteriologischen Milchprobenuntersuchungen, die mittels konventioneller Kultur angezchtet wurden, und den tierindividuellen Informationen aus dem Euterscoring ausgewertet. Weitere ausführliche Informationen sind in der Publikation verfügbar.

Klassifizierung der Eutergesundheit

Im Folgenden sind die Ergebnisse der beiden zyto - bakteriologischen Untersuchungen der Milchproben nach den DVG Leitlinien anhand ihrer Eutergesundheit klassifiziert worden. Bei der 1. BU und 2. BU wiesen am konventionellen Betrieb 52,9% ($n = 37$) von den 70 untersuchten Vierteln eine normale Sekretion auf. Der prozentuale Anteil an Vierteln mit einer latenten Infektion sank von 17,1% ($n = 12$) auf 7,1% ($n = 5$) ab. Wohingegen der prozentuale Anteil an Viertel mit einer unspezifischen Mastitis und einer Mastitis anstiegen (siehe Abbildung 14), was auf eine Abnahme der Eutergesundheit nach dem Trockenstellen und in der kritischen peripartalen Phase hindeutete ($p \approx 0,29$).

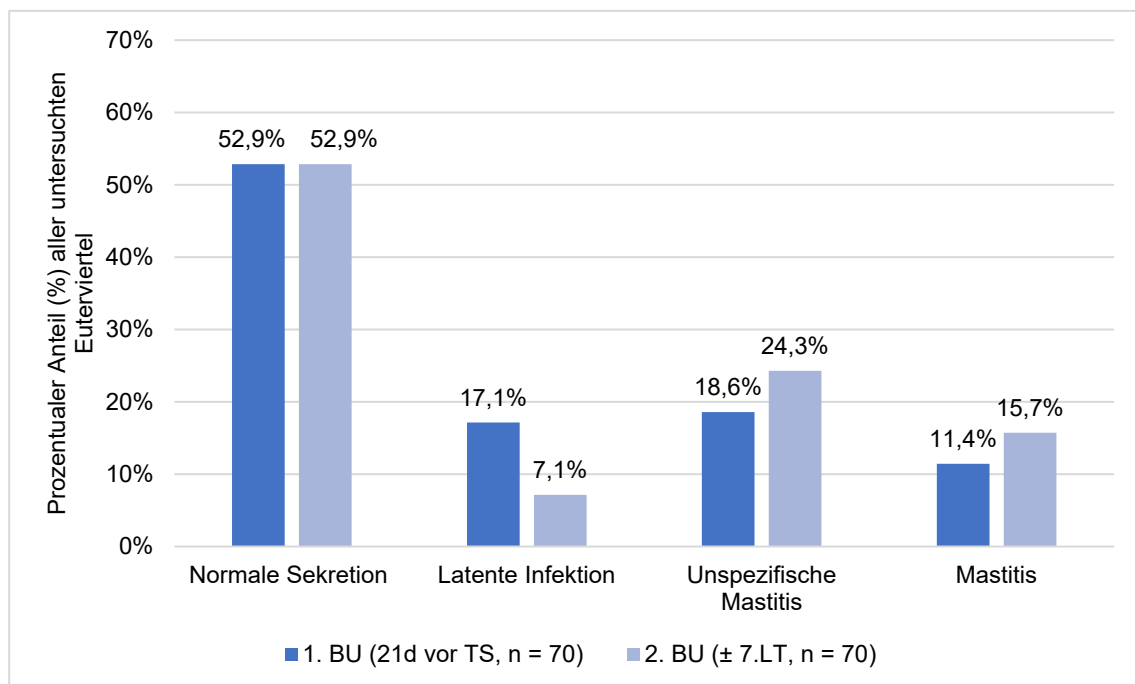


Abbildung 14 Klassifizierung der untersuchten Euterviertel in die verschiedenen Kategorien der Eutergesundheit am konventionellen Betrieb

BU, zyto - bakteriologische Untersuchung, TS, Trockenstehperiode; LT, Laktationstag

Am ökologischen Betrieb wurden 20 Tiere mit insgesamt 80 laktierenden Vierteln zu zwei Zeitpunkten beprobt. Ein Großteil der Viertel wurde als negativ befundet (1.BU 93,8%, 2.BU 85,0%). Den zweitgrößten Anteil in der 1. BU machten die Viertel mit KNS ($n = 3$) aus, gefolgt von *S. aureus* ($n = 2$), der als major pathogen und hoch kontagiöser Keim gilt. Nach dem Abkalben nahm das Keimspektrum des ökologischen Betriebes bei der zweiten bakteriologischen Untersuchung zu.

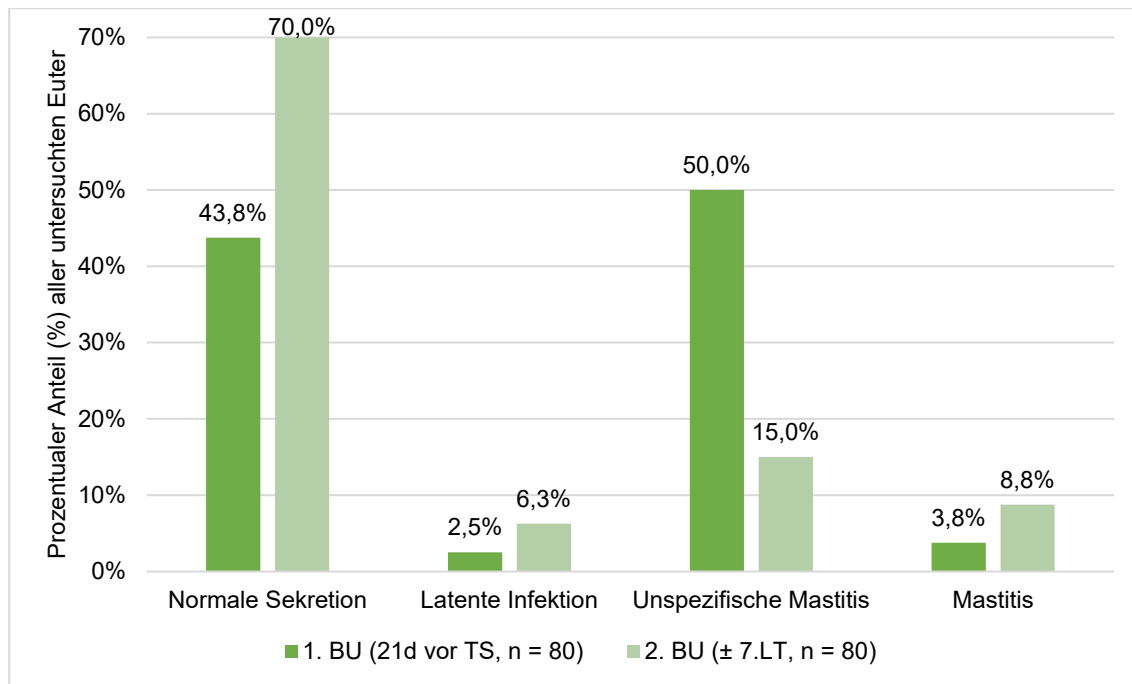
Der Anteil an Vierteln mit major pathogenen Umweltkeimen erweiterte sich um die Keime Coliforme ($n = 1$), Enterokokken ($n = 1$) und *Sc. uberis* ($n = 1$), auch wenn sie prozentual gesehen nur einen kleinen Anteil ausmachten (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13 Detektierte Pathogene aus den Viertelgemelksproben in der 1. und 2. BU am ökologischen Betrieb

n Zahl (%) der isolierten Pathogene				
Pathogen	1. BU (21d vor TS)	2. BU (± 7.LT)	PI ¹	NI ²
<i>Streptokokkus uberis</i>	0 (0,0%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)
KNS	3 (3,8%)	3 (3,8%)	0 (0,0%)	3 (100,0%)
<i>Staphylokokkus aureus</i>	2 (2,5%)	2 (2,5%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)
Coliforme	0 (0,0%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)
<i>Corynebacterium bovis</i>	0 (0,0%)	4 (5,0%)	0 (0,0%)	4 (100,0%)
<i>Enterokokkus</i> spp.	0 (0,0%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)
Summe positiver Befunde	5 (6,3%)	12 (15,0%)	1 (8,3%)	11 (91,7%)
Negativ	75 (93,8%)	68 (85,0%)		

BU, zyto - bakteriologische Untersuchung, TS, Trockenstehperiode, ¹ Persistierende Infektionen wurden definiert als eine intramammäre Infektion mit der gleichen Erregerart/Gattung in 1.BU und 2.BU ² Neuinfektionen wurden definiert als eine intramammäre Infektion mit einer anderen Erregerspezies/-gattung bei 1.BU als 2.BU; KNS, Koagulase negative Staphylokokken

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der beiden zyto - bakteriologischen Untersuchungen der Milchproben nach den DVG Leitlinien anhand ihrer Eutergesundheit klassifiziert worden. Die Klassifizierung der Eutergesundheit zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten weichen am ökologischen Betrieb statistisch signifikant voneinander ab (Exakter Fisher Test = 23,168; $p < 0,01$). Während sich die Viertel mit unspezifischer Mastitis während der Trockenstehzeit deutlich reduzierten, kam es zu einem Anstieg der eutergesunden Viertel mit normaler Sekretion in der zweiten zyto - bakteriologischen Untersuchung (70,0%). Möglicherweise konnten einige Erreger in den Vierteln über die Trockenstehphase ausgeheilt werden und diese zeigten wieder eine normale Sekretion. Im scheinbaren Widerspruch dazu stand eine Verdoppelung der Anzahl an Mastitis positiven Vierteln (1. BU 3,8%, 2. BU 8,8%). Sie deckte sich jedoch mit der Zunahme an den gefundenen major pathogenen Mastitiserregern in der zweiten BU, da diese in der Regel eine höhere Virulenz als minor pathogene Erreger besitzen und zu deutlicheren Mastitissymptomen wie Zellzahlerhöhungen führen können (siehe Tabelle 13).



BU, zytobakteriologische Untersuchung, TS, Trockenstehperiode; LT, Laktationstag

Abbildung 15 Klassifizierung der untersuchten Euterviertel in die verschiedenen Kategorien der Eutergesundheit am ökologischen Betrieb

Bakteriologische und zytologische Heilung

In Tabelle 14 und Tabelle 15 sind die bakteriologischen und zytologischen Heilungsraten der zweimalig beprobten Viertel nach Betrieben getrennt und in Abhängigkeit der nachgewiesenen Mastitispathogenen aufgeführt. Betriebsübergreifend wurde bei allen ausgewerteten Tiere über die Trockenstehperiode kein Viertel mit antibiotischem Trockensteller behandelt, aber ein interner Zitzenversiegler verwendet. Darüber hinaus fand zum Zeitpunkt der 1. BU (21 Tage vor dem Trockenstellen) eine Eingabe mit alternativen Produkten statt (*AHV Extra* und *Aspi*).

Am konventionellen Betrieb wurde bei 15 (75,0%) von 20 infizierten Eutervierteln zwischen den beiden Untersuchungen eine bakteriologische Heilung beobachtet. Die besten Heilungsraten (100%) hatten dabei Viertel, bei denen KNS in der 1. BU nachgewiesen wurde, gefolgt von *Sc. uberis* (50,0%) und *C. bovis* (50,0%). Viertel mit einem negativen Befund wurden in dieser Auswertung nicht berücksichtigt, da keine Aussagen über eine bakterielle Beteiligung gemacht werden konnte. Bei 25,0% der infizierten Viertel ($n = 5$) konnte keine bakteriologische Heilung festgestellt werden (siehe Tabelle 14).

Eine zytologische Heilung wurde in 13 (61,9%) von insgesamt 21 Vierteln mit erhöhtem Zellgehalt festgestellt. Der größte Anteil der zytologischen Heilungsraten war auf eine unspezifische Mastitis und einen entsprechenden negativen ($n = 7$; 53,2%) Erregernachweis zurückzuführen. Insgesamt 2 (20,0%) der infizierten Viertel mit KNS in der 1. BU waren in der 2. BU zytologisch ausgeheilt. Bei *C. bovis* betrug der Anteil an zytologisch ausgeheilten Vierteln 37,5% ($n = 3$) (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14 Bakteriologische und zytologische Heilungsraten aufgeteilt nach Erreger am konventionellen Betrieb

Pathogen	Bakteriologische Heilung			Zytologische Heilung		
	n	% ¹	% ²	n	% ¹	% ²
<i>Streptokokkus uberis</i>	1 / 2	50,0	6,7	1 / 2	50,0	7,7
KNS	10 / 10	100,0	66,7	2 / 10	20,0	15,4
<i>Straphylokokkus aureus</i>	0 / 0	0,0	0,0	0 / 0	0,0	0,0
Coliforme	0 / 0	0,0	0,0	0 / 0	0,0	0,0
<i>Corynebacterium bovis</i>	4 / 8	50,0	26,7	3 / 8	37,5	23,1
<i>Enterokokkus spp.</i>	0 / 0	0,0	0,0	0 / 0	0,0	0,0
Negativ ³				7 / 50	14,0	53,8
Gesamt	15 / 20	75,0	100,0	13 / 21	61,9	100,0

¹ Anteil der von der Erregergruppe verursachten Fälle an der Gesamtheit der Fälle, ² Anteil der Fälle an allen bakteriologisch/zytologisch geheilten Fällen, ³ Viertel mit den Befunden keimfrei oder ohne besonderen Befund; KNS, Koagulase negative Staphylokokken

Am ökologischen Betrieb wurde bei 4 (80%) von insgesamt 5 infizierten Eutervierteln zwischen den beiden Untersuchungen eine bakteriologische Heilung beobachtet. Sowohl Viertel, die eine Infektion mit KNS in der 1. BU hatten, als auch Viertel mit einer Infektion mit *S. aureus* heilten teilweise bakteriologisch über den Trockenstehzeitraum aus (siehe Tabelle 15).

Eine zytologische Heilung wurde in 31 (72,1%) von insgesamt 43 Vierteln mit erhöhtem Zellgehalt festgestellt. Interessanterweise wurde beobachtet, dass nur bei denjenigen Vierteln eine zytologische Heilung festgestellt wurde, bei der ein negativer Erregernachweis in der 1. BU vorliegt (siehe Tabelle 15). Dies ist auf den hohen Anteil (50,0%) an unspezifischen Mastitiden in der 1. BU zurückzuführen (siehe Abbildung 15).

Tabelle 15 Bakteriologische und zytologische Heilungsraten aufgeteilt nach Erreger am ökologischen Betrieb

Pathogen	Bakteriologische Heilung			Zytologische Heilung		
	n	% ¹	% ²	n	% ¹	% ²
<i>Streptokokkus uberis</i>	0 / 0	0,0	0,0	0 / 0	0,0	0,0
KNS	3 / 3	100,0	75,0	0 / 0	0,0	0,0
<i>Straphylokokkus au-reus</i>	1 / 2	50	25,0	0 / 0	0,0	0,0
Coliforme	0 / 0	0,0	0,0	0 / 0	0,0	0,0
<i>Corynebacterium bovis</i>	0 / 0	0,0	0,0	0 / 0	0,0	0,0
<i>Enterokokkus spp.</i>	0 / 0	0,0	0,0	0 / 0	0,0	0,0
Negativ ³				31 / 75	41,3	100,0
Gesamt	4 / 5	80,0	100,0	31 / 43	72,1	100,0

¹ Anteil der von der Erregergruppe verursachten Fälle an der Gesamtheit der Fälle, ² Anteil der Fälle an allen bakteriologisch/zytologisch geheilten Fällen, ³ Viertel mit den Befunden keimfrei oder ohne besonderen Befund; KNS, Koagulase negative Staphylokokken

Eine statistische Signifikanz in der bakteriologischen ($p \approx 0,54$) und zytologischen Heilung ($p \approx 0,57$) zwischen den beiden Haltungformen konnte nicht nachgewiesen werden.

5.2.2 Entwicklung und Beurteilung der Eutergesundheit in der Laktation

Anteil an eutergesunden, erhöhten, deutlich erhöhten und chronisch kranken Tieren sowie die Neuinfektionsrate in der Laktation

Die wichtigsten Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Laktation sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 dargestellt. Darüber hinaus wurde die Differenz zwischen den beiden Laktationen 2021 und 2022 berechnet.

Während der Laktation zeigten beide Betriebe eine ähnliche Tendenz hinsichtlich der Neuinfektionsrate (Zunahme; konventionell: $p \approx 0,69$; ökologisch: $p \approx 0,39$), dem Anteil eutergesunder Tiere (Abnahme) und den Tieren mit deutlich erhöhtem Zellgehalt (Zunahme). Lediglich in der Differenz der Mastitisinzidenzen in den ersten 100 Laktationstagen bestand ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Betrieben. Beim ökologischen Betrieb blieb die Inzidenz für Mastitis unverändert ($p = 1$). Wohingegen beim konventionellen Betrieb eine starke Zunahme erfolgte ($p \approx 0,02$). Die Eutergesundheit verschlechterte sich bei beiden Betrieben in der Früh-laktation, wobei dieser Effekt besonders stark im konventionellen Betrieb zu sehen war. Die statistischen Unterschiede in den Signifikanzen belegen zudem die Unterschiede zwischen den beiden Haltungformen hinsichtlich dem Auftreten von Mastitis.

Tabelle 16 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Laktation 2021 und 2022 für den konventionellen Betrieb

Kennzahlen in der Laktation	Laktation 2021 (n = 18)	Laktation 2022 (n = 18)	Differenz 2022 / 2021
Ø ¹ Neuinfektionsrate	24,1% (5/21)	33,3% (4/12)	+ 9,2%
Anteil chronisch kranker	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0%
Ø ¹ Anteil Eutergesunder	63,0% (34/54)	40,7% (22/54)	- 22,3%
Ø ¹ Anteil mit erhöhtem Zellgehalt	22,2% (12/54)	33,3% (18/54)	+ 11,1%
Ø ¹ Anteil mit dtl. erhöhtem Zellgehalt	14,8% (8/54)	25,9% (14/54)	+ 11,1%
Mastitisinzidenz in den ersten 100 DIM	5,6% (1/18)	44,4% (8/18)	+ 38,60%

(FETT) = die fett gedruckten Zahlen geben die absoluten Zahlen wieder, ¹ Ø aus den Parametern, die aus der 1., 2., und 3. Probemelkung berechnet wurde; DIM, days in milk (Laktationstage)

Weder 2021 noch 2022 hatte der konventionelle Betrieb mit chronisch kranken Tieren zu kämpfen. Im Mittel erhöhte sich 2021 im Laktationsverlauf der Anteil an eutergesunden Tieren, während dieser Trend 2022 nicht beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 16) (1.PM: p ≈ 0,52; 2.PM: p ≈ 0,26; 3.PM: p ≈ 0,48).

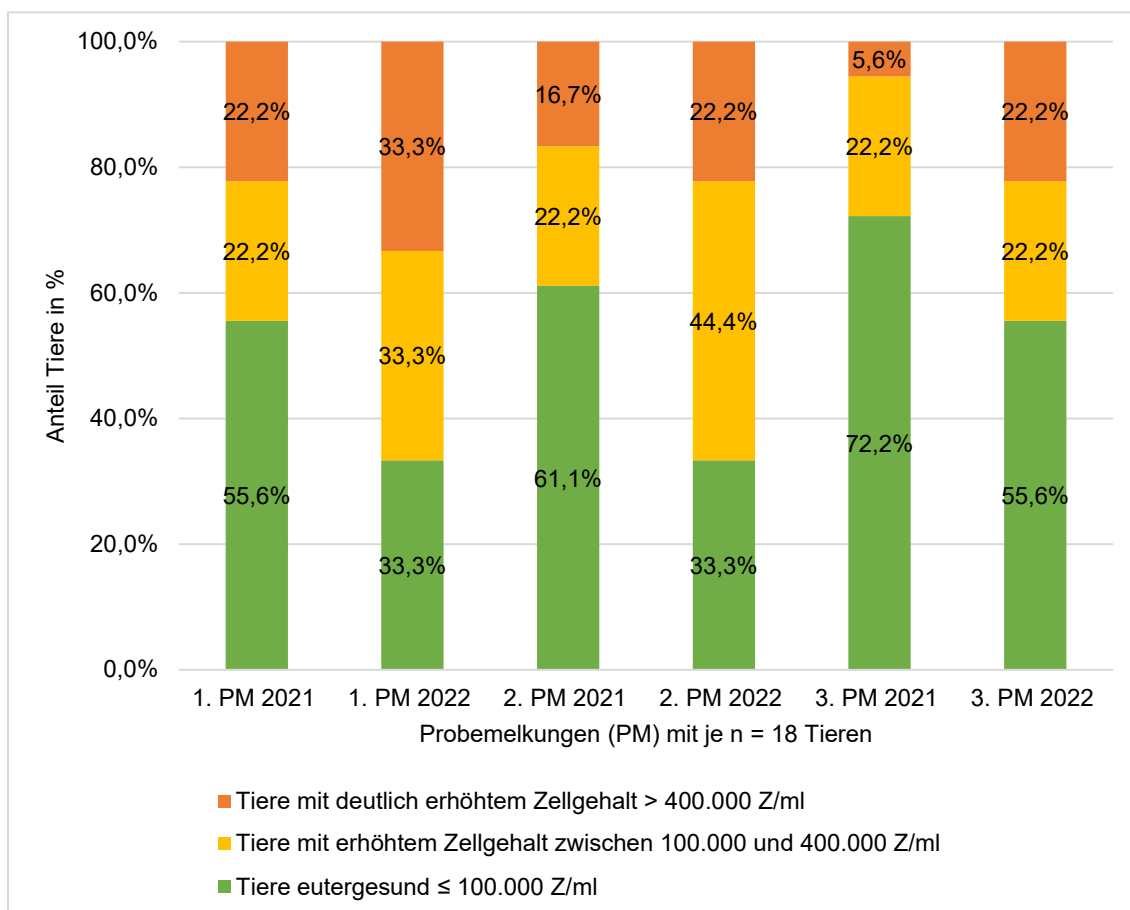


Abbildung 16 Anteil an eutergesunden Tieren und Tieren mit erhöhtem und deutlich erhöhtem Zellgehalt aufgeteilt nach Probemelkungen am konventionellen Betrieb in der Laktation 2021 und 2022

Tabelle 17 Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit in der Laktation 2021 und 2022 für den ökologischen Betrieb

Kennzahlen in der Laktation	Laktation 2021 (n = 20)	Laktation 2022 (n = 20)	Differenz Ökologisch 2022 / 2021
Ø ¹ Neuinfektionsrate	5,9% (2/32)	15,5% (4/26)	+ 9,6%
Anteil chronisch kranker	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0%
Ø ¹ Anteil Eutergesunder	81,7% (49/60)	65,0% (39/60)	- 16,7%
Ø ¹ Anteil mit erhöhtem Zellgehalt	13,3% (8/60)	16,7% (10/60)	+ 3,4%
Ø ¹ Anteil mit dtl. erhöhtem Zellgehalt	5,0% (3/60)	18,3% (11/60)	+ 13,3%
Mastitisinzidenz in den ersten 100 DIM	30,0% (6/20)	30,0% (6/20)	0,0%

(FETT) = die fett gedruckten Zahlen geben die absoluten Zahlen wieder, ¹ Ø aus den Parametern, die aus der 1., 2., und 3. Probemelkung berechnet wurde; DIM, days in milk (Laktationstage)

Der Anteil an eutergesunden Tieren nahm im Verlauf der Laktation 2021 am ökologischen Betrieb zu, wohingegen der Anteil an Tieren mit deutlich erhöhtem Zellgehalt gleich blieb. In der Laktation 2022 nahm der Anteil an eutergesunden Tieren im Verlauf zu, wohingegen der Anteil an Tieren mit deutlich erhöhtem Zellgehalt schwankte. Insgesamt hatte der Anteil an Tieren mit deutlich erhöhtem Zellgehalt im Vergleich zur Laktation 2021 zugenommen (siehe Abbildung 17) (1.PM: $p \approx 0,63$; 2.PM: $p \approx 0,29$; 3.PM: $p \approx 0,37$). Bei keiner der ersten drei Probemelkungen in der Laktation 2022 am ökologischen Betrieb gab es chronisch kranke Tiere.

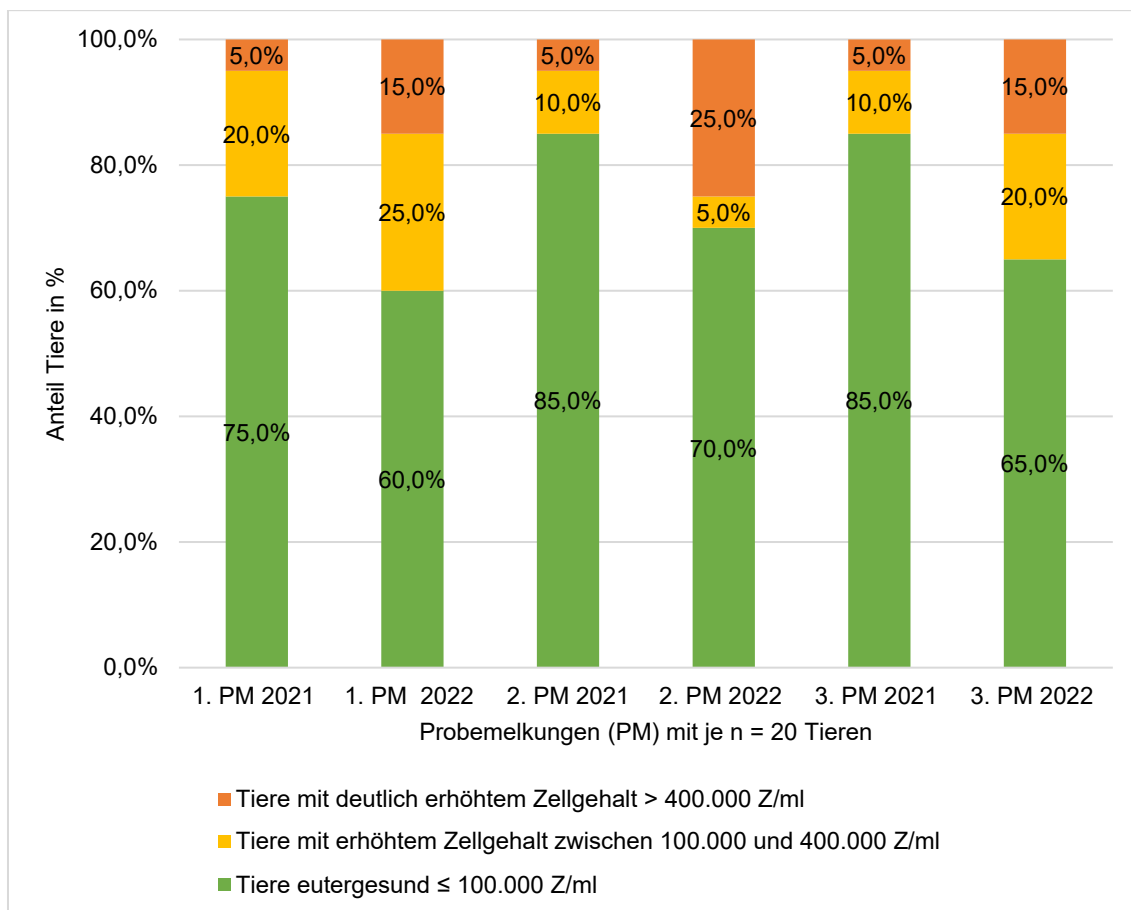


Abbildung 17 Anteil an eutergesunden Tieren und Tieren mit erhöhtem und deutlich erhöhtem Zellgehalt aufgeteilt nach Probemelkungen am ökologischen Betrieb in der Laktation 2021 und 2022

Zellzahlverläufe in der Laktation

Betrachtet man nun die Zellzahlverläufe während der Laktation, nicht aber über die Trockenstehperiode, so konnten alle 18 Tiere des konventionellen Betriebes abgebildet werden. In der Abbildung 18 wurden daher auch die neun Tiere aus der aktuell zweiten Laktation, die in Abbildung 12 fehlten, berücksichtigt. Nahm man folglich am konventionellen Betrieb alle Jungkühe mit in die Auswertung der Laktation auf, so hatte dies einen deutlichen Effekt auf den Zellzahlverlauf. Die neun Tiere in der 2. Laktation senkten den Median in der ersten PM 2022 auf 190.000 Z/ml und wiesen eine bessere Eutergesundheit als die älteren Tiere auf. (vgl. Zellzahlmedian von 401.000 Z/ml in der 1. PM 2022).

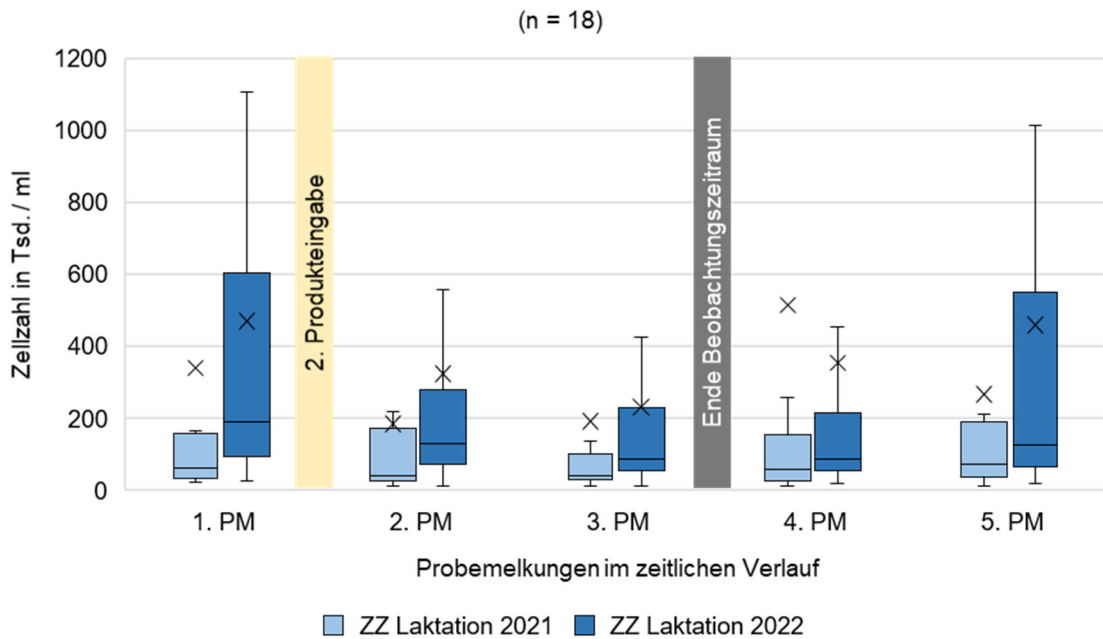


Abbildung 18 Zellzahlverlauf während der Laktation 2021 und 2022 beim konventionellen Betrieb
n, Anzahl Tiere; PM, Probemelkung; TS, Trockenstellen; 2. Produkteingabe, *AHV Extra* und *Aspi*. Ende Beobachtungszeitraum, 100. Laktationstag, ZZ, Zellzahl

Beim ökologischen Betrieb unterschritten die Mediane in der Laktation 2021 und 2022 über die dritte PM hinaus die Zellzahlgrenze von 100.000 Z/ml deutlich. Der graue Balken markiert das Ende des Beobachtungszeitraumes der ausgewerteten Tiere (Abbildung 19).

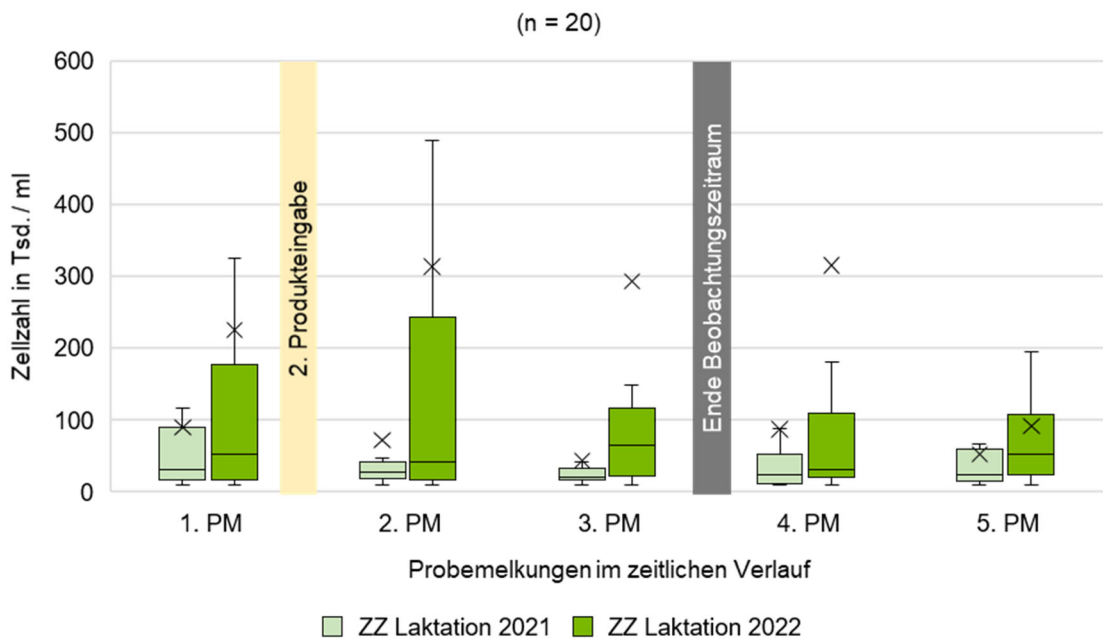


Abbildung 19 Zellzahlverlauf während der Laktation 2021 und 2022 beim ökologischen Betrieb
n, Anzahl Tiere; PM, Probemelkung; TS, Trockenstellen; 2. Produkteingabe, *AHV Extra* und *Aspi*; Ende Beobachtungszeitraum, 100. Laktationstag; ZZ, Zellzahl

Die deskriptiven Analysen zu Abbildung 18 und Abbildung 19 sind in der Tabelle A4 im Anhang abgebildet.

Mastitiskennzahlen

In Tabelle 18 wurde ein Überblick über die Anzahl an alternativen Behandlungen im Beobachtungszeitraum dargestellt. Von den acht Behandlungen mussten fünf am konventionellen Betrieb antibiotisch nachbehandelt werden, während beim ökologischen Betrieb keine Nachbehandlung notwendig war.

Tabelle 18 Anzahl an Mastitiserstversorgungen und Antibiotikabehandlungen bei Mastitiserkrankungen in der Laktation 2022

	Betrieb Konventionell	Betrieb Ökologisch
Anzahl an alternativen Behandlungen im Beobachtungszeitraum (AHV Mastitis - Erstversorgung)	8	8
Anzahl an „Nachbehandlungen“ mit Antibiotika	5	0
Anzahl an Wiederholungsbehandlungen mit Antibiotika	1	0

Bei den AHV Mastitiserstversorgungen wurden die Produkte *AHV Booster*, *Aspi*, *Extra* und *Quick* verwendet (siehe Abbildung 5).

5.3 Euterscoring

Auswertung des Hygienescores

In der nachfolgenden Tabelle 19 wurden die Tiere anhand ihres Hygienescores, sowie betrieblich getrennt dargestellt. Der konventionelle Betrieb wies einen durchschnittlichen Hygienescore von 1,8 und der ökologische Betrieb von 2,6 auf. Wie in der Literatur beschrieben lassen sich die Scores 1 und 2 als sauber zusammenfassen, Score 3 und 4 als schmutzig. Die Hygienescores beim ökologischen und konventionellen Betrieb wichen statistisch signifikant voneinander ab (Exakter Fisher Test: $p \approx 0,04$). Es kann von einem signifikanten Zusammenhang zwischen dem Hygienescore und der Haltungsform ausgegangen werden. Folglich standen am konventionellen Betrieb die saubereren Tiere. Somit waren auf dem ökologischen Betrieb die verschmutzteren Tiere.

Tabelle 19 Hygienescore der beurteilten Euter einschließlich der Hintergliedmaßen, betrieblich getrennt

	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Anteil der Kühe in % ($n = 38$)	18,4% (7)	47,4% (18)	26,3% (10)	7,9% (3)
Anzahl der Kühe am konventionellen Betrieb	6 Tiere	9 Tiere	3 Tiere	0 Tiere
Anzahl der Kühe am ökologischen Betrieb	1 Tiere	9 Tiere	7 Tiere	3 Tiere

(FETT) = die so fett gedruckten Zahlen geben die absoluten Zahlen wieder
Score 1, sauber; Score 2, leicht verschmutzt; Score 3, mäßig verschmutzt; Score 4, stark verschmutzt;

Auswertung von tiefhängenden Eutern in Zusammenhang mit der Laktationsnummer, des Hygienescores und der Zellzahl

Insgesamt hatten 13 Tiere (34,2%) im Euterscoring ein tiefhängendes Euter. Neben einem tiefhängenden Euter fielen noch andere Abweichungen wie Baucheuter oder gestuftes Euter auf. In der folgenden Auswertung wurden aber nur Tiere mit tiefhängendem Euter im Vergleich weiter beleuchtet.

Tiere mit einem tiefhängenden Euter hatten einen Laktationsdurchschnitt von 5,5 Laktationen, waren schmutziger ($p \approx 0,08$) und hatten eine höhere Zellzahl. Dadurch zeigt sich, dass viele ältere Tiere auf Grund ihrer Euterform einem höheren Risiko unterlagen verschmutzter zu sein, weil der Abstand zwischen Boden und Euter abnahm. Die so bedingte Verschmutzung des Euters und kann mit einer höheren Zellzahl einhergehen (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20 Tiere mit tiefhängendem Euter im Zusammenhang mit dem Hygienescore und der Zellzahl auf beiden Betrieben

	Tiefhängendes Euter	Nicht tiefhängendes Euter
Anzahl der Kühe	13	25
Durchschnittlicher Hygienescore	2,64	1,98
Durchschnittliche Zellzahl in Z/ml	649.585	315.307

Auswertung der Euterödeme im Zusammenhang mit der Zellzahl

In der palpatorischen Untersuchung wurde, neben der Prüfung auf Euterödeme, noch andere Auffälligkeiten wie Schwellungen oder Verhärtungen geprüft. Meist war das Euter prall gefüllt, da die Tiere im Anschluss an das Scoring gemolken wurden. So waren zwar insgesamt 13 Tiere (34,2%) in der palpatorischen Prüfung auffällig. Ein Euterödem trat dabei bei insgesamt 11 Tieren (29,0%) auf. Dabei hatten am konventionellen Betrieb deutlich mehr Tiere ein Euterödem als am ökologischen Betrieb (siehe Tabelle 21) ($p \approx 0,09$).

Tabelle 21 Übersicht über die Ergebnisse aus der palpatorischen Untersuchung betrieblich getrennt

	In palpatorischer Untersuchung unauffällige Tiere	In palpatorischer Untersuchung auffällige Tiere	davon Tiere mit Euterödem
Anteil Tiere am konventionellen Betrieb ($n = 18$)	50,0% (9)	50,0% (9)	50,0% (9)
Anteil Tiere am ökologischen Betrieb ($n = 20$)	80,0% (16)	20,0% (4)	10,0% (2)

(**FETT**) = die fett gedruckten Zahlen geben die absoluten Zahlen wieder

Wenn die Tiere ein Euterödem hatten, wiesen sie eher eine Zellzahl > 100.000 Z/ml auf ($p \approx 0,15$). Lediglich 4 Tiere hatten ein Euterödem ohne eine Zellzahlerhöhung. Daraus ließ sich schließen, dass bei diesen 4 Tieren mit niedriger Zellzahl, trotz Euterödem vermutlich ein Geburtsödem vorlag, da das Scoring immer um den 7. LT durchgeführt wurde. Die Zellzahl von Tieren mit und ohne Euterödem unterschieden sich dennoch nicht statistisch signifikant voneinander und es kann somit von einer homogenen Verteilungen ausgegangen werden (Exakter Fisher Test: $p \approx 0,15$) (siehe Abbildung 20).

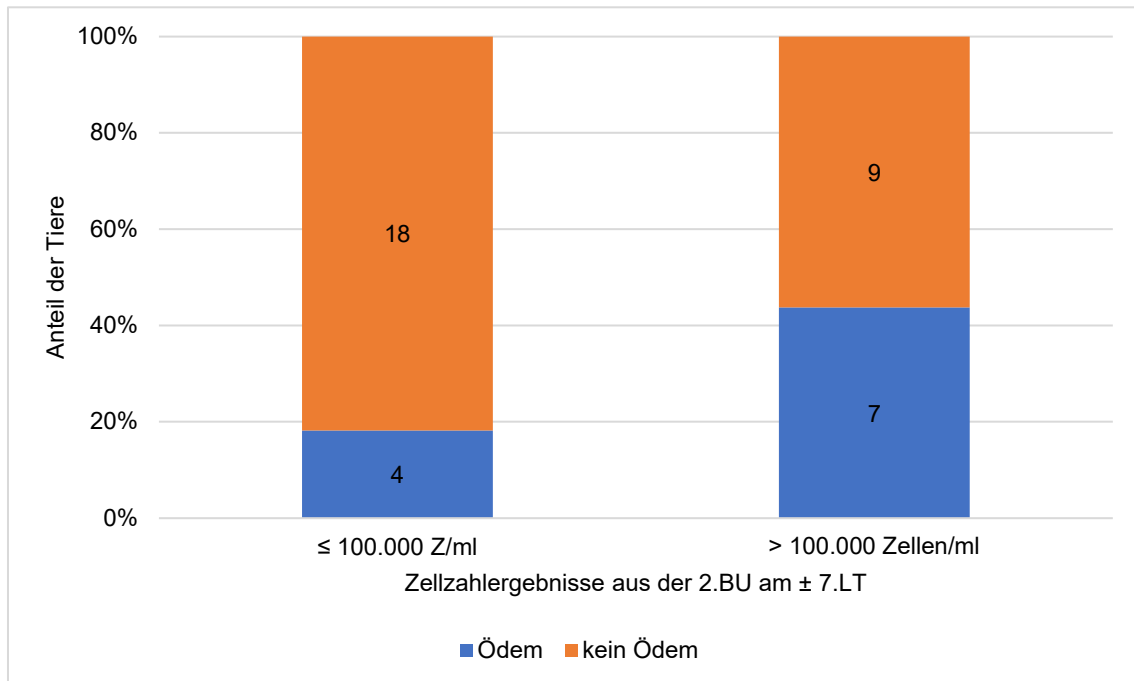


Abbildung 20 Zellzahlkategorien von Tieren mit und ohne Euterödem auf beiden Betrieben

6 Publierte Studienergebnisse

Titel:

Bovine Udder Health: From Standard Diagnostic Methods to New Approaches – A Practical Investigation of Various Udder Health Parameters in Combination with 16S rRNA Sequencing

Microorganisms, 2023, Volume 11, Issue 5, Article ID 1311

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11051311>

Angenommen am 15.05.2023

Verena Rötzer^{1,2}, Jasmin Wenderlein³, Anna Wiesinger³, Felix Versen¹, Elke Rauch², Reinhard K. Straubinger³ und Eva Zeiler¹

¹ Fakultät Nachhaltige Agrar- und Energiesysteme, Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, 85354 Freising, Deutschland

² Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department, Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung, LMU München, 80539 München, Deutschland

³ Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, LMU München, 80539 Munich, Germany

Folgend soll die Veröffentlichung zur tiefgreifenden Untersuchung der Eutergesundheit am konventionellen Betrieb in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie vorgestellt werden.

Der Artikel ist Open Access und online verfügbar unter:

<https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1311>



Article

Bovine Udder Health: From Standard Diagnostic Methods to New Approaches—A Practical Investigation of Various Udder Health Parameters in Combination with 16S rRNA Sequencing

Verena Rötzer ^{1,2,*}, Jasmin Wenderlein ³, Anna Wiesinger ³, Felix Versen ¹, Elke Rauch ², Reinhard K. Straubinger ³ and Eva Zeiler ¹

- ¹ Faculty of Sustainable Agriculture and Energy Systems, University of Applied Science Weihenstephan-Triesdorf, 85354 Freising, Germany; felix.versen@hswt.de (F.V.); eva.zeiler@hswt.de (E.Z.)
- ² Chair of Animal Welfare, Ethology, Animal Hygiene and Animal Husbandry, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, 80539 Munich, Germany; rauch@lmu.de
- ³ Chair of Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, 80539 Munich, Germany; jasmin.wenderlein@lmu.de (J.W.); anna.wiesinger@micro.vetmed.uni-muenchen.de (A.W.); r.straubinger@lmu.de (R.K.S.)
- * Correspondence: verena.roetzer@hswt.de

Abstract: Bovine udder health is an important factor for animal wellbeing and the dairy farm economy. Thus, researchers aim to understand factors causing mastitis. The gold standard for diagnosing mastitis in cows is the conventional culturing of milk samples. However, during the last few years, the use of molecular methods has increased. These methods, especially sequencing, provide a deeper insight into the diversity of the bacterial community. Yet, inconsistent results regarding the mammary microbiome have been published. This study aimed to evaluate the udder health of eight dairy cows at seven days postpartum with the standard methods in veterinary practice. Additionally, swabs from the teat canal and milk samples were analyzed using 16S rRNA gene amplicon sequencing. The sensitive low-biomass milk samples displayed only a few contaminations even though they were sampled in a field environment. In healthy udders, no bacterial communities were detected by the bacterial culture nor the 16S rRNA gene amplicons. The results from the standard examination of the cows, the cell count, and the bacteriological examination were comparable with the results from 16S rRNA gene amplicon sequencing when cows displayed subclinical or latent mastitis. Besides the pathogen detected in bacterial culturing, a second bacterial strain with low but significant abundance was detected by sequencing, which might aid in the understanding of mastitis incidence. In general, molecular biological approaches might lead to promising insights into pathological events in the udder and might help to understand the pathomechanism and infection source via epidemiological analyses.

Keywords: mastitis; diagnostics; conventional culturing; 16S rRNA gene amplicon sequencing; bacterial community; udder health; scoring



Citation: Rötzer, V.; Wenderlein, J.; Wiesinger, A.; Versen, F.; Rauch, E.; Straubinger, R.K.; Zeiler, E. Bovine Udder Health: From Standard Diagnostic Methods to New Approaches—A Practical Investigation of Various Udder Health Parameters in Combination with 16S rRNA Sequencing. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1311. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051311>

Academic Editor: Paolo Calistri

Received: 20 April 2023

Revised: 13 May 2023

Accepted: 15 May 2023

Published: 17 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bovine udder health is an important factor in dairy farms as diseases of the bovine udder are detrimental to the cow's wellbeing [1]. They further influence milk quality [2], increase the risk of developing antimicrobial resistance [3], and have an economic impact [4]. The dry period is a sensitive phase in which the udder undergoes morphological changes by involution as the cow moves closer to parturition [5]. During this stage of non-lactation and especially in the two-week period after cessation of milking and during colostrumogenesis, the udder is susceptible to intramammary infections [6]. For many decades, the conventional culturing (CC) of milk samples has been a quick and affordable

method to identify pathogenic bacteria involved in mastitis and to further identify a fitting antibiotic to fight the pathogens [7–9]. Nevertheless, there are some limits of CC pertaining to the sensitivity of the method. In general, only a small fraction of all cow-inhabiting bacteria is cultivable [10,11], while most known mastitis-causing bacteria are detected by CC. In contrast, dead bacteria, growth-inhibited bacteria, and other pathogens causing intramammary infections cannot be detected by CC [12]. Consequently, the result “no bacterial growth” is frequently observed as a result of CC testing using milk samples. The proportion of negative results from CC is around 20–30% in milk samples from cows with clinical mastitis, while that in cases with subclinical mastitis the proportion is slightly higher [13]. Therefore, during the last decade, several molecular techniques such as PCR and next-generation sequencing have been introduced to enlarge the spectrum of methods for mastitis diagnostics. These new approaches provide better sensitivity in detecting bacteria and especially bacterial DNA in milk in comparison to CC [12,14–16]. Due to the increase in knowledge and the availability of modern analysis techniques, new perspectives have emerged regarding the colonization of microbial communities in various organs and regions of the body [17]. The so-called “microbiome” has been the focus of research in recent years. The microbiome is defined as the totality of microorganisms, their genomes, and the surrounding environmental conditions, which exist in a defined habitat [18]. This study focuses on one group of the microbiota, the bacterial community, as most of the previously known mastitis-causing pathogens represent bacteria. Recently, the mammary gland has been proposed to harbor a diverse microbiome. However, this matter is discussed controversially [19]. There are both supporters and objectors of the hypothesis of the presence of a natural community of microbes within the mammary gland [19–22]. Furthermore, the term milk microbiota is not yet clearly defined regarding its origin from either only the milk or the mammary gland. Nevertheless, to understand the origin of the microbiome in the cow’s healthy or diseased udder, it is important to differentiate between the milk, the skin at the teat’s tip, the teat canal, and the glandular body. Three origins of the microbiota in the udder microbiome have been described: the internal upper part of the mammary gland (i.e., gland or teat), the extramammary outsides (i.e., skin), and the environment (i.e., feces or bedding) [21,23]. The upper part of the mammary gland is the origin of milk production, and a few studies focused especially around this location (i.e., teat or gland cistern) [24–26], whereby reasonable results could only be obtained by direct sampling from the gland cistern [19]. However, most studies have sampled outside the mammary gland once the milk has been expressed [17]. The studies by Hiitiö et al. [24] and Metzger et al. [25] are the only studies that sampled via a direct method by pricking a needle into the gland cistern. Other researchers have sequenced material from the teat canal, a separate compartment within the mammary gland with possibly different colonization [27–29]. In general, the following milk- and udder-associated microbiota have been described: *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., Lachnospiraceae, *Corynebacterium* spp., *Bacteroides* spp., and *Enterococcus* spp. [17]. Many of these bacteria are common inhabitants of the bovine skin or the environment [19,21,23] and many of the bacteria, which potentially compose the milk microbiota of healthy mammary glands, have the potential to induce mastitis [19]. Apart from arguments supporting the theory of a milk or udder microbiome, there are convincing arguments opposing this theory. This matter has been reviewed in great detail by Rainard et al. [19]. Reasons raised against the existence of a microbiome in the mammary gland are the inability of the innate and adaptive immune system of the mammary gland to adapt to physiological colonization with bacteria or the lack of an entero-mammary pathway in ruminants. Furthermore, milk is described as a nutrient-rich medium that supports the growth of bacteria. Additionally, the lack of a mucus shield in the epithelium of the mammary gland, which would limit the direct contact of bacteria with the epithelium, is an argument against the possible colonization of the udder with microbiota [19]. Further arguments against a bovine udder microbiome have been discussed elsewhere [20]. One main reason why some studies describe a bovine udder microbiome might arise from the difficulty in handling low-biomass or sterile samples in

next-generation sequencing. As these methods are extremely sensitive and low amounts of DNA can be amplified, contaminations are at great risk to produce false-positive results. A prime example is the now mostly proven inexistence of a fetal microbiome in utero [30]. Researchers must therefore critically question their data, especially when handling low- or no-biomass samples, and as such, sterile working and published standards for microbiome studies should be applied [31].

The present study aimed to investigate various udder health parameters in combination with next-generation sequencing of 16S rRNA gene amplicons. Thereby, standards for microbiome studies have been applied [31] such as the inclusion of various negative controls of the farm environment, all fluids used during sampling and DNA extraction, and a mock community. In a small group of lactating Simmental cows ($n = 8$), the condition of the udder health in the first week postpartum was examined. At the time of dry-off, the cows had received neither intramammary nor systemically applied antimicrobials, but rather an internal teat sealant. The internal teat sealant consisting of alkaline bismuth nitrate was applied through the teat canal with an injector after the last milking. To comprehend the state of the udder's health, various parameters were recorded. The objective of this pilot study was to evaluate the benefit of sequencing as a new investigation method in comparison with the current gold standard under the highest possible and practicable levels of decontamination in a field environment.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Committee Approval

The presented study was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of LMU Munich (reference number 309-16-05-2022).

2.2. Animals and Farm Conditions

For this study, eight Simmental dairy cows from a farm located in Upper Bavaria were chosen. The cows were kept in a cubicle stall consisting of four individual pens according to their health and lactation status. The bedding material provided was either a straw mattress in the calving and sick pen or deep-bedded cubicles with straw in the pen for lactating cows and dried-off cows. The cows received a total mixed ration depending on their production level and were milked two times a day. The dairy farm consisted of 94 lactating cows with an average annual milk production of 9336 kg per cow and an average somatic cell count (SCC) of 211,000 cells per mL according to the Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. (LKV) data analysis in 2022. The average lactation number of the herd was 4.3. The animals were selected based on having the following criteria: pluriparity, dry-off phases without antibiotics but with an internal teat sealant, a calving event in the timeframe of the experiment, and no complications during birth. The selected animals calved during the test period and were investigated on the seventh day in milk (DIM). The investigation took place during the normal morning milking in the milking parlor of the farm, which is constructed as a double-six herringbone. The investigation included the following steps: scoring, sample collection for the CC, and thereafter sampling for 16S rRNA gene amplicon sequencing.

2.3. Scoring

The scoring was conducted as a combination of a general examination and a further examination of the udder including a sensory examination of the milk secretion. With the collected information, the udder health status of the cows was determined. Table 1 provides an overview of the examinations conducted for the scoring, the examination methods, and the evaluation key according to the sources used.

In the general examination, the body temperature was measured rectally using the veterinary thermometer SC 12 (Scala Electronic GmbH, Stahnsdorf, Germany). The respiratory movements at the costal arch and flank were counted and the rumen score, modified according to Donat et al., was determined [33,36,37].

Table 1. Overview of the scoring of the cows including general examination, further examination of the udder, and sensory examination of the milk secretion.

Subject of Examination	Examination Method	Evaluation Key	Source
General examination			
Rectal temperature	Rectal thermometer	[°C]	[32]
Breathing rate	Counting respiratory movements at the costal arch and flank	Breaths per minute	[32]
Rumen filling	Rumen filling score	1, 3, 5	[33]
Further examination of the udder			
Hygiene of the udder skin	Hygiene score	1–4	[7,34,35]
Abnormalities in texture, condition, temperature	Palpation	Yes/No	[32]
Functionality of each udder quarter	Palpation	Intact/Blind	[32]
Sensory secretion examination			
Consistency of the milk secretion	Visual evaluation	NAD, a–f	[32]

Rumen filling score, 1—low, 3—moderate, 5—well; hygiene score, 1—free of dirt, 2—slightly dirty, 3—moderately covered with dirt, 4—covered with caked-on dirt; consistency of the secretion, NAD—no abnormality detected, a—retained milk character, watery consistency, without flocs, b—retained milk character, watery consistency, small flocs, c—retained milk character, a few large flocs, d—retained milk character with many large flocs, e—milk character mostly lost, predominantly flocs, f—milk character completely reversed, instead: purulence, blood, serum, fibrin flocs, mucus.

The rumen scoring system is a modified three-stage score to visually evaluate the rumen filling of the animals and as a result, the associated dry matter intake. The evaluation took place before milking in the morning with the examiner standing in a distro-lateral position to the cow. The used grading scheme is provided in Supplementary Table S1.

An udder examination was carried out for each animal [32]. Thereby, all udder quarters were visually examined and palpated, and a sensory examination of the quarter milk samples was conducted. During the visual examination, the hygiene of the udder and the lower leg was assessed by standing behind the cow using an udder hygiene scoring chart with a four-stage scoring scheme [7,34,35] presented in Supplementary Table S2. This tool allows macroscopic assessment regarding the degree of manure contamination of the examined cows. Animals with an udder hygiene score of “1” or “2” are considered “clean” and cows with a score of “3” or “4” are considered “dirty” [7]. The palpation consisted of an examination of the udder skin and the glandular body including the glandular cistern and the teats. First, each udder quarter was palpated superficially with both hands. Thereafter, each udder quarter was palpated deeply to assess the texture, condition, and temperature. For the macroscopic sensory examination of the milk, the first milk streams were milked into a pre-milking cup whereby the functionality of each quarter was checked. Qualitative variations such as color, smell, consistency, and additions in the quarter milk samples were examined. The classification was made according to the scheme in Supplementary Table S3.

2.4. Udder and Milk Sample Collection

Before the first milking in the morning, all samples from the udder and milk were collected. The order of sampling was chosen according to the sensitivity of the method: conventional quarter milk samples (CMS), swabs of the teat canal (MS), and milk from the gland cistern (MS). Before CMS were collected, teats were thoroughly cleaned and disinfected with 70% ethanol swipes. The first streams of milk were discarded. Thereafter, CMS were collected by manual milking into prepared tubes, which were set up by the company bovicare (bovicare GmbH, Bernau, Germany) according to the guidelines of the German Society of Veterinary Medicine (DVG) [9]. Afterward, the samples for 16S rRNA gene amplicon sequencing were collected. Tubes used for the collection were placed as far as possible from the milking stand to reduce contamination of the collection material. One person exclusively handled the sterile transfer of swab samples into tubes prefilled with 600 µL DNA Stool Stabilizer (Invitek Molecular GmbH, Berlin, Germany) and milk samples

into 50 mL Flacon Tubes (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Germany). To minimize contamination, gloves were disinfected with 70% ethanol after each step, and DNA Away was used (Molecular BioProducts Inc., San Diego, CA, USA). Another person collected the samples from the udder, whereby gloves were changed after every teat and disinfected with 70% ethanol before sample collection. First, the teat tips were again thoroughly cleaned with 70% ethanol swipes; thereafter, a sterile swab (2.3 mm × 150 mm; CLS Medizintechnik und Vertrieb, Krebeck, Germany) was used to collect the teat canal sample (TCS). The swab was moistened using a sterile 0.9% sodium chloride solution (B. Braun SE, Melsungen, Germany), and the tip was carefully inserted around 5 mm into the distal end of the teat canal and gently moved to sample the teat canal mucosa before removal. The swab was immediately placed in tubes (Eppendorf SE, Hamburg, Germany) prefilled with 600 µL DNA Stool Stabilizer (Invitex Molecular GmbH). Teat tips were again thoroughly cleaned with 70% ethanol and an atraumatic plastic milking tube (3.3 mm × 63 mm; Bovivet WDT eG, Garbsen, Germany) was inserted into each teat canal. By adapting a sterile 20 mL syringe via the Luer lock system to the milking tube, and 45 mL of milk was obtained from the gland cistern. The milk samples (MS) were thereafter transferred into sterile 50 mL Falcon tubes and flash-frozen on dry ice. All samples obtained for the 16S rRNA gene amplicon sequencing (i.e., TCS and MS) were stored on dry ice for transportation to the Chair of Bacteriology and Mycology of LMU Munich and stored at −20 °C until further sample processing. After sampling, the animals were routinely milked, and teats were dipped before leaving the milking parlor.

2.5. Conventional Bacteriological Culturing and Somatic Cell Count

The CMS were sent to a laboratory (bovicare GmbH) for bacteriological examination according to the guidelines of the DVG and for SCC determination. In short, milk samples were cultured on blood agar at 37 °C for 24–48 h as well as on a selective culture medium. The differentiation of the various mastitis pathogens was based on the morphology of the colonies, Gram staining, and the formation of hemolysis zones [9]. The SCC was counted using a fluorometric method with the Fossomatic 5000 (Foss GmbH, Hamburg, Germany). Based on the results of the bacteriological examination, “no abnormality detected (NAD)” and “aseptic” were summarized as “negative”.

2.6. Evaluation of the Condition of the Udder Health

Based on the results of the bacterial culturing and the SCC of the quarter CMS, the quarters were categorized according to the scheme in Table 2 [38].

Table 2. Evaluation of cytological and bacteriological results as part of mastitis categorization on the quarter level according to Fehlings et al. [38].

Quarter Level		Bacteriological Examination	
		Negative	Positive
SCC	≤ 100,000 cells/mL	normal secretion	latent infection
	> 100,000 cells/mL	unspecific mastitis	mastitis

SCC, somatic cell count.

Based on all the results collected, the animals were classified based on the previous cytological and bacteriological evaluation on the quarter level and their clinical signs. The classification resulted in their allocation as either healthy, displaying latent infection, subclinical mastitis, or acute clinical mastitis [38]:

- Healthy animals in terms of the udder displaying normal secretion. The udder quarters display no external pathological changes; the milk is free of pathogenic microorganisms (“negative”) and has a normal average cell count (≤ 100,000 cells/mL).
- In latent infection, pathogens are detected without an increase in the somatic cell count (≤ 100,000 cells/mL).

- Subclinical mastitis is described as an inflammation of the udder without externally visible clinical signs. However, the average SCC of the milk is increased (> 100,000 cells/mL) and mastitis pathogens can be detected.
- Animals with acute clinical mastitis display inflammation on the udder, such as increased temperature and swelling. The milk is macroscopically altered, and the animals often show fever. Mastitis pathogens and an increased SCC are detectable (> 100,000 cells/mL).

2.7. Data Analysis Scoring and CMS

The collection and processing of the raw data were performed using Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington). Further analyses such as the calculation of averages and medians were carried out using descriptive analyses in IBM SPSS Statistics Version 26 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany).

2.8. DNA Extraction—Teat Canal Sample

The 2.0 mL tubes containing TCS and 600 µL of DNA Stool Stabilizer (Invitex Molecular GmbH, Berlin, Germany) stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ were thawed at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tubes were then vortexed, and TCS swabs were transferred into a new 2.0 mL tube (Eppendorf SE, Hamburg, Germany). This tube containing only the TCS swab was then centrifuged at $10,000\times g$ for 10 s, and any fluid available thereafter was transferred to the tube containing the DNA Stool Stabilizer (Invitex Molecular GmbH). The sample was then mixed, and 100 µL of each TCS was transferred in a new 2.0 mL tube (Eppendorf SE) where all TCS samples from the four udder quarters (four udder quarter suspension, FUQS) of a single cow were pooled. This FUQS of the TCS was then transferred into 2.0 mL lysing matrix tube E (MP Biomedicals, Eschwege, Germany) and homogenized using the FastPrep-24™ device (MP Biomedicals) with three cycles of 6.5 m/s for 40 s, adding dry ice for every cycle. Afterward, 300 µL of Incubation Buffer (D920B-C, Promega GmbH, Walldorf, Germany), 200 µL of Lysis Buffer (included in AS1290, Promega GmbH), and 30 µL of Proteinase K (included in AS1290, Promega GmbH) were added. The tubes were then vortexed and centrifuged for 10 s at $10,000\times g$. Next, samples were incubated at $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 350 rpm for a minimum of two hours on the shaker. After two hours, 5 µL of 10 mg/mL RNase A (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was added, and the samples were incubated for another 20 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 350 rpm on a shaker. Thereafter, 300 µL of Lysis Buffer (Promega GmbH) was added to each sample, and the vortexing and centrifugation for 10 s at $10,000\times g$ were repeated. Similar to the TCS negative controls of the DNA stool stabilizer, 0.9% sodium chloride used to wet the swabs, 75 µL ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Germany) as a mock community (MC), and negative controls testing the reagents and cartridge of MaxWell 16 MDx (Promega GmbH) were extracted starting with the homogenization step in the FastPrep-24™ device (MP Biomedicals, Eschwege, Germany). A total of 700 µL of TCS and the negative controls were transferred to the MaxWell 16 LEV Blood DNA Kit cartridges (included in AS1290, Promega GmbH), and the automatized DNA purification was conducted using the Maxwell 16 MDx (Promega GmbH). The samples were eluted in 60 µL Elution Buffer (included in AS1290, Promega GmbH). Purified DNA content was measured using the BioPhotometer (D30, Eppendorf SE) and afterward stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. As measurements of milk and swab samples with the BioPhotometer displayed low DNA amounts, the DNA content was reevaluated using gel electrophoresis. Therefore, 5 µL of DNA from the samples was mixed with 2 µL of loading dye (Thermo Fisher Scientific Inc.). This mixture was then pipetted into the well of a 2% agarose gel. Five microliters of a 1 kB DNA Ladder (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany) was used as a control. An Owl Horizontal Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific Inc.) was used to perform agarose gel electrophoresis of nucleic acid (Thermo Fisher Scientific Inc.). The chamber was filled with 1X TAE buffer (pH: 8.5; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany). PowerPac Power

Supply (BioRad, Hercules, CA, USA) was applied to the chamber and run with 7.5 V/cm. Thereafter, a DNA gel electrophoresis image was taken using UVP GelStudio (Analytik Jena GmbH, Jena, Germany) with the UV light switched on. Finally, a total of 20 µL of extracted DNA was shipped to Eurofins Genomics (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Germany) where the sequencing of the 16S rRNA gene amplicons was conducted.

2.9. DNA Extraction—Cisternal Milk Samples

Cisternal MS with a content of 45 mL stored at -80°C were thawed overnight at 4°C . Samples were then prepared according to the protocol provided by Siebert et al. [39]. First, 3.0 mL 0.5 M EDTA and 2.0 mL TBE buffer were added to the CMS, which were mixed carefully. Thereafter, samples were centrifuged at $13,000\times g$ at 4°C for 20 min to divide the skim milk and milk fat fraction. The milk fat fraction was removed, and the skim milk was reduced to 1 mL by removing the supernatant and carefully mixed to resuspend the pellet. This suspension was then transferred into a 2.0 mL tube (Eppendorf SE, Hamburg, Germany) and centrifuged at $16,000\times g$ for one minute at room temperature. The supernatant was discarded until only 400 µL remained. A total of 100 µL was removed and transferred to a new 2.0 mL tube (Eppendorf SE). All udder quarters of one cow were then pooled to a volume of 400 µL. This FUQS was then transferred into a 2.0 mL lysing matrix tube E (MP Biomedicals) and homogenized using the FastPrep-24™ device (MP Biomedicals) as described for TCS. All further steps were conducted according to the TCS described above.

2.10. Bacterial 16S rRNA Gene Sequencing

Both samples (i.e., TCS and MS) were sequenced by Eurofins Genomics (Eurofins Genomics GmbH) by targeting the hypervariable V3/V4 region of the 16S rRNA gene (primers: 5'-CCT-ACG-GGN-GGC-WGC-AG-3' and 785R: 5'-GAC-TAC-HVG-GGT-ATC-TAA-TCC-3' [40]). The DNA concentration was reevaluated using a fluorometric method and a fragment analyzer at Eurofins Genomics GmbH. The final pool was sequenced on the Illumina MiSeq platform in paired-end mode (2×300 bp), using the MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

2.11. Data Analysis Microbiome Data

The 16S rRNA gene amplicon sequencing data were analyzed as described previously [41]. In short, the “Integrated Microbial Next-Generation Sequencing” (IMNGS) platform [42] based on UPARSE [43] was used to obtain both operational taxonomic units (OTUs) and denoised zero-radius operational taxonomic units (zOTUs) for different parts of the analysis. Both the OTU and zOTU tables are provided in Supplementary Tables S4 and S5. The taxonomy was refined using SILVA SSU 138.1 [44], EzBiocloud 2021.07.07 [45], and LPSN ([46] accessed on the 16.01.2023) according to the nomenclature provided by Oren and Garrity [47]. The sequences were realigned and phylogenetic trees were constructed anew using the neighbor-joining method available on the software MEGA 11.0.13 [48]. All downstream analyses were carried out using Rhea [49], a modular pipeline for the microbial profiling of 16S rRNA gene amplicon sequencing data, in an R programming environment (R 3.6.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) as already described [41]. Data were visualized using Illustrator CS6 version 16.0.0 (Adobe Inc., San José, CA, USA) and Prism (Graphpad Software Inc., Version 5, Boston, MA, USA).

3. Results

3.1. Reproduction and Production Parameters of the Cows

The average lactation number of the participating animals was 2.8 years. Their average amount of milk was 8928 kg/year, with an average SCC at the dry period of 139,600 cells/mL. Three of the eight cows started their dry period with a SCC above 100,000 cells/mL (Table 3). The eight cows were dried off with a teat sealant rather than an antibiotic dry-off.

Table 3. Overview of all data collected in the scoring and the cytological and bacteriological examination including the evaluation.

Cow-ID	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Average	Median
Reproduction and production parameters of the cows										
Number of lactation instances	2	2	3	4	2	5	2	2	2.8	2
Dry period in days	64	51	55	52	59	60	62	64	58.4	59.5
Average amount of milk from previous lactations in kg	9708	9978	8436	7975	9116	10,783	9943	5483	8928	9412
Results of the general examination										
Rectal temperature in °C	38.4	38.6	38.8	38.5	38.5	38.0	38.5	38.4	38.5	38.5
Breathing rate in breaths per minute	22	32	22	24	36	24	24	40	28	24
Rumen filling (“1”, “3”, or “5”)	3	3	3	1	3	1	3	3	3	3
Results of the further examination of the udder and the sensory secretion examination										
Hygiene of the udder skin (“1”–“4”)	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2
Abnormalities in texture, condition, temperature	Yes (Edema)	No	No	No	No	No	No	No		
Consistency of the secretion	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD		
Cytological and bacteriological results with an evaluation of the udder health										
SCC before drying off (in 1000 cells per mL)	125	16	57	43	34	611	69	162	139.6	63.0
SCC average on seven DIM (in 1000 cells per mL)	54	20	11	50	101	26	29	22	39.0	27.4
Examinations on the quarter level on seven DIM	FL	BC	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	CNS
		SCC	9	14	11	131	36	10	26	6
	FR	BC	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		SCC	32	21	13	10	237	15	38	30
	RR	BC	<i>S. uberis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-
		SCC	149	19	12	8	46	27	26	-
	RL	BC	neg	neg	neg	-	CNS	<i>C. bovis</i>	neg	neg
		SCC	27	24	9	-	84	50	27	29
Condition of the udder health (i.e., mastitis) *		subclinical	healthy	healthy	subclinical	subclinical, latent	latent	healthy	latent	

Bold letters display unphysiological results during the examination. * Classification according to Fehlings (2012) [38]. C1–C8, cows 1–8; Rumen filling score, 1—low, 3—moderate, 5—well; hygiene score, 1—free of dirt, 2—slightly dirty, 3—moderately covered with dirt, 4—covered with caked-on dirt; consistency of the secretion, NAD—no abnormality detected. DIM, days in milk; FL, front-left quarter; FR, front-right quarter; RR, rear-right quarter; RL, rear-left quarter; BC, results from the bacteriological culturing; SCC, somatic cell count; neg, negative; *S.*, *Streptococcus*; CNS, coagulase-negative *Staphylococcus* sp.; *C.*, *Corynebacterium* sp. Quarters without results (-) in the cytological and bacteriological examination were blind.

3.2. Scoring

The physiological parameters for respiration ranged between 24–36 breaths/min and the rectal body temperature ranged between 38.0–39.0 °C. In the general examination, no clinical signs were observed besides a slightly increased breathing rate of 40 breaths/minute for one cow. Two cows were scored with a rumen filling score of “1” and six cows with a rumen filling score of “3” (Table 3).

In the further examination, the udder contamination of the eight cows ranged between “1” and “2”; therefore, all animals’ udders were classified as clean. Two cows each had one non-intact udder quarter; therefore, no milk was collected from these quarters for further investigation. For one cow, an edema was observed in the palpation of the udder. Concerning the consistency of the milk secretion, “NAD” was scored for all cows (Table 3).

3.3. Conventional Bacteriological Culturing and Somatic Cell Count

In total, thirty quarters of eight animals were tested, as two quarters were not intact. Bacteriological results with “aseptic” and “NAD” were declared as negative in 26 of the 30 samples tested (86.7%). Under standard growth conditions, pathogens were detected in samples from four udder quarters of four cows and were identified as follows: Coagulase-negative *Staphylococcus* sp. (CNS; 6.7%), each in one quarter of two cows; *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*; 3.3%) in one udder quarter of one cow; and *Streptococcus uberis* (*S. uberis*; 3.3%) in the udder quarter of one cow (Table 3). Increased SCCs above 100,000 cells/mL were detected in three animals, of which one cow displayed a SCC above 200,000 cells/mL (Table 3). Of the udder quarters with bacteriological positive samples, only one was associated with an increased SCC in the same quarter. The cytological and bacteriological results on the udder quarter level are provided in Supplementary Table S6.

3.4. Evaluation of the Condition of the Udder Health

Three cows—C2, C3, and C7—were classified according to the previously formulated criteria as “healthy” cows with normal secretion. Three cows—C1, C4, and C5—were diagnosed with subclinical mastitis with an increased SCC of more than 100,000 cells/mL, lacking clinical signs. Two cows—C4 and C5—displayed unspecific mastitis in one quarter without the detection of a pathogen. Three cows—C5, C6, and C8—showed signs of a latent infection due to the detection of mastitis pathogens but without an increase in the somatic cell count. At the time of investigation, no cow showed any signs of acute clinical mastitis.

3.5. General Results of the 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing

The 16S rRNA gene amplicon sequencing provided results for cows C1, C5, C6, and the mock community (MC). In total, 267,308 sequences with an average of 46,051 sequences per sample (SD ± 22,411.5) were obtained. The OTU table (operational taxonomic unit, i.e., molecular species) contained 80 OTUs, and the zOTU table (zero-radius operational taxonomic units, i.e., molecular strains) contained 81 zOTUs. The raw sequencing reads and the rarefaction curves are provided in Supplementary Table S7 and Supplementary Figure S1, respectively. The DNA content in all samples was measured using a fragment analyzer at Eurofins (Eurofins Genomics GmbH; Table 4), and gel electrophoresis pictures are provided in Supplementary Figure S2.

The bacterial richness for all MS and TCS was below 100 bacterial species, and the effective richness displayed even lower amounts for all samples besides the CMS of Cow 5 (Figure 1).

3.5.1. Mock Community

As a mock community, the ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (Zymo Research Europe GmbH) was used, which contained the bacterial species *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Bacillus subtilis* and the two yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* according to the manufacturer. The DNA

content of the MC displayed the highest amount of DNA by far compared to all other samples (Table 4). It was furthermore the only sample that provided some form of a band on the agarose gels (Figure S2). α -diversity analysis displayed twelve bacterial species for richness and effective richness; however, several bacterial species were represented by two or more OTUs (Table 5). Altogether, genera from all bacterial species listed by the manufacturer were detected by 16S rRNA gene amplicon sequencing, while no contamination was detected (Table 5, Figure 2).

Table 4. DNA content in experimental samples.

Cow ID	Sample Type	DNA Content (ng/ μ L)
C1	MS	2.12
	TCS	0.44
C2	MS	0.05
	TCS	0.38
C3	MS	0.04
	TCS	0.31
C4	MS	0.10
	TCS	0.06
C5	MS	5.35
	TCS	2.22
C6	MS	1.34
	TCS	3.85
C7	MS	0.24
	TCS	0.25
C8	MS	0.16
	TCS	0.56
Mock sample		0.03
DNA stool stabilizer		0.02
Mock community		41.23
NaCl		0.59

C1–8, cow 1–8; MS, milk sample; TCS, teat canal sample.

Table 5. Bacterial species present in the mock community (MC) according to the manufacturer's specifications and obtained molecular species (OTU).

Bacterial Species	Representing OTUs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OTU11
<i>Escherichia coli</i>	OTU4
<i>Salmonella enterica</i>	OTU5
<i>Lactobacillus fermentum</i>	OTU8
<i>Enterococcus faecalis</i>	OTU9
<i>Staphylococcus aureus</i>	OTU2, OTU645, OTU417
<i>Listeria monocytogenes</i>	OTU6
<i>Bacillus subtilis</i>	OTU3, OTU787, OTU462

3.5.2. Negative Controls

The negative controls from the NaCl used to wet the swabs for the TCS, the DNA Stool Stabilizer (Invitek Molecular GmbH) used to stabilize the DNA from TCS, and the mock sample testing the contamination of sampling in the milking parlor during sampling all contained only minimal amounts of DNA (Table 4, Figure S2); thus, library preparation and sequencing were not possible.

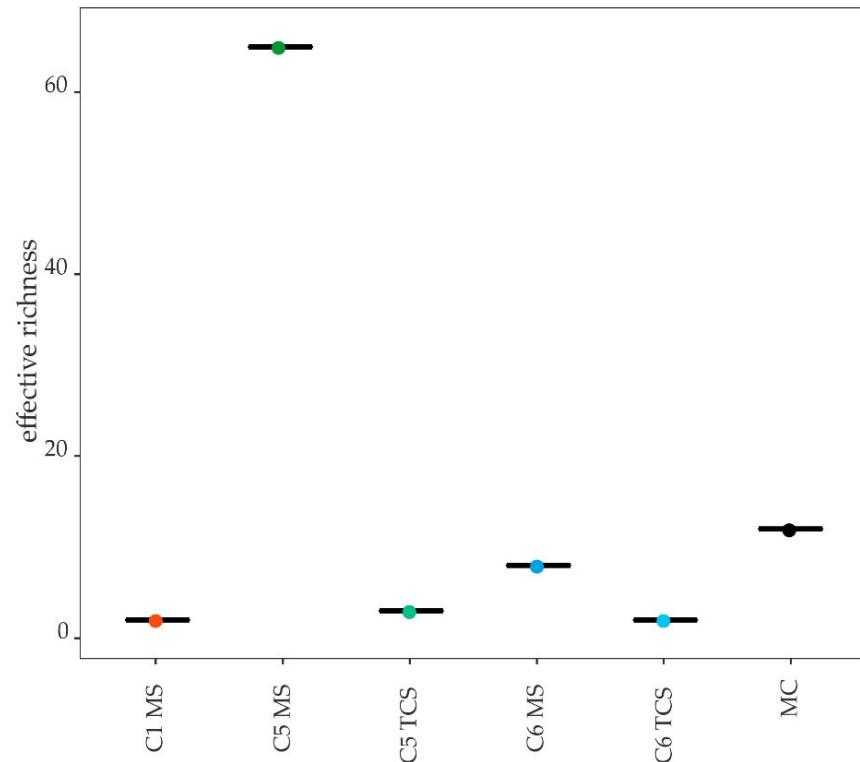
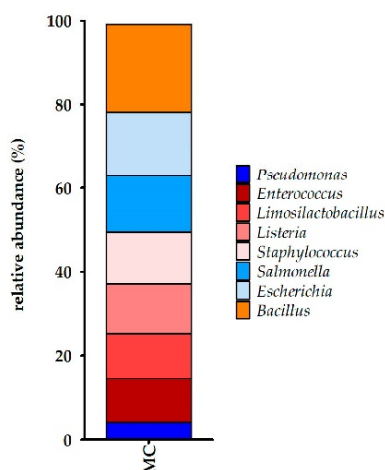


Figure 1. α -diversity shown as effective richness between different sample types and cows. C1, C5, C6, cows 1, 5, 6; MS, milk sample; TCS, teat canal sample; MC, mock community.

(A) Genus



(B) Molecular strain (zOTU)

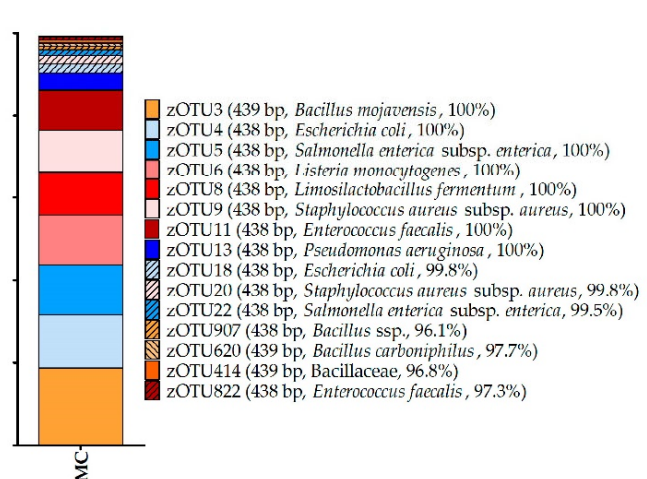


Figure 2. (A) Bacterial genera and (B) molecular strains obtained from 16S rRNA gene amplicon sequencing of the MC. zOTUs were identified by EzBioCloud [45]; the sequence length, the closest relative taxon, and the sequence similarity score of zOTUs are shown in the order of appearance. MC, mock community; zOTU, zero-radius operational taxonomic unit; bp, base pairs.

3.6. Condition of the Udder—Healthy

For C2, C3, and C8, neither the MS nor the TCS provided DNA amounts sufficient to produce a library and allow 16S rRNA gene amplicon sequencing (Table 4). This low amount of DNA agreed with the negative results of the bacterial culture.

3.7. Condition of the Udder—Latent

Cow 5 is represented in both the subclinical and the latent group, and the results from the microbiome analysis are presented under Section 3.8.

The 16S rRNA gene amplicon sequencing was possible for both the MS and TCS for Cow 6. The bacterial richness was similar for both MS and TCS with 35 and 31 bacterial species, respectively. The effective richness was higher in MS (eight effective species) than in TCS (two effective species; Figure 1). The evenness for both sample types was below 0.1 for Cow 6; consequently, this sample was dominated by one or a few bacterial species. This becomes obvious when examining the genus and molecular strain composition of this cow's MS and TCS (Figure 3).

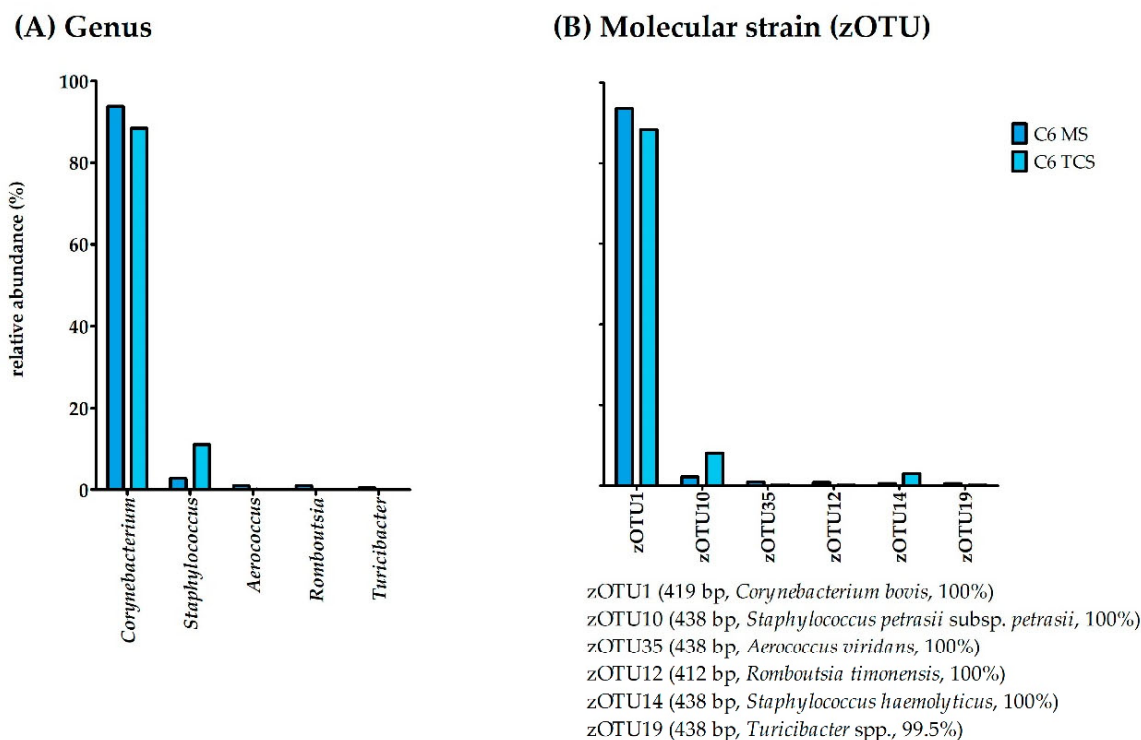


Figure 3. Relative abundance (%) of (A) bacterial species and (B) molecular strains for Cow 6 for MS and TCS. zOTUs were identified by EzBioCloud [45]; the sequence length, the closest relative taxon, and the sequence similarity score of zOTUs are shown in the order of appearance. MS, milk samples; TCS, teat canal samples; zOTU, zero-radius operational taxonomic unit; bp, base pairs.

As detected in the bacterial culture, both the MS and TCS were dominated by the genus *Corynebacterium* and the molecular strain zOTU1 (*Corynebacterium bovis*, 100% similarity). However, the 16S rRNA gene amplicon sequencing detected further molecular strains with lower abundances (Figure 3A), of which zOTU10 (*Staphylococcus petrasii* subsp. *petrasii*, similarity 100%) displayed abundances of 2.2% in MS and 8.1% in TCS (Figure 3B).

The MS and TCS samples from Cow 8 displayed low DNA amounts of 0.16 ng/ μ L and 0.56 ng/ μ L (Table 4), respectively. As described for the samples with low DNA amounts

above, library preparation and thus sequencing was not successful for the MS and TCS of Cow 8. However, in the bacterial culture, CNS was detected with a very low SCC of 6000 cells/mL.

3.8. Condition of the Udder—Subclinical

The DNA content of the Cow 1 samples was 2.12 ng/ μ L for the MS and 0.44 ng/ μ L for the TCS (Table 4). Consequently, it was not possible to obtain sequencing results from the TCS. However, results for MS were available. α -diversity analysis displayed a richness of eleven bacterial species and an effective richness of two bacterial species (Figure 1). With an evenness of under 0.1 (i.e., 0.03), this CMS was again dominated by one molecular species (Figure 4).

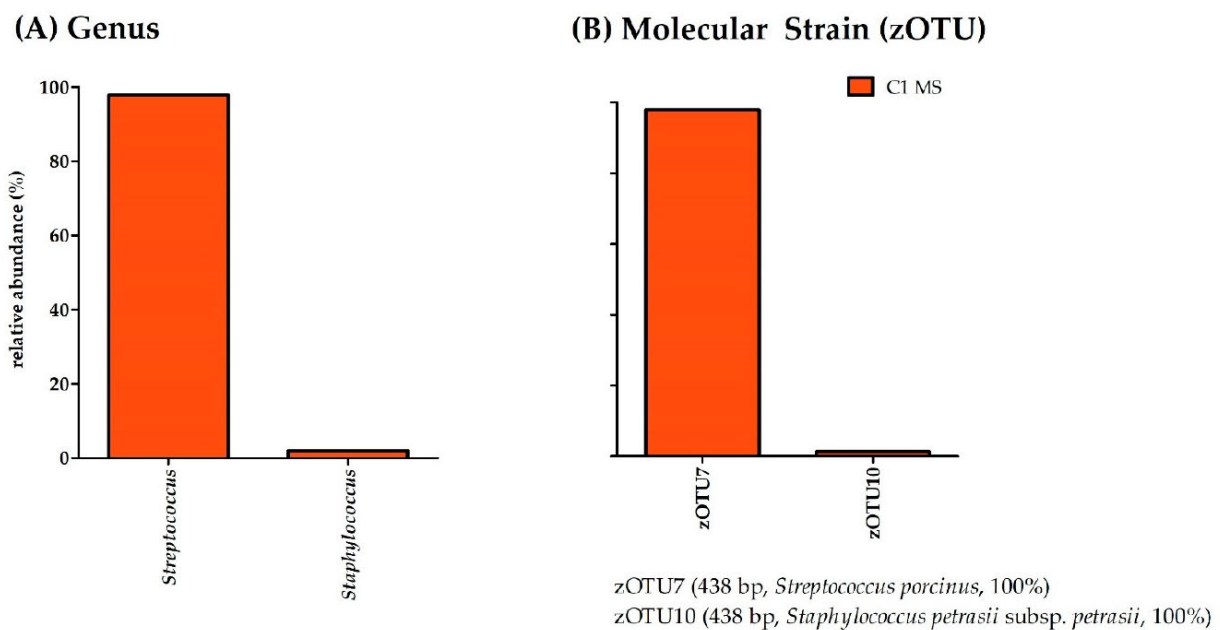


Figure 4. Relative abundance (%) of (A) bacterial species and (B) molecular strains for Cow 1 MS. zOTUs were identified by EzBioCloud [45]; the sequence length, the closest relative taxon, and the sequence similarity score of zOTUs are shown in the order of appearance. MS, milk sample; zOTU, zero-radius operational taxonomic unit; bp, base pairs.

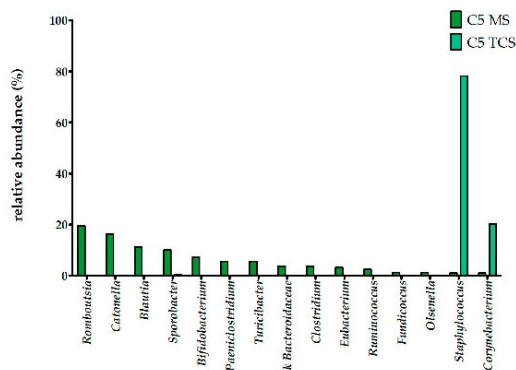
According to the results of the bacterial culture, the MS of Cow 1 was dominated by the genus *Streptococcus*. However, unlike the results from the bacterial culture (i.e., *Streptococcus uberis*), the molecular strain dominating this sample (i.e., zOTU7) was 100% similar to *Streptococcus porcinus* (*Strep. porcinus*). With a relative abundance of over 1.0%, the molecular strain zOTU10 (*Staphylococcus petrasii* subsp. *petrasii* (*Strep. petrasii*), similarity 100%) was further detectable by molecular analysis.

In the MS and TCS from Cow 4, we measured a DNA content of 0.1 ng/ μ L and 0.06 ng/ μ L, respectively (Table 4). As described above, library preparation and thus 16S rRNA gene amplicon sequencing were not successful for these samples. This low amount of DNA agreed with the negative results of the bacterial culture, even if the SCC was increased.

Both the MS and TCS of Cow 5 contained enough DNA for conducting 16S rRNA gene amplicon sequencing (Table 4). The bacterial richness in the MS displayed seventy bacterial species and sixty-five effective species, while the TCS displayed fifty-nine bacterial species and three effective species (Figure 1). The evenness was 0.59 for the MS and 0.13 for the TCS; thus, these samples had a wider distribution of species compared to those of Cow 1

and Cow 6. The results of the bacterial culture displayed coagulase-negative *Staphylococcus* sp. In the MS, we observed, unlike in all other MS, a wide variety of bacterial species with a relative abundance below 20% (Figure 5A). Interestingly, these molecular strains are species that are known to inhabit feces. Thus, it is likely that these findings represent contamination. Fitting to this assumption, the TCS from Cow 5 did not display this wide variety of species, but rather the culture-detected *Staphylococcus* genus. In the TCS samples, the genus *Staphylococcus* is represented by zOTU2 (*Staphylococcus xylosus*, similarity 100%; Figure 5B). As in all other sequencing results, we additionally found another molecular strain with a higher abundance, in this case, *Corynebacterium bovis* (zOTU1, similarity 100%; Figure 5B).

(A) Genus



zOTU12 (412 bp, *Romboutsia timonensis*, 100%)
 zOTU15 (430 bp, *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*, 100%)
 zOTU16 (412 bp, *Eubacterium tenue*, 100%)
 zOTU17 (427 bp, *Catonella* spp., 90.3%)
 zOTU19 (438 bp, *Turicibacter* spp., 99.5%)
 zOTU21 (413 bp, *Blautia* spp., 99.3%)
 zOTU23 (413 bp, *Clostridium celatum*, 100%)
 zOTU26 (416 bp, *Sporobacter* spp., 99.3%)
 zOTU29 (427 bp, *Catonella* spp., 99.5%)
 zOTU25 (412 bp, *Romboutsia hominis*, 99.3%)
 zOTU24 (412 bp, *Romboutsia weinsteini*, 100%)
 zOTU28 (413 bp, *Blautia* spp., 99.8%)
 zOTU27 (416 bp, *Eubacterium* spp., 100%)
 zOTU31 (414 bp, *Ruminococcus* spp., 99.5%)
 zOTU55 (416 bp, *Sporobacter* spp., 98.3%)
 zOTU34 (413 bp, *Blautia* spp., 99.7%)
 zOTU36 (416 bp, *Sporobacter* spp., 99.6%)
 zOTU38 (438 bp, *Fundicoccus ignaeus*, 99.1%)
 zOTU32 (419 bp, *Olsenella* spp., 97.6%)
 zOTU2 (438 bp, *Staphylococcus xylosus*, 100%)
 zOTU37 (416 bp, *Sporobacter* spp., 100%)
 zOTU43 (416 bp, *Eubacterium* spp., 100%)
 zOTU42 (427 bp, *Catonella* spp., 99.1%)
 zOTU48 (427 bp, *Catonella* spp., 100%)
 zOTU1 (419 bp, *Corynebacterium bovis*, 100%)

(B) Molecular strain (zOTU)

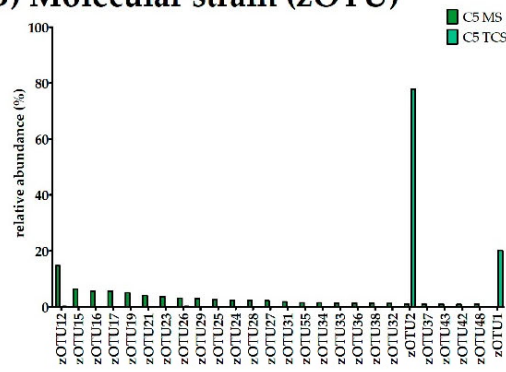


Figure 5. Relative abundance (%) of (A) bacterial species and (B) molecular strains for Cow 6 MS and TCS. zOTUs were identified by EzBioCloud [45]; the sequence length, the closest relative taxon, and the sequence similarity score of zOTUs are shown in the order of appearance. MS, milk samples; TCS, teat canal samples; zOTU, zero-radius operational taxonomic unit; bp, base pairs.

4. Discussion

The general analysis and the further examination of the udder have provided information on the cows' health conditions. Only a few animals showed minor deviations from the reference parameters (Table 3), and no cow showed signs of clinical mastitis in the general and specific udder examinations, which would have excluded them from the study. Thus, the sampling of CMS as well as MS and TCS for 16S rRNA gene amplicon sequencing was performed. The results of the cytological and bacteriological examination displayed subclinical or latent mastitis for cows C1, C4, C5, C6, and C8. As all sampled cows were in the periparturient period and the immune system can be compromised during this

time [21], the slight clinical signs in some animals were not surprising. In most animals, the rumen filling was scored as “3”. The rumen of two animals was less filled with a score of “1”. A low rumen filling shortly after the calving can indicate typical diseases of the early puerperium, such as mastitis or metritis [33]. The two cows with a low rumen filling score (i.e., “1”) were diagnosed with either subclinical or latent mastitis retrospectively but displayed no signs of acute clinical mastitis. Consequently, the rumen filling score might be a useful tool to detect early post-puerperal mastitis, and further examinations should be initiated before clinical signs occur. However, continuing investigation of this parameter is necessary in the future. In the further examination of the udder, all eight cows showed an udder hygiene score between “1” and “2”; thus, the udders of the animals could be described as clean [7]. Dirty udders can lead to a higher SCC and an increased risk of intramammary infection [50]. The low degree of contamination according to the udder hygiene scores correlates with the low SCC of the eight examined cows with an average of 39,000 cells/mL on the day of examination. Unfortunately, hygiene scoring of the udder has not been included in any microbiome study yet. Since the teat skin is a possible pathway for bacteria to enter the udder, variations in the composition of the bacterial community on the skin and teat cistern of dirty and clean udders should be investigated [21].

Hereafter, insights into the bacterial community of the udder using both conventional bacterial culturing as well as 16S rRNA gene amplicon sequencing are discussed. It is important to note that the authors did not expect a bacterial community in the udder of healthy cows according to the reasons discussed by Rainard et al. [19]. Therefore, methods were used to allow the maximum capture of eventual bacterial organisms in the udder, and negative controls were provided for every step. One of these methods was the pooling of the samples on the quarter level to gain enough bacterial DNA, as sequencing is not always possible and reasonable for samples with low DNA contents. Negative controls were sampled in several steps to identify possible contaminations. This is especially important in samples where low biomass is expected, as contaminations during sampling and DNA extraction provide results that rather describe the microbiome of contaminants [30]. Unfortunately, this has not been conducted for most published bovine milk microbiota studies so far [17]. The most obvious step to reduce contamination is rigorous cleaning and disinfection to reduce contamination. In this study, even though a high effort was made to work cleanly and disinfection, one MS of Cow 5 was most likely contaminated with fecal organisms. Interestingly, some of these intestine-associated bacterial species (e.g., *Ruminococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *Clostridium* spp.) found in the contaminated sample are similar to some major taxa described by Oikonomou et al. [17] in their review about bovine milk microbiota. This suggests that the composition of bovine milk microbiota is strongly influenced by feces and probably does not reflect a natural community inside the mammary gland. As the bovines tend to defecate in the milking parlor, this sort of contamination cannot be ruled out and should be expected and presented as such. Nevertheless, besides this one sample, all other samples ($n = 16$) did not display any signs of contamination, and the strict hygiene management of this study allows the use of next-generation sequencing techniques even in a stable environment. As the low amount of DNA found in many samples might originate from problems during DNA extraction, a mock community was used to prove the successful extraction of DNA from bacteria that can be expected in an udder. In this work, we used the ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (Zymo Research Europe GmbH). The extraction of all bacterial species in the mock community was successful (Figure 2); nonetheless, separation on the molecular strain level occurred, as described previously [51]. In general, it should be noted that different studies based on 16S rRNA gene amplicon sequencing are comparable to a limited extent due to the differences in sampling and sample management (e.g., DNA extraction or sequencing of different hypervariable regions) [17]. In this study, much information regarding host, environment, and management practices was provided to avoid possible misleading conclusions about the microbial origin and for a better comparison with other studies [20]. It should be further noted that this study was a preliminary test of

methods to examine if we are able to find bacteria that might be members of a microbiome. Only eight clinically healthy cows were monitored by general and further specific udder examination. It would be preferable to obtain a better understanding of the SCC and CMS bacterial content before 16S rRNA gene amplicon sequencing; however, to the best of our knowledge, no such examination exists that would allow the simultaneous probing of bacterial culture and sequencing of the 16S rRNA gene amplicons from only healthy cows. Thus, it is vital to examine the existence of an udder microbiome in healthy cows using a larger study population and sampling during different phases of lactation. The planning and implementation of this study were based on conditions in practice to not only be of scientific use, but also to examine whether next-generation sequencing is applicable in a field environment and allows veterinarians a deeper insight into udder health. This study did not provide hints at the presence of a microbiome in healthy udders, while the results of CC-positive milk samples correspond to the bacterial genera and species present in the udders of cows with subclinical and latent mastitis. The cultured bacteria were always close to the top zOTUs found by sequencing in other studies, as well [52,53]. However, in addition to the bacteria detected in the culture, an additional bacterium with a lower relative abundance was discovered by sequencing. Furthermore, almost all mentioned bacteria found are potential mastitis pathogens with various levels of virulence. Some researchers believe that the detection of DNA from several types of bacteria is indicative of mastitis representing a multi-agent disease rather than being caused by a single pathogen [52,54]. Based on the results of this study, this hypothesis is not a sound basis to explain all findings. In the udders of conspicuous animals, not a multitude of bacteria was found, but mostly two zOTUs with a relative abundance that marked these bacteria as somewhat significant in a clinical context. Generally, mastitis-causing agents can be classified according to their origin. In addition, they can be divided into major and minor pathogens according to their prevalence and the severity of clinical signs [55]. *Staph. petrasii*, belonging to the coagulase-negative staphylococci (CNS), can be categorized as a minor pathogen [56]. However, to our knowledge, this pathogen has not yet been described as a mastitis-causing pathogen in cows. Before an infection with CNS, predisposing factors affecting the immune system make the udder susceptible [7]. CNS as well as *C. bovis* are found on the udder's skin, but *C. bovis* especially has been isolated from the teat canal [7]. *C. bovis* is a minor mastitis-causing pathogen and is associated with the mammary gland. The actual origin of *C. bovis* (i.e., from milk or the teat canal) is not clear in this study, as the milk passes through the teat canal during manual sampling, and therefore, "contamination" rather than an intramammary infection is more likely [57]. According to our results from 16S rRNA gene amplicon sequencing, the bacterium was isolated in the teat canal as well as in the sample from the gland cistern, which may be an indication of emerging colonization from the teat canal. Nevertheless, the results from the MS of Cow 6 should be interpreted with caution due to the sampling method via milking tube, as a spread of *C. bovis* from the teat canal to the gland cistern cannot be excluded. In contrast, *S. uberis* is a major mastitis-causing pathogen originating mostly from the environment [55]. The general opinion about *S. uberis* as a causative agent strictly associated with the environment is debatable, and transmissions between cows can be an optional pathway for spreading [58,59]. *S. uberis* was detected in the bacterial culture from Cow 1. This finding is consistent with the results of the sequencing of the MS (i.e., *S. porcinus*). Both pathogenic species originate from the genus *Streptococcus* of the family Streptococcaceae and display a close genetic relationship [60]. Therefore, they hardly differ in terms of pathogenicity [61]. The different results from both investigations play a minor role regarding the consequences of treatment. Nevertheless, as only the V3/V4 region of the 16S rRNA gene has been sequenced, the molecular strain from 16S rRNA gene amplicon sequencing is based on the similarity of a small part of the DNA and should thus be interpreted with caution, and CC might not be able to identify the exact species. As described above, most pathogens of the genus *Streptococcus* derive from the environment, including the animals' habitats, such as in peat or straw used as bedding material [55]. According to Metzger et al. [25], the bedding material affects the milk microbiomes even if

the milk is collected directly from the gland cistern. The animals in the described study were kept on straw and showed different OTUs compared to frequently isolated OTUs (i.e., *Janthinobacterium* spp., *Enhydrobacter* spp., and Rhodocyclaceae.) from cows lying on sand, manure solids, or sawdust [25]. Contrarily, the bedding material and environment did not result in a bacterial community in the udder of cows in this study. Derakhashani et al. [21] note a lack and need for knowledge regarding the potential influence of current managerial practices according to the ten-point mastitis control program on the overall composition of the udder microbiota. There are only a couple of studies addressing this issue; studies on antibiotic drying-off and its possible influence on the milk microbiome already exist [29,62]. On the treatment of mastitis with antibiotics, only studies with *E. coli* as a mastitis pathogen are available [63,64]. Based on the results of the presented study, it would be interesting to observe the changes in sequencing results after the antibiotic treatment of the udder to investigate the elimination of bacteria. Furthermore, most of the animals in our study did not have a single-pathogen infection, and the behavior of the second pathogen after the treatment might give interesting insights into mastitis incidence. The pathogens could either be eliminated by the antibiotic treatment or, if resistant to the used antibiotic agent, this might even stimulate the growth of the second most abundant pathogen that is only detectable by sequencing and might lead to chronic mastitis that is seemingly resistant to its antibiotic therapy. Consequently, the antibiotic treatment would have eliminated one pathogen but, at the same time, prepare the way for the infection with the other pathogen.

The lack of a bacterial community in the udder of previously declared healthy cows has already been described [15,17,25]. Therefore, this study supports the assessment that there is no natural bacterial community in the healthy udder. Samples extracted directly from the gland cistern via needle incision through the udder skin display low DNA amounts, which might be associated with the cleanliness of the method [20]. Sampling directly from the gland cistern by using a needle and vacuum tube is an invasive method that requires sedation and rigorous cleaning and is therefore not suitable for routine clinical work [20]. A less invasive method using a milking tube was used for this study. This method allows sampling from the gland cistern and is less prone to contamination from the teat apex and skin compared to manual milk sampling. The method is similar to that of Friman et al. [26] or the sampling described by Vangroenweghe et al. [65]. In our work, the extraction of milk after disinfection using a milking tube resulted in a low amount of contamination while the cow's acceptance was high, as most cows are accustomed to milking tubes during mastitis treatment and dry-off. In conclusion, this method is fitting for the extraction of cisternal milk samples, even for veterinary use.

Due to its high sensitivity and decreasing costs, sequencing is increasingly used in examining udder health. Furthermore, the inclusion of sequencing techniques in the remediation of troubled dairy herds would be beneficial. More advanced techniques such as metagenomic or whole-genome sequencing might allow the exact identification of the pathogen on the species level and might, in combination with the analysis of comparative samples from the stable (e.g., bedding, milking system, or staff), give insight into the disease incidence and pathogen origin.

5. Conclusions

Considering the results at the cow level, the following general conclusions can be drawn from this study. No evidence of a microbiome in the healthy udder was found in this study. This does not refer to the animals, which were conspicuous in the cytological and bacteriological examination. Here, a "bacterial community" was found, but this community consisted of only two pathogens with an abundance of higher than 1.0%, which indicates a mixed infection of the udder. The results from the CC agree mostly with the results from the molecular examination. Nonetheless, 16S rRNA gene amplicon sequencing was able to generate even more detailed insight. Consequently, next-generation sequencing might be a helpful method to understand the complexity of mastitis incidence as well as the origin of the pathogen and might thus help to eliminate possible infection sources. Additionally,

this method can be used in a field environment when contamination is avoided and teats are disinfected rigorously. Researchers and clinicians should keep in mind that sequencing methods are highly sensitive and negative controls are always needed. Furthermore, the results should be questioned critically to avoid errors arising from environmental contaminations and should be interpreted in relation to the clinical parameters and the conventional culturing technique.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11051311/s1>, Table S1: Evaluation of rumen filling using a visual three-stage scoring system according to Donat et al. (2020) [33], modified by Zaajer und Noordhuizen (2003) [37] and Götze et al. (2019) [36]; Table S2: Udder hygiene scoring of the udder and lower leg according to Winter et al. (2009) [7], Schreiner and Ruegg (2002) [34], and Cook and Reinemann (2007) [35]; Table S3: Consistency of the secret modified according to Dirksen et al. (1998) [32]; Table S4: Obtained operational taxonomic units (OTUs); Table S5: Obtained zero-radius operational-taxonomic units (zOTUs); Table S6: Results of the cytological and bacteriological evaluation on quarter level ($n = 30$) categorized according to Fehlings et al. (2012) [38]; Table S7: Raw and denoised read stats; Figure S1: Rarefaction Curves; Figure S2: Gel electrophoresis pictures of all samples' DNA content ($n = 12$) from (A) TCS and (B) MS.

Author Contributions: Conceptualization, V.R., J.W., R.K.S., E.R. and E.Z.; methodology, V.R., J.W. and A.W.; software, V.R. and J.W.; formal analysis, V.R. and J.W.; investigation, V.R., J.W. and A.W.; resources, E.Z.; data curation, V.R., J.W. and F.V.; writing—original draft preparation, V.R.; writing—review and editing, J.W., R.K.S., E.R. and E.Z.; visualization, J.W.; supervision, E.Z.; project administration, E.Z.; funding acquisition, E.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The first author and the research were supported with funds provided by AHV International, Zwolle, Netherlands. The funders had no role in the study design, data collection, analysis, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved on the 18th of July 2022 by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of LMU Munich with the reference number 309-16-05-2022.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are only available in the Sequence Read Archive under the reference number PRJNA956443.

Acknowledgments: The authors would like to thank the farm manager and herd manager for their participation in this work and for their understanding when the work routine was blocked by sampling. Further, the support of herd veterinarian of the Tierarztpraxis Freising-Pulling was highly appreciated, as was the aid from Johanna Fink-Gremmels by providing inspiration regarding new examination methods and their consequences for udder health outcomes. Lastly, we would like to thank Ilias Lagkouvardos for his continuous help and insightful discussions regarding the 16S rRNA gene amplicon data.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kemp, M.H.; Nolan, A.M.; Cripps, P.J.; Fitzpatrick, J.L. Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. *Vet. Rec.* **2008**, *163*, 175–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Barbano, D.M.; Ma, Y.; Santos, M.V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89* (Suppl. S1), E15–E19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. van Schaik, G.; Lotem, M.; Schukken, Y.H. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999–2000. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 782–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hogeveen, H.; Huijps, K.; Lam, T.J.G.M. Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.* **2011**, *59*, 16–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sordillo, L.M.; Nickerson, S.C. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.* **1988**, *49*, 1112–1120.
6. Bradley, A.J.; Green, M.J. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pr.* **2004**, *20*, 547–568. [[CrossRef](#)]

7. Winter, P.M.; Burvenich, C.; Hogeveen, H.; Nijenhuis, F.; Dem Rasmussen, M.; Schweigert, F.J.; Spiegelcer, B.; de Zehle, H.H. *Praktischer Leitfaden Mastitis: Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand*; Parey: Stuttgart, Germany, 2009; ISBN 9783830441687.
8. Constable, P.D.; Pyörälä, S.; Smith, G.W. Guidelines for Antimicrobial Use in Cattle. In *Guide to Antimicrobial Use in Animals*; Guardabassi, L., Jensen, L.B., Kruse, H., Eds.; Blackwell Pub: Oxford, UK; Ames, IA, USA, 2008; pp. 143–160, ISBN 9781405150798.
9. Fehlings, K.; Zschöck, M.; Baumgärtner, B.; Geringer, M.; Hamann, J.; Knappstein, K. *Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern*, 3rd ed.; Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V: Gießen, Germany, 2009; ISBN 9783941703223.
10. Hitch, T.C.A.; Riedel, T.; Oren, A.; Overmann, J.; Lawley, T.D.; Clavel, T. Automated analysis of genomic sequences facilitates high-throughput and comprehensive description of bacteria. *ISME Commun.* **2021**, *1*, 16. [[CrossRef](#)]
11. Almeida, A.; Nayfach, S.; Boland, M.; Strozzi, F.; Beracochea, M.; Shi, Z.J.; Pollard, K.S.; Sakharova, E.; Parks, D.H.; Hugenholtz, P.; et al. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 105–114. [[CrossRef](#)]
12. Nyman, A.-K.; Persson Waller, K.; Emanuelson, U.; Frössling, J. Sensitivity and specificity of PCR analysis and bacteriological culture of milk samples for identification of intramammary infections in dairy cows using latent class analysis. *Prev. Vet. Med.* **2016**, *135*, 123–131. [[CrossRef](#)]
13. Taponen, S.; Salmikivi, L.; Simojoki, H.; Koskinen, M.T.; Pyörälä, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 2610–2617. [[CrossRef](#)]
14. Gillespie, B.E.; Oliver, S.P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 3510–3518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Koskinen, M.T.; Holopainen, J.; Pyörälä, S.; Bredbacka, P.; Pitkälä, A.; Barkema, H.W.; Bexiga, R.; Roberson, J.; Sølvørød, L.; Piccinini, R.; et al. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 952–959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Paradis, M.-È.; Haine, D.; Gillespie, B.; Oliver, S.P.; Messier, S.; Comeau, J.; Scholl, D.T. Bayesian estimation of the diagnostic accuracy of a multiplex real-time PCR assay and bacteriological culture for four common bovine intramammary pathogens. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 6436–6448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Oikonomou, G.; Addis, M.F.; Chassard, C.; Nader-Macias, M.E.F.; Grant, I.; Delbès, C.; Bogno, C.I.; Le Loir, Y.; Even, S. Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Whipps, J.; Lewis, K.; Cooke, R. Mycoparasitism and plant disease control. In *Fungi in Biological Control Systems*; Burge, M., Ed.; Manchester University Press: Manchester, UK, 1988; pp. 161–187.
19. Rainard, P. Mammary microbiota of dairy ruminants: Fact or fiction? *Vet. Res.* **2017**, *48*, 25. [[CrossRef](#)]
20. Metzger, S.A.; Hernandez, L.L.; Suen, G.; Ruegg, P.L. Understanding the Milk Microbiota. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pr.* **2018**, *34*, 427–438. [[CrossRef](#)]
21. Derakhshani, H.; Fehr, K.B.; Sepehri, S.; Francoz, D.; de Buck, J.; Barkema, H.W.; Plaizier, J.C.; Khafipour, E. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 10605–10625. [[CrossRef](#)]
22. Addis, M.F.; Tanca, A.; Uzzau, S.; Oikonomou, G.; Bicalho, R.C.; Moroni, P. The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from -omics studies. *Mol. Biosyst.* **2016**, *12*, 2359–2372. [[CrossRef](#)]
23. Taponen, S.; McGuinness, D.; Hiitö, H.; Simojoki, H.; Zadoks, R.; Pyörälä, S. Bovine milk microbiome: A more complex issue than expected. *Vet. Res.* **2019**, *50*, 44. [[CrossRef](#)]
24. Hiitö, H.; Simojoki, H.; Kalmus, P.; Holopainen, J.; Pyörälä, S.; Taponen, S. The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 6532–6541. [[CrossRef](#)]
25. Metzger, S.A.; Hernandez, L.L.; Skarlupka, J.H.; Suen, G.; Walker, T.M.; Ruegg, P.L. Influence of sampling technique and bedding type on the milk microbiota: Results of a pilot study. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 6346–6356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Friman, M.; Hiitö, H.; Niemi, M.; Holopainen, J.; Pyörälä, S.; Simojoki, H. The effect of a cannula milk sampling technique on the microbiological diagnosis of bovine mastitis. *Vet. J.* **2017**, *226*, 57–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Gill, J.J.; Sabour, P.M.; Gong, J.; Yu, H.; Leslie, K.E.; Griffiths, M.W. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *56*, 471–481. [[CrossRef](#)]
28. Falentin, H.; Rault, L.; Nicolas, A.; Bouchard, D.S.; Lassalas, J.; Lamberton, P.; Aubry, J.-M.; Marnet, P.-G.; Le Loir, Y.; Even, S. Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 480. [[CrossRef](#)]
29. Derakhshani, H.; Plaizier, J.C.; de Buck, J.; Barkema, H.W.; Khafipour, E. Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 10191–10205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kennedy, K.M.; de Goffau, M.C.; Perez-Muñoz, M.E.; Arrieta, M.-C.; Bäckhed, F.; Bork, P.; Braun, T.; Bushman, F.D.; Dore, J.; de Vos, W.M.; et al. Questioning the fetal microbiome illustrates pitfalls of low-biomass microbial studies. *Nature* **2023**, *613*, 639–649. [[CrossRef](#)]

31. Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M.-C.C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Corral, G.H.; et al. Correction to: Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome* **2020**, *8*, 119. [[CrossRef](#)]
32. Dirksen, G.; Gründer, H.-D.; Stöber, M. *Die klinische Untersuchung des Rindes*, 3rd ed.; Neubearb. u. erw. Aufl.; Parey: Berlin/Heidelberg, Germany, 1998; ISBN 3-489-56516-9.
33. Donat, K.; Gärtner, T.; Gernand, E. Pansenfüllung ante partum: Ein Parameter mit prognostischem Wert für Krankheiten und Leistungen in der Folgelaktation. In Proceedings of the bpT—Kongress DIGITAL 2020, Germany, 19 November 2020.
34. Schreiner, D.A.; Ruegg, P.L. Effects of Tail Docking on Milk Quality and Cow Cleanliness. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 2503–2511. [[CrossRef](#)]
35. Cook, N.; Reinemann, D.A. Tool Box for Assessing Cow, Udder and Teat Hygiene. In Proceedings of the 46th Annual Meeting National Mastitis Council, San Antonio, TX, USA, 21–24 January 2007; pp. 31–43.
36. Götze, K.; Crivellaro, P.; Pieper, L.; Engelhard, T.; Staufenbiel, R. Bewertung der Pansenfüllung von Milchkühen zur Beurteilung der individuellen Futteraufnahme in der Bestandsbetreuung. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* **2019**, *47*, 5–13. [[CrossRef](#)]
37. Zaaijer, D.; Noordhuizen, J. A novel scoring system for monitoring the relationship between nutritional efficiency and fertility in dairy cows. *Ir. Vet. J.* **2003**, *56*, 145–152.
38. Fehlings, K.; Hamann, J.; Klawonn, W.; Knappstein, K.; Mansfeld, R.; Wittkowski, G.; Zschöck, M. *Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem: Leitlinien*, 5th ed.; überarb. Aufl.; DVG: Gießen, Germany, 2012; ISBN 9783863450748.
39. Siebert, A.; Hofmann, K.; Staib, L.; Doll, E.V.; Scherer, S.; Wenning, M. Amplicon-sequencing of raw milk microbiota: Impact of DNA extraction and library-PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 4761–4773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic. Acids Res.* **2013**, *41*, e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wiesinger, A.; Wenderlein, J.; Ulrich, S.; Hiereth, S.; Chitimia-Dobler, L.; Straubinger, R.K. Revealing the Tick Microbiome: Insights into Midgut and Salivary Gland Microbiota of Female *Ixodes ricinus* Ticks. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lagkouvardos, I.; Joseph, D.; Kapfhammer, M.; Giritli, S.; Horn, M.; Haller, D.; Clavel, T. IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 996–998. [[CrossRef](#)]
44. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic. Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 1613–1617. [[CrossRef](#)]
46. Parte, A.C.; Sarda Carbasse, J.; Meier-Kolthoff, J.P.; Reimer, L.C.; Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 5607–5612. [[CrossRef](#)]
47. Oren, A.; Garrity, G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2021**, *71*, 5056. [[CrossRef](#)]
48. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]
49. Lagkouvardos, I.; Fischer, S.; Kumar, N.; Clavel, T. Rhea: A transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* **2017**, *5*, e2836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Schreiner, D.A.; Ruegg, P.L. Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 3460–3465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Abellan-Schneyder, I.; Machado, M.S.; Reitmeier, S.; Sommer, A.; Sewald, Z.; Baumbach, J.; List, M.; Neuhaus, K. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere* **2021**, *6*, e01202–e01220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Oikonomou, G.; Machado, V.S.; Santisteban, C.; Schukken, Y.H.; Bicalho, R.C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47671. [[CrossRef](#)]
53. Kuehn, J.S.; Gorden, P.J.; Munro, D.; Rong, R.; Dong, Q.; Plummer, P.J.; Wang, C.; Phillips, G.J. Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61959. [[CrossRef](#)]
54. Bhatt, V.D.; Ahir, V.B.; Koringa, P.G.; Jakhesara, S.J.; Rank, D.N.; Nauriyal, D.S.; Kunjadia, A.P.; Joshi, C.G. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 639–650. [[CrossRef](#)]
55. Cobirka, M.; Tancin, V.; Slama, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals* **2020**, *10*, 2212. [[CrossRef](#)]
56. Becker, K.; Heilmann, C.; Peters, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 870–926. [[CrossRef](#)]
57. Watts, J.L.; Lowery, D.E.; Teel, J.F.; Rossbach, S. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy. Sci.* **2000**, *83*, 2373–2379. [[CrossRef](#)]
58. Zadoks, R.N.; Gillespie, B.E.; Barkema, H.W.; Sampimon, O.C.; Oliver, S.P.; Schukken, Y.H. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *130*, 335–349. [[CrossRef](#)]
59. Davies, P.L.; Leigh, J.A.; Bradley, A.J.; Archer, S.C.; Emes, R.D.; Green, M.J. Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 68–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Selbitz, H.-J.; Truyen, U.; Valentin-Weigand, P. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre: Teil III Spezielle Bakteriologie; Grampositive Kokken*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany, 2015; ISBN 9783830412625.

61. Diaz-Cao, J.M.; Barreal, M.L.; Pombo, B.; Prieto, A.; Alonso, J.M.; Iglesias, A.; Lorenzana, R.; López-Novo, C.; Díez-Baños, P.; Fernández, G. Evaluation and cluster analysis of inflammatory reactions of dairy cattle mastitis pathogens in milk samples submitted for microbiological examination. *Span. J. Agric. Res.* **2020**, *17*, e0505. [[CrossRef](#)]
62. Bonsaglia, E.C.R.; Gomes, M.S.; Canisso, I.F.; Zhou, Z.; Lima, S.F.; Rall, V.L.M.; Oikonomou, G.; Bicalho, R.C.; Lima, F.S. Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Ganda, E.K.; Bisinotto, R.S.; Lima, S.F.; Kronauer, K.; Decter, D.H.; Oikonomou, G.; Schukken, Y.H.; Bicalho, R.C. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ganda, E.K.; Gaeta, N.; Sipka, A.; Pomeroy, B.; Oikonomou, G.; Schukken, Y.H.; Bicalho, R.C. Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with *Escherichia coli* independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines. *Microbiome* **2017**, *5*, 74. [[CrossRef](#)]
65. Vangroenweghe, F.; Dosogne, H.; Mehrzad, J.; Burvenich, C. Effect of milk sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and functions of resident cells in milk. *Vet. Res.* **2001**, *32*, 565–579. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

7 Erweiterte Diskussion

Bei der vorliegenden retrospektiven Auswertung handelte es sich um eine Pilotstudie. Die dargestellten Ergebnisse können als Orientierung für weitere Studien angesehen werden. Alle Untersuchungen auf beiden Betrieben wurden ohne Vergleichsgruppe und mit einer geringen Tierzahl durchgeführt. Der Einfluss der Haltungsformen sowie betriebsspezifische Effekte wurden herausgearbeitet, um mögliche Auswirkungen auf die Ergebnisse und Schlussfolgerungen für die Praxis zu ziehen.

7.1 Methodik

Wie aus der vorliegenden Arbeit ersichtlich wurde, war die Eutergesundheit von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Um daher die Wirksamkeit von Produkten oder Maßnahmen im Hinblick auf die Beeinflussung der Eutergesundheit zu überprüfen, sollten solche Studien unter standardisierten Bedingungen stattfinden, um betriebliche, umweltbedingte oder Kuh-assoziierte Einflussfaktoren möglichst auszuschließen oder gering zu halten. Eine retrospektive Beobachtungsstudie eignet sich daher nur eingeschränkt, um die Wirksamkeit von Produkten zu prüfen. Dies wurde auch anhand der häufig nicht signifikanten statistischen Ergebnissen deutlich, dennoch lassen sich aber Beobachtungen für nachfolgende prospektive Studiendesigns ableiten.

7.2 Milchleistung

Die beobachtete Milchleistungssteigerung im konventionellen Betrieb deckte sich mit den Beobachtungen der Literatur. Es gab hochsignifikante prozentuale Veränderungen der 100 Tage Leistung zwischen den Laktationsnummern am konventionellen Betrieb mit den bedeutendsten Ausprägungen zwischen der 2. und der 4. bzw. 5. Laktation. Es wurden die erwartungsgemäßen Zunahmen von der ersten auf die zweite und die Abnahmen ab der 5. Laktation erfüllt (Brand et al. 2001; Glatz-Hoppe 2019). Die laktationsabhängige Entwicklung der Milchleistung deckte sich mit den Daten aus dem LKV Bericht von 2021 in Bayern (LKV Bayern 2021). Jedoch konnte über die Höhe und Ausprägung der Zunahmen bzw. Abnahmen keine Aussage in Bezug auf die unterstützende Wirkung durch die Produkte getroffen werden. Es bleibt offen, ob die eingesetzten Produkte oder die starken Zunahmen der Jungkühe von der 1. auf die 2. Laktation allein für diesen Effekt verantwortlich waren.

Überrascht hat das Ausbleiben der Milchleistungssteigerung im ökologischen Betrieb. Die Tiere am ökologischen Betrieb waren unabhängig von der Laktationsnummer hinter dem erwarteten Leistungsniveau geblieben. Insbesondere die eingesetzte *AHV Booster Tablet* überzeugte nicht. Diese könnte aber bei behandelten Tieren einen weiteren Milchleistungsabfall verhindert haben. Die wichtigsten Faktoren, die neben der Erkrankung ebenfalls einen Einfluss auf die Milchleistung nehmen können, sind die Fütterung und die Haltungsform der Tiere (Kruif et al. 2007).

7.3 Eutergesundheit

Die Ergebnisse hinsichtlich der Eutergesundheit wurden im Folgenden nach Trockenstehperiode und Laktation gesondert betrachtet.

7.3.1 Eutergesundheit während der Trockenstehperiode

Die Kennzahlen und Zellzahlen in der Trockenstehperiode

Das pauschale Weglassen des antibiotischen Trockenstellers hat tendenziell zu einer Verschlechterung der Eutergesundheit auf beiden Betrieben geführt. Die Eingabe der Produkte vor dem Trockenstellen konnte keine signifikante Verbesserung erzielen. Besonders deutlich waren die Auswirkungen beim konventionellen Betrieb mit einer bereits kritischen Eutergesundheit. Sichtbar wurde das unter anderem an der Entwicklung der Kennzahlen zur Beurteilung der Eutergesundheit während der Trockenstehphase. Auffällig waren die deutliche Abnahme der Heilungsrate bei beiden Betrieben (Konv: -33,0%; Öko: -33,4%). Die Ausheilungsraten beider Betriebe lagen hinter den Vergleichswerten aus dem PräRi Bericht und den LKV Daten aus dem Jahr 2021. Auch im ökologischen Vergleich schnitt der ökologische Betrieb in der Ausheilung in der Laktation 2022 deutlich schlechter ab. Die genannten Kennzahlen in der Trockenstehperiode am konventionellen Betrieb waren allerdings mit Vorsicht zu beurteilen, da nur neun Tiere in die Auswertung mitaufgenommen wurden. Die anderen neun Tiere waren zum Zeitpunkt vor dem Trockenstellen in der Laktation 2021 hochtragende Kalbinnen. Ein Ausbleiben der Heilung über die Trockenstehphase hinweg führt zu dauerhaft infizierten Eutern über die Trockenstehperiode. Dadurch kann sich das Gewebe nur mangelhaft regenerieren und es entsteht eine ungünstige Ausgangssituation hinsichtlich der Eutergesundheit in der Folgelaktation.

Die zyto - bakteriologischen Milchprobenuntersuchungen

Betrachtete man die Ergebnisse aus beiden zyto - bakteriologischen Milchprobenuntersuchungen vor und nach dem TS, so wurden auf beiden Betrieben am häufigsten opportunistische Erreger wie KNS und *C. bovis* nachgewiesen. Diese Befunde deckten sich mit anderen Studien, bei denen diese beiden Pathogene vor dem Trockenstellen und in der Früh-laktation mit am häufigsten vorkamen (Kiesner et al. 2016; Nitz et al. 2021). Betriebsindividuell wurde zusätzlich am konventionellen Betrieb *Sc. uberis* in beiden Proben (2,9%) am dritthäufigsten nachgewiesen. Beim ökologischen Betrieb hingegen kamen eher Infektionen mit *S. aureus* vor (2,5%). Die Problematik bei der Bekämpfung von Kuh-assoziierten Erregern auf ökologisch wirtschaftenden Betrieben ist bereits von Fehlings et al. (2012) beschrieben worden und das Vorkommen von *S. aureus* ist in dieser Haltungsfom daher nicht ungewöhnlich. Schloss man die Zellzahl in die Auswertung mit ein und betrachtete man die Entwicklung der Klassifizierung der Mastitiskategorien so fielen weitere Unterschiede zwischen den beiden Betrieben auf. Beim ökologischen Betrieb nahm vor allem der Anteil an Tieren mit unspezifischer Mastitis ab und mit normaler Sekretion zu. Dies stand im scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen aus einer Feldstudie in Bayern, welche die Entwicklung der Eutergesundheit nach dem Einsatz von antibiotischen Trockenstellern untersuchten (Fehlings et al. 2012).

Dort fand eine vergleichbare Verschiebung in der Eutergesundheit von Tieren mit unspezifischer Mastitis zugunsten der Tiere mit normaler Sekretion statt, allerdings nachdem die Tiere antibiotisch trocken gestellt worden waren. Das antibiotische Trockenstellen beeinflusste in der Feldstudie den Anteil an Tieren mit latenter Infektion und unspezifischer Mastitis nicht, diese blieben vor und nach dem Trockenstellen auf einem gleichbleibenden Niveau (Fehlings et al. 2012). Zudem konnte bei der genannten Feldstudie durch den Einsatz von antibiotischen Trockenstellern ein gleich hoher Anteil von 50,0% an Tieren mit normaler Sekretion erreicht werden, wie am konventionellen Betrieb ohne antibiotischen Einsatz. Möglicherweise wurde in ebenjener Feldstudie ohne Kontrollgruppe dem antibiotischen Trockenstellern ein zu großer Effekt zugeschrieben.

Bei genauerer Betrachtung der bakteriologischen Heilung auf Erregerebene zeigte sich, dass Keime wie *Sc. uberis* oder *C. bovis* lediglich eine bakteriologische Heilungsrate von 50,0% hatten. Viertel, die mit diesen Erregern infiziert waren, hätten retrospektiv vermutlich von einem antibiotischen Trockensteller profitiert, da die Heilung mit Antibiotika bei diesen *gram*-positiven Erregern deutlich über der Selbstheilungsrate liegt. Durch den Einsatz von Antibiotika konnten bakteriologische Heilungsraten von rund 94% für Streptokokken und 98% für andere *gram*-positive Bakterien, wie beispielsweise *C. bovis* erzielt werden (Müller et al. 2023). Eine nähere Betrachtung der bakteriologischen Heilung von *S. aureus* infizierten Vierteln zeigte eine Heilung von 50%. In der Literatur wurden spontane Heilungsraten in der Trockenstehperiode von 78% angegeben (Müller et al. 2023). Ob die in dieser Studie vorliegende teilweisen Ausheilung bei IMI mit *S. aureus* auf die Eingabe der biofilmhemmenden Produkte oder zum Teil auf mögliche falsch-negative Proben nach dem Abkalben aufgrund der intermittierenden Ausscheidung von *S. aureus* zurückzuführen war, könnte in zukünftigen Studien untersucht werden (Krömker et al. 2008). Auch KNS profitierte laut den Erkenntnissen von Müller et al. (2023) nicht von einem antibiotischen Trockensteller, da sich Selbstheilungsraten (68% bei Müller et al. (2023) bis 77% bei Vasquez et al. (2018)) und die antibiotische Heilung (78% bei Müller et al. (2023) und 91% bei Vasquez et al. (2018)) nur gering voneinander unterschieden. Interessanterweise hatte KNS in dieser vorliegenden Studie, die höchste bakteriologische Heilungsrate (100%) auf beiden Betrieben. Da diese beiden Erreger, KNS und *S. aureus*, nur bedingt mit Antibiotika therapiert werden sollten, könnten alternative Behandlungsmethoden mit besseren Erfolgsaussichten genutzt werden.

Des Weiteren handelte es sich bei den Vierteln, die in der zyto-bakteriologischen Untersuchung nach dem Abkalben (2. BU) eine IMI aufwiesen, überwiegend um Neuinfektionen (Konv: 87,5% Öko: 91,7%). Gleichmaßen hohe Anteile an Neuinfektionen bei infizierten Vierteln waren auch bei antibiotisch behandelten Tieren zu finden. So handelte es sich bei 88,7% ($n = 110$) der infizierten Viertel nach dem Abkalben um eine Neuinfektion, die bei fast allen Erregerarten vorkam (Nitz et al. 2021). Es wurde beschrieben, dass ein Großteil der Neuinfektionen über die Trockenstehperiode durch Umwelt-assoziierte Erreger verursacht werden, weil das Übertragen von Kuh-assoziierten Erregern durch das Melken wegfällt (Bradley und Green 2004).

Dies stand nicht gänzlich im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen. Auch wenn es zu einer Erweiterung des Keimspektrums zugunsten der Umwelterreger nach dem Abkalben, vor allem am ökologischen Betrieb kam, so konnten dennoch sowohl Neuinfektionen durch Kuh-assoziierte als auch durch Umwelt-assoziierte Erreger nachgewiesen werden. Allerdings kann die Zunahme der Neuinfektionsrate und die Tatsache, dass es sich bei IMI in der 2. BU überwiegend um Neuinfektionen handelte, auf eine mangelnde Hygiene im Abteil der Trockensteher oder bei der Anwendung des Zitzenversieglers hinweisen (Kruif et al. 2007). Starke Umwelteffekte, die eine Gefährdung für die Eutergesundheit darstellen, sind dementsprechend durch den Einsatz von alternativen Behandlungsmethoden nicht auszugleichen. Der Einsatz von Antibiotika zum Trockenstellen sollte ebenso wie der Einsatz von alternativen Produkten betriebsspezifisch und tierindividuell überdacht werden. Eine Diagnostik ist dabei unerlässlich, um behandlungswürdige infizierte Tiere zu detektieren.

Durch die in der Publikation erläuterte 16S rRNA Sequenzierung wurde bei einer geringen Stichprobe ($n = 8$ Kühe) am konventionellen Betrieb festgestellt, dass die Ergebnisse aus der Sequenzierung größtenteils mit den Ergebnissen aus der zyto - bakteriologischen Untersuchung der Milchproben um den 7.LT übereinstimmten. Bei Tieren, die in der zyto - bakteriologischen Untersuchung auffällig waren, wurde zudem mittels der hochsensitiven Sequenzierungsmethode eine bakterielle Gemeinschaft mit einem weiteren Erreger und einer Abundanz von mehr als 1,0% identifiziert, was auf eine Mischinfektion im Euter bei diesen Kühen hinwies.

Der Einfluss von Mastitishistorie und Laktationsnummer auf die Eutergesundheit

Nicht nur die beteiligten Erreger spielten beim Infektionsgeschehen in der Trockenstehperiode eine Rolle, sondern auch die Mastitishistorie in den vorangegangenen Laktationen. Dies deckte sich mit den Erkenntnissen aus der Literatur, denn durch jede vorangegangene Mastitis wird Eutergewebe meist irreparabel geschädigt und ist zudem empfänglicher für eine neue Infektion (Ruegg 2017; Fehlings et al. 2012; Jamali et al. 2018; Wittek et al. 2018). Diese Erkenntnis wurde auch in den vorliegenden signifikanten Ergebnissen deutlich. Je mehr Mastitisbehandlungen die Kuh zum Zeitpunkt des Trockenstellens gehabt hatte, umso geringer war die Chance bei infizierten Tieren auf eine Ausheilung und bei eutergesunden Tieren gesund zu bleiben. Es scheint, dass eine potenzielle Wirkung der eingesetzten Produkt *AHV Extra* und *Aspi* zum Trockenstellen mit einer steigenden Anzahl an Mastitisvorbehandlungen abnimmt. Möglicherweise beeinträchtigen die vorangegangenen Mastitiden das Eutergewebe und die Immunabwehr so stark, dass die negativen Konsequenzen von Euterentzündungen für das Tier gegenüber den positiven Effekten der Produkte überwiegen. Zudem schien auch die Laktationsnummer einen Einfluss auf die Zellzahlen kurz nach der Abkalbung zu haben. So hatten Tiere mit niedrigeren Laktationsnummern (2. Laktation) im Median deutlich niedrigere Zellzahlen direkt nach dem Abkalben (1.PM) als Tiere mit mehr als zwei Laktationen. Auch bei Bobbo et al. (2019) hatten die Tiere in der 2. Laktation die geringsten differenzierten somatischen Zellzahlen.

In der vorliegenden Studie wird deutlich, dass das Trockenstellen ohne Antibiotikum, aber mit alternativen Produkten und ITS bei Tieren mit wenigen Mastitisfällen in den Vorlaktationen und bei Jungkühen (2. Laktation) die größten Erfolgsaussichten hat.

Folglich sollte also in Zukunft weder auf den pauschalen Einsatz von Antibiotika noch auf die ausschließliche Verwendung von alternativen Behandlungsmethoden zurückgegriffen, sondern viel mehr die Entscheidung auf Einzeltierebene getroffen werden. Dabei sollten die Mastitishistorie und die Laktationsnummer als Entscheidungskriterien mit aufgenommen werden. Der korrekte Einsatz eines Zitzenversieglers ist zudem empfehlenswert. Um weitere Aussagen in Bezug auf die Entwicklung der Eutergesundheit während der Trockenstehphase zu prüfen, braucht es aber eine Kontrollstudie, die die Gruppen antibiotisch, alternativ und ohne Behandlung zum Trockenstellen miteinander vergleicht.

7.3.2 Eutergesundheit während der Laktation

Die Kennzahlen und Zellzahlen während der Laktation

Im zeitlichen Verlauf der Probemelkungen fiel auf, dass die Tiere in der 1. PM in der Laktation 2022 nach dem Abkalben mit die höchsten Zellzahlmediane aufzeigten (Konv: 190.000 Z/ml, Öko: 52.000 Z/ml). Zudem wiesen die Daten zu diesem Zeitpunkt die weitesten Interquartilsabstände auf, was auf eine deutliche Streuung der Zellzahlen bei den Einzeltieren hindeutet. Auch im zeitlichen Verlauf der Probemelkungen zeigte sich, dass auf beiden Betrieben in der 1. PM nach dem Abkalben weniger Tiere eutergesund waren. Dass im peripartalen Zeitraum die Eutergesundheit vor große Herausforderungen gestellt wird, bemerkten auch Sharma et al. (2011b). Tiere in dieser Phase leiden häufig unter hohem oxidativem Stress, welcher mit einer Immunsuppression einhergeht. Vor allem bei Milchkühen mit hoher Leistung und einer negativen Energiebilanz kurz nach dem Abkalben kann es zu einem gehäuften Auftreten von IMI kommen und das Mastitisrisiko steigt an (Visscher et al. 2016; Cheng und Han 2020). Hinweise auf eine unterstützende positive Wirkung auf das Immunsystem durch den Einsatz der pflanzlichen Produkte konnte bei den besonderen Herausforderungen in dieser Zeit nicht eindeutig erkannt werden.

Es kam im zeitlichen Verlauf der Probemelkungen zu einer Stabilisierung der Eutergesundheit. Nach der 2. PM verbesserten sich die Zellzahlmediane (Laktation, 3. PM 2022, Konv: 87.000 Z/ml) vor allem am konventionellen Betrieb deutlich und der ökologische Betrieb konnte die Zellzahlmediane (Laktation, 3. PM 2022, Öko: 65.000 Z/ml) auf einem konstant niedrigen Niveau halten. Ob der Effekt allein auf die 2. Eingabe (um den Zeitpunkt der 2. PM) der Produkte *Aspi* und *Extra* zurückzuführen war, konnte auf Grund der fehlenden Kontrollgruppe nicht eindeutig beurteilt werden. Möglicherweise kann auch der Verdünnungseffekt durch das Einsetzens der Gipfelmilchleistung in diesem Zeitraum (Brand et al. 2001) oder die Stabilisierung des Immunsystems nach der peripartalen Phase einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der Zellzahlen und folglich auf die Eutergesundheit nehmen (Ruegg 2021).

Die Mastitisinzidenz und die Anzahl der Behandlungen

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Entwicklung der Eutergesundheit während der Laktation ist die Mastitisinzidenz in den ersten 100 LT. Hierbei kam es zu erheblichen Unterschieden zwischen den beiden Betrieben. So stieg beim konventionellen Betrieb die Inzidenz stark an (+38,6%), wohingegen beim ökologischen Betrieb die Inzidenz von 30,0% gleich hoch blieb. Ein möglicher prophylaktischer Effekt der verwendeten Produkte schien auf Grund dieser Entwicklung und der gestiegenen Neuinfektionsrate in der Laktation 2022 eher unwahrscheinlich. Es war davon auszugehen, dass der Erregerdruck vor allem auf beobachtungswürdigen Betrieben mit moderater Eutergesundheit hoch war. Überwiegend Umwelt-assoziierte Erreger, wie beispielsweise *Sc. uberis*, können dabei eine wichtige Rolle spielen und zu hohen Rezidiv- und Neuinfektionsraten bei Milchkühen führen (Cobirka et al. 2020). Dies hatte sich am konventionellen Betrieb bereits angedeutet, da einige Viertel in der 2. BU mit *Sc. uberis* infiziert waren.

Neben der Inzidenz für Mastitis in den ersten 100 LT wurde auch der Parameter „Anzahl an Behandlungen“ sowohl für die Mastitiserstversorgung mit den AHV Produkten *Quick*, *Extra*, *Aspi* und *Booster* als auch für folgende antibiotische Behandlungen in der Laktation 2022 erhoben. Auch hier zeigten sich erneut erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Haltungformen. Am ökologischen Betrieb funktionierte die Mastitiserstversorgung mit den pflanzlichen Alternativen besser, hier war kein antibiotischer Einsatz erforderlich. Am konventionellen Betrieb hingegen mussten fünf der acht Behandlungen antibiotisch versorgt werden, wegen mangelnder Verbesserung der Mastitissymptome. Ein möglicher Grund für die Unterschiede zwischen den beiden Haltungformen könnte in der frühzeitigen Erkennung der Erkrankung liegen. Der konventionelle Betrieb verbachte zwar insgesamt mehr Stunden mit der Stallarbeit, diese und vor allem das Melken wurden aber von wechselnden Fremdarbeitskräften durchgeführt, welche zudem während des Melkens immer wieder den Melkprozess unbeaufsichtigt ließen. Dies kann, wie auch von Barnouin et al. (2004) und Volling et al. (2011) beschrieben wurde, zu einer Verschlechterung der Eutergesundheit führen, da möglicherweise früh erkrankte Tiere nicht eindeutig und vor allem nicht frühzeitig identifiziert wurden. Es konnte von einer geringeren Sensitivität als die von Hillerton (2000) beschriebenen 80% für die Erkennung von IMI durch das Melkpersonal ausgegangen werden. Der ökologische Betrieb hingegen schien Tiere frühzeitiger zu erkennen, indem er die durch das AMS eingesparte Zeit in die Tierbeobachtung investierte. So konnten schwere Verläufe, die ein Antibiotikum verlangen, möglicherweise vermieden werden (Jong et al. 2023a). Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass der ökologische Betrieb geübter im Umgang mit antibiotikafreien Behandlungsalternativen sowie in der Prophylaxe von Krankheiten war (Duval et al. 2020). Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Behandlungsoptionen ist es in kommenden Studien empfehlenswert die Art und den Schweregrad der Mastitis veterinärmedizinisch zu diagnostizieren sowie die Art des Erregers und den Verlauf der bakteriologischen und zytologischen Heilung durch zyto - bakteriologische Milchprobenuntersuchungen festzustellen.

Damit kann die Aussagekraft hinsichtlich der Wirksamkeit der Produkte und des Verlaufs der Erkrankung verbessert werden. Der erfasste Parameter „Anzahl an Behandlungen“ war, wie auch von Duval et al. (2020) beschrieben, zu ungenau und möglicherweise irreführend.

Es lässt sich festhalten, dass sich die Eutergesundheit während der Laktation auf dem konventionellen Betrieb mit einer beobachtungswürdigen Eutergesundheit noch weiter verschlechtert hat. Am ökologischen Betrieb konnte die sehr gute Ausgangssituation nicht gänzlich gehalten werden, dennoch blieb der Betrieb ohne antibiotische Anwendungen im Euterbereich und mit dem Einsatz von pflanzlichen Behandlungsalternativen auf einem guten Niveau.

7.4 Tiergesundheitsmonitoring

Die Tierbeobachtung und der Betreuungsschlüssel

Bei der ökologischen Gegenüberstellung mit den Ergebnissen von Hansmann et al. (2019) zeigte sich, dass der Betrieb eine für diese Haltungform außerordentlich gute Eutergesundheit aufwies. Wobei der Vergleich mit dieser Studie nicht ohne Vorbehalt gezogen werden kann, da die analysierten Betriebe überwiegend in Norddeutschland lokalisiert waren und größtenteils Kühe der Rasse HF ausgewertet wurden. Somit können geographische und rassespezifische Unterschiede nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dennoch ist festzuhalten, dass diese Bewirtschaftungsform generell mit einigen Vorgaben einhergeht, die die Eutergesundheit negativ beeinflussen können. Das Management am ökologischen Betrieb in der vorliegenden Studie bewirkte aber den entscheidenden Unterschied. Insbesondere der Betreuungsschlüssel und die Tierbeobachtung stehen dabei im Vordergrund. So beschrieben auch Versen et al. (2021) und Volling (2011), dass ein gutes Betreuungsverhältnis bei rund 38 Milchkühen pro Arbeitskraft liegt und Betriebe mit einer niedrigen Herdensammelmilchzellzahl im Durchschnitt 41 Milchkühe hielten. Dass allerdings der Betreuungsschlüssel nicht allein für eine gute Eutergesundheit verantwortlich war, zeigte sich anhand des ähnlich engen Betreuungsverhältnisses am konventionellen Betrieb mit einer moderaten Eutergesundheit. Ein weiterer entscheidender Faktor schien neben der zu betreuenden Anzahl an Tieren auch die Art und die Dauer, die für die Tierbeobachtung am Betrieb investiert wurde. Trotz des Einsatzes eines AMS-Systems mit geringerer Sensitivität, schien eine häufige und lange Tierbeobachtung im Bereich der Eutergesundheit einem Betrieb mit wechselnden Fremdarbeitskräften und teilweise unbeobachteten Melkprozessen überlegen zu sein. Der erfolgreiche Einsatz von alternativen Behandlungsmethoden erfordert daher betriebliche Managementstrategien, die vor allem eine gute Tierbeobachtung voraussetzen.

Das Euterscoring

Das Euterscoring wurde durchgeführt, um den Gesundheitszustand der Tiere noch detaillierter beurteilen zu können. Ähnliche Scorings wurden in aktuellen Arbeiten für unterschiedliche Fragestellungen im Euterbereich ebenfalls angewandt (Köllmann et al. 2021; Nitz et al. 2021).

Ein Parameter, der im Scoring erhoben wurde, waren die Verschmutzungen am Euter und an den Hintergliedmaßen. Dieser Hygienescore erlaubt Rückschlüsse auf eine fäkale Kontamination in diesem Bereich. Die Tiere am konventionellen Betrieb mit einem durchschnittlichen Hygienescore von 1,8 waren größtenteils sauber. Mängel in der Liegeboxenpflege oder der Laufflächenreinigung, die laut Hohmann et al. (2020) und DeVries et al. (2012) in Verbindung mit der Bakterienbelastung und damit auch der Sauberkeit der Tiere stehen, schienen daher nicht der ausschlaggebende Grund für die kritische Eutergesundheit am Betrieb zu sein. Im ökologischen Betrieb hingegen mit gescorten Tieren von durchschnittlich 2,6 schien die Sauberkeit der Tiere moderat zu sein. Es wäre möglich, dass die Verschmutzung wegen der in der Literatur beschriebenen dreckigeren Lauf- und Triebwegen mit den schlechten Witterungsverhältnissen zusammenhing (Kelly et al. 2009; Volling et al. 2011). Denn das Scoring fand bei den Tieren überwiegend in den nassen Monaten von Dezember bis April statt. Allerdings gingen die Verschmutzungen am ökologischen Betrieb anders als bei Barnouin et al. (2004) nicht mit einem deutlichen Zellzahlanstieg einher. Möglicherweise könnten aber die fäkalen Verschmutzungen mancher Tiere auch die Ursache für die Zunahme an Umwelt-assoziierten Erregern bei der 2. BU am ökologischen Betrieb sein. Bekanntlich stellt die Fäzes der Rinder ein wichtiges Reservoir für Umwelt-assoziierte Mastitispathogene dar (Munoz et al. 2006; Zadoks et al. 2005). Verschmutzter waren vor allem Kühe mit einem tiefhängenden Euter, da hier der Abstand zwischen Boden und Zitze kleiner ist. Diese Kühe hatten am Tag des Scorings auch höhere Zellzahlen (ca. 650.000 Z/ml) als Kühe mit nicht tiefhängendem Euter (ca. 315.000 Z/ml). Zu gleichen Schlussfolgerungen kamen beispielsweise auch Sharma et al. (2017). Sie konnten feststellen, dass Tiere mit Pendeleuter im Durchschnitt eine Zellzahl von 306.000 Z/ml im Vergleich zu Tieren ohne Pendeleuter mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 132.000 Z/ml aufwiesen. Meist findet diese altersbedingte Lockerung des Aufhängeapparates mit zunehmender Laktationsnummer statt, dennoch wird in den meisten Studien über die Verschmutzungen am Euter die Laktationsnummer der gescorten Tiere nicht angegeben. In der vorliegenden Arbeit hatten Tiere mit tiefhängendem Euter eine durchschnittliche Laktationsnummer von 5,5 Laktationen. Somit könnten erhöhte Zellzahlen bei tiefhängenden Eutern nicht allein durch die Verschmutzung ausgelöst werden, sondern möglicherweise auch den erhöhten Infektionsraten bei älteren Tieren geschuldet sein.

8 Fazit

Der Einsatz der *AHV* Produkte, insbesondere der *Booster Tablet* hatte keinen deutlich positiven Einfluss auf die Milchleistung der ausgewerteten Tiere, die über die zu erwarteten Zunahmen hinausging. Der Einfluss der verwendeten *AHV* Produkte auf die Leistung der Tiere ist zudem wegen der geringen Tierzahl und das Fehlen der Kontrollgruppe nicht abschließend zu beurteilen.

Der Fokus der Arbeit lag auf der Eutergesundheit. Hier lassen sich folgende Kernaussagen zusammenfassen. Bei den ausgewerteten Tieren konnte keine Verbesserung durch den Verzicht von antibiotischen Trockenstellern erreicht werden. In der Trockenstehperiode stieg die Neuinfektionsrate deutlich an, wohingegen die Ausheilungsrate stark abfiel. Vor allem in der peripartalen Phase, die oft mit einer Immunsuppression einhergeht, stieg die Zellzahl an. Anhand der bakteriologischen Untersuchung zum TS, zeigte sich, dass überwiegend *gram*-positive Keime in den Vierteln nachgewiesen wurden. Demnach hätten diese in der BU auffälligen Tiere retrospektiv von einem antibiotischen Trockensteller profitiert. Der Einsatz der *AHV* Produkte *Extra* und *Aspi* zum Trockenstellen konnten keine deutliche Verbesserung erzielen, die über die Selbstheilungsrate der Euterviertel während des Trockenstellens hinausging. Zudem sollte der Einsatz von alternativen Produkten auf Einzeltierebene entschieden werden. Folgende Faktoren spielten dabei eine Rolle: Kühe mit zwei Laktationen zeigten niedrigere Zellzahlen in der 1. PM 2022 als ältere Tiere zu diesem Zeitpunkt und verfügten folglich über eine bessere Eutergesundheit. Einen weiteren Einflussfaktor schienen die Mastitisbehandlungen in der Vorlaktation zu spielen. So hatten Tiere mit drei oder mehr Mastitisbehandlungen eine geringe Chance über die Trockenstehperiode eutergesund zu bleiben oder auszuheilen. Unter diesen Voraussetzungen können teilweise Einsparungen von Antibiotika zum Trockenstellen erzielt werden, dabei ist eine Diagnostik zur Pathogenbestimmung in Milchproben unabdingbar. Bei der Erstversorgung von Mastitiden machte das Management den entscheidenden Unterschied. Damit spielen die Art und Dauer der Tierbeobachtung durch den Betriebsleiter und das frühzeitige Erkennen von Problemtieren beim erfolgreichen Einsatz von pflanzlichen Alternativen eine entscheidende Rolle. Folglich können bei einem Betrieb mit einer guten Ausgangssituation im Euterbereich und einem guten Management Einsparungen beim Einsatz von Antibiotika vorgenommen werden. Der Umgang mit den Produkten erfordert aber eine gewisse Routine, wie sie Betriebsleiter von ökologischen Betrieben häufiger dank der Erfahrung mit warzeitfreien Alternativen mit sich bringen.

In zukünftigen Studien sollte zunächst eine unabhängige standardisierte Untersuchung, die eine randomisierte Kontrollgruppe und Placebo Produkte beinhaltet, durchgeführt werden, um klare Aussagen in Bezug auf die Wirksamkeit der Produkte treffen zu können. In weiteren Studien kann im Anschluss die bakteriologische Heilung von Erregern, die nur bedingt mit Antibiotika behandelbar sind wie *S. aureus* und KNS noch genauer untersucht werden. Möglicherweise könnten alternative Therapiemöglichkeiten zu besseren Erfolgsaussichten führen.

Abschließend lässt sich im Bereich des Tiergesundheitsmonitorings feststellen, dass der Einsatz von alternativen Produkten der Firma *AHV* ein gutes betriebliches Management mit einer sorgfältigen Tierbeobachtung voraussetzt. Erhebliche betriebliche Mängel in Fütterung oder Haltung konnten durch die alternativen Produkte nicht ausgeglichen werden.

Die Next-Generation-Sequenzierung kann eine hilfreiche Methode in der Praxis und Wissenschaft sein, wenn Kontaminationen vermieden und Zitzen sorgfältig desinfiziert werden, um die Komplexität des Mastitisgeschehens sowie den Ursprung des Erregers zu verstehen und somit mögliche Infektionsquellen zu eliminieren. Allerdings sind Sequenzierungsmethoden sehr empfindlich und erfordern immer Negativkontrollen. Deshalb sollten die Ergebnisse kritisch hinterfragt und immer im Zusammenhang mit den klinischen Parametern und der konventionellen Kultur (CC) beurteilt werden, um mögliche Fehlinterpretationen bedingt durch Umweltkontaminationen zu vermeiden.

9 Zusammenfassung

Die Reduktion von Antibiotika im Rinderbereich ist in den letzten Jahren zunehmend wichtiger geworden. Ein großes Einsparungspotenzial von Antibiotika, durch alternative Behandlungs- und Prophylaxemöglichkeiten ohne Wartezeit für laktierende Milchkühe, gibt es im Bereich der Eutergesundheit. In der vorliegenden retrospektiven Pilotstudie soll der Einfluss von *Animal Health Vision (AHV)* Produkten auf die Eutergesundheit von insgesamt 38 bayerischen Fleckviehkühen auf einem konventionellen und ökologischen Betrieb beleuchtet werden. Die verwendeten antibiotikafreien Produkte enthalten phytotherapeutische Stoffe sowie thiosulfurhaltige Zusammensetzungen, die auf Grund ihres Wirkprinzips die Bakterien nicht abtöten, sondern „entwaffnen“ sollen. Die Betriebe haben auf eine soweit vertretbare antibiotikafreie Therapie und Prophylaxe von intramammären Infektionen über die Trockenstehphase und innerhalb den ersten 100 Laktationstagen umgestellt und Produkte der Firma *AHV* verwendet. Unabhängig vom Eutergesundheitszustand der ausgewerteten Tiere wurden alle Kühe 2022 mit einem internem Zitzenversiegler und ohne Antibiotika trockengestellt. Es wurden dabei sowohl die Ergebnisse aus den Probemelkungen der Tiere als auch von zwei zyto - bakteriologischen Milchprobenuntersuchungen (21 Tage vor dem Trockenstellen; ± 7 Tage p.p.) und einem Euterscoring (± 7 Tage p.p.) ausgewertet. Insbesondere wurden Einflüsse durch das betriebsspezifische Management und die Unterschiede zwischen ökologischer und konventioneller Haltung herausgearbeitet. Einen tieferen Einblick in die Eutergesundheit von acht Tieren des konventionellen Betriebs wurde in der Publikation durch die zusätzliche kulturelle Anzucht von Milchproben in Kombination mit der 16S rRNA Sequenzierung von sterilen Milchproben aus der Euterzisterne und Tupfer aus dem Strichkanal gewonnen.

Milchleistung

Am konventionellen Betrieb wurden die größten prozentualen Zunahmen der 100 Tage Leistung im Vergleich zur Vorlaktation erwartungsgemäß bei Tieren in der 2. und 3. Laktation beobachtet. Am ökologischen Betrieb gab es vor allem bei den Tieren in der 3. und 4. Laktation keine Steigerung der 100 Tage Leistung. Der Einsatz der *AHV* Produkte, insbesondere der *Booster Tablet* hatte somit keinen eindeutigen positiven Einfluss auf die Milchleistung der ausgewerteten Tiere, die über die zu erwarteten Zunahmen hinausging.

Eutergesundheit

Der pauschale Einsatz der *AHV* Produkte und der Verzicht von antibiotischen Trockenstellern führte zu keiner Verbesserung der Eutergesundheit bei den ausgewerteten Tieren. Am konventionellen Betrieb stieg die Zellzahl in der 1.PM im Median von 63.000 Z/ml in der Laktation 2021 auf 190.000 Z/ml in 2022. Auch auf dem ökologischen Betrieb stieg die Zellzahl in der 1.PM im Median von 31.000 Z/ml 2021 auf 52.000 Z/ml 2022. Der generelle Verzicht auf antibiotischen Trockensteller und der Einsatz von alternativen Produkten sollten daher auf Einzeltierebene entschieden werden. Kriterien bei dieser Entscheidungsfindung sollten die Laktationsnummer der Kuh, die Anzahl an Mastitisbehandlungen in den Vorlaktationen sowie das Ergebnis einer bakteriologischen Untersuchung der Milch vor dem Trockenstellen sein.

Unterschiede zwischen den Laktationen 2021 und 2022 zeigten sich unter anderem in der Mastitisinzidenz in den ersten 100 Laktationstagen. So hatten am konventionellen Betrieb 2022 von 18 ausgewerteten Tieren acht Tiere eine Mastitis, während es 2021 nur ein Tier war. Am ökologischen Betrieb waren es 2021 und 2022 jeweils sechs von 20 Tieren. Ein möglicher prophylaktischer Effekt der *AHV* Produkte zeigte sich nicht. Allerdings musste auf dem ökologischen Betrieb bei acht Behandlungen mit akuter Mastitis kein Tier antibiotisch versorgt werden. Dies lag vor allem am Management des ökologischen Betriebs, der Mastitiden früher erkannte und mit der Erstversorgung mit *AHV* Produkten erfolgreich behandelte. Die Art und Dauer der Tierbeobachtung durch den Betriebsleiter und das frühzeitige Erkennen von Problemtieren spielten beim erfolgreichen Einsatz von pflanzlichen Alternativen eine entscheidende Rolle und sind zusammen mit einer guten betrieblichen Ausgangssituation in der Eutergesundheit Voraussetzung für das Einsparen von Antibiotika bei Euterbehandlungen.

Weitere Untersuchungen zur Beurteilung der Tiergesundheit

Das Euterscoring ergab einige Unterschiede zwischen dem konventionellen und dem ökologischen Betrieb. Am konventionellen Betrieb standen zwar die saubereren Tiere, jedoch traten häufiger Geburtsödeme auf. Auf beiden Betrieben konnte festgestellt werden, dass Tiere mit tiefhängenden Eutern verschmutzter waren, was mit einer erhöhten Zellzahl und damit zugleich mit einem höheren Risiko für intramammäre Infektionen einherging. Grundsätzlich eignet sich der Zeitpunkt (± 7 LT) des Scorings gut, um in der kritischen Transitperiode kranke Tiere frühzeitig zu erkennen.

Konkrete Aussagen in Bezug auf die Wirksamkeit der verwendeten Produkte waren dabei auf Grund des Studiendesigns nur eingeschränkt möglich, stattdessen konnten aus den Ergebnissen mögliche Schlussfolgerungen für den Einsatz in der gängigen Praxis und für weitere Studien gezogen werden.

Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzierung aus der Publikation

In der Publikation wurden keine Hinweise auf ein Mikrobiom im gesunden Euter gefunden. Bei Tieren, die in der zytologischen und bakteriologischen Untersuchung auffällig waren, wurde zwar eine bakterielle Gemeinschaft gefunden, diese bestand aber nur aus zwei Erregern mit einer Abundanz von mehr als 1,0%, was auf eine Mischinfektion des Euters hinweist. Die Ergebnisse der konventionellen Kultur (CC) stimmen weitgehend mit den Ergebnissen der molekularen Untersuchung überein. Dennoch konnte die 16S rRNA-Genamplikonsequenzierung einen noch detaillierteren Einblick geben. Folglich könnte die Next-Generation-Sequenzierung eine zusätzliche hilfreiche Methode sein, um die Komplexität des Mastitisgeschehens sowie den Ursprung des Erregers zu verstehen und somit zukünftig mögliche Infektionsquellen eliminieren.

10 Summary

The impact of AHV products on the udder health of Bavarian Simmental cows -

A retrospective evaluation of the animal health

The reduction of antibiotics in the dairy sector has become increasingly important in the recent years. A large potential for antibiotic reduction by alternative treatment and prevention options without waiting time for lactating dairy cows can be found in the udder health sector. In this retrospective pilot study the influence of Animal Health Vision (AHV) products on the udder health of 38 Bavarian Simmental cows on a conventional and organic farm will be investigated. The products used, which are free of antibiotics, contain phytotherapeutic substances as well as thiosulfur containing compositions. They are not supposed to kill the bacteria, but to disarm them. The farms have changed to an antibiotic-free therapy and prophylaxis of intramammary infections over the dry period and within the first 100 lactation days as far as justifiable and used products of the company AHV. Regardless of the udder health status of the evaluated animals, all cows were dried off in 2022 with an internal teat sealant and without antibiotics. The results of the milk production parameters of the animals as well as two cytomicrobiological examinations (21 days before drying off; ± 7 days p.p.) and an udder scoring (± 7 days p.p.) were evaluated. In particular, influences of farm-specific management and differences between organic and conventional farming were elaborated. A deeper insight into the udder health of eight animals of the conventional farm was provided in the publication by the additional conventional culture (CC) of milk samples in combination with 16S rRNA sequencing of sterile milk samples from the udder cistern and swabs from the teat canal.

Milk yield

As expected, at the conventional farm, the largest percentage increases in 100 day performance compared to previous lactation were observed in animals in the 2nd and 3rd lactation. At the organic farm, there was no increase in 100 day performance, especially among animals in the 3rd and 4th lactations. Thus, the use of the AHV products, in particular the *booster tablet*, did not have a clear positive influence on the milk yield of the evaluated animals, which exceeded the expected increases.

Udder health

The blanket use of AHV products and the avoidance of antibiotic drying off agents did not lead to any improvement in udder health in the evaluated animals. At the conventional farm, the median cell count in the 1st PM increased from 63,000 Z/ml in the 2021 lactation to 190,000 Z/ml in 2022. At the organic farm, the median cell count in the 1st PM also increased from 31,000 Z/ml in 2021 to 52,000 Z/ml in 2022. Therefore, the general avoidance of antibiotic drying off agents and the use of alternative products should be decided at the individual cow level. Criteria for this decision should be the lactation number of the cow, the number of mastitis treatments in the previous lactations and the result of a bacteriological examination of the milk before drying off.

Differences between the lactations 2021 and 2022 were shown in the incidence of mastitis in the first 100 days of lactation. Thus, at the conventional farm in 2022, out of 18 animals observed, eight animals had mastitis, while in 2021 it was only one cow. At the organic farm, six of 20 animals had mastitis in both 2021 and 2022. A possible prophylactic effect of the AHV products was not found. However, at the organic farm, no animal had to be supplied with antibiotics out of eight treatments with acute mastitis. This was mainly due to the management of the organic farm, which recognized mastitis earlier and treated it successfully with the first treatment with AHV products. The method and duration of animal monitoring by the farm manager and the early detection of sick animals played a key role in the successful use of plant-based alternatives. Together with a good initial situation in udder health at the farm, these factors are essential for saving antibiotics in udder treatments.

Further investigations for the evaluation of animal health

The udder scoring showed some differences between the conventional and the organic farm. At the conventional farm, the animals were cleaner, but birth edema was more frequent. On both farms, animals with lower pendulous udders were found to be dirtier, which was associated with an increased cell count and thus a higher risk of intramammary infections. In general, the time of scoring (± 7 LT) is well suited to detect sick animals early in the critical transit period.

Concrete conclusions regarding the efficacy of the products used were only possible to a limited extent due to the study design. Instead, possible conclusions for use in common practice and for further studies could be drawn from the results.

Results of 16S rRNA sequencing from the publication.

In this study, no evidence of a microbiome was found in the healthy udder. However, this is not the case for the animals, which showed abnormalities in the cytological and bacteriological examination. Here, a bacterial community was found, but it only consisted of two pathogens with an abundance of more than 1.0%, indicating a mixed infection of the udder. The results of the conventional culture (CC) were largely in agreement with the results of the molecular examination. Nevertheless, 16S rRNA gene amplicon sequencing could provide an even more detailed insight. Consequently, next-generation sequencing could be an additional helpful method to understand the complexity of the mastitis process as well as the origin of the pathogen and thus eliminate possible sources of infection.

11 Literaturverzeichnis

- Asli, A.; Brouillette, E.; Ster, C.; Ghinet, M. G.; Brzezinski, R.; Lacasse, P.; Jacques, M.; Malouin, F. (2017): Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. In: *PloS one* 12 (5), e0176988. DOI: 10.1371/journal.pone.0176988.
- Barnouin, J.; Chassagne, M.; Bazin, S.; Boichard, D. (2004): Management practices from questionnaire surveys in herds with very low somatic cell score through a national mastitis program in France. In: *J. Dairy Sci.* 87 (11), S. 3989–3999. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73539-0.
- Bausewein, M.; Mansfeld, R.; Doherr, M. G.; Harms, J.; Sorge, U. S. (2022): Sensitivity and Specificity for the Detection of Clinical Mastitis by Automatic Milking Systems in Bavarian Dairy Herds. In: *Animals* 12 (16), S. 1–18. DOI: 10.3390/ani12162131.
- Becker, H.; Märtlbauer, E. (Hg.) (2016): *Milchkunde und Milchhygiene*. 131 Abbildungen, 96 Tabellen. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer (UTB, 8664), S. 93–94.
- Bharti, P.; Bhakat, C.; Pankaj, P. K.; Bhat, S. A.; Prakash, M. A.; Thul, M. R.; Japheth, K. P. (2015): Relationship of udder and teat conformation with intra-mammary infection in crossbred cows under hot-humid climate. In: *Vet World* 8 (7), S. 898–901. DOI: 10.14202/vetworld.2015.898-901.
- Bhutto, A. L.; Murray, R. D.; Woldehiwet, Z. (2010): Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. In: *Vet. J* 183 (1), S. 63–67. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.08.024.
- Bobbo, T.; Penasa, M.; Cassandro, M. (2019): Short communication: Genetic aspects of milk differential somatic cell count in Holstein cows: A preliminary analysis. In: *J. Dairy Sci.* 102 (5), S. 4275–4279. DOI: 10.3168/jds.2018-16092.
- Borell, E. von; Sørensen, J. T. (2004): Organic livestock production in Europe: aims, rules and trends with special emphasis on animal health and welfare. In: *Livestock Production Science* 90 (1). DOI: 10.1016/j.livprodsci.2004.07.003.
- Bradley, A. J.; Green, M. J. (2004): The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. In: *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20 (3), S. 547–568. DOI: 10.1016/j.cvfa.2004.06.010.
- Brand, A.; Noordhuizen, J. P. T. M.; Schukken, Ynte H. (Hg.) (2001): *Herd health and production management in dairy practice*. 3. Auflage. Wageningen: Wageningen Pers, S. 269–277.

Brennecke, J.; Falkenberg, U.; Wente, N.; Krömker, V. (2021): Are Severe Mastitis Cases in Dairy Cows Associated with Bacteremia? In: *Animals* 11 (2). DOI: 10.3390/ani11020410.

Bundesministerium für Gesundheit (2015): DART 2020. Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier. 1. Auflage. Unter Mitarbeit von Bundesministerium für Gesundheit, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und Bundesministerium für Bildung und Forschung. Hg. v. Bundesministerium für Gesundheit. Berlin. Online verfügbar unter <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/service/publikationen/details/dart-2020-antibiotika-resistenzen-bekaempfen-zum-wohl-von-mensch-und-tier.html>, zuletzt geprüft am 12.06.2023.

Bundesministerium für Gesundheit (2022): DART 2020. Abschlussbericht. Hg. v. Bundesministerium für Gesundheit. Referat 615. Berlin. Online verfügbar unter <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/service/publikationen/details/dart-2020-abschlussbericht.html>, zuletzt geprüft am 12.06.2023.

Bürki, S.; Frey, J.; Pilo, P. (2015): Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. In: *Vet. Microbiol.* 179 (1-2), S. 15–22. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.02.024.

Burmølle, M.; Thomsen, T. R.; Fazli, M.; Dige, I.; Christensen, L.; Homøe, P.; Tvede, M.; Nyvad, B.; Tolker-Nielsen, T.; Givskov, M.; Moser, C.; Kirketerp-Møller, K.; Johansen, H. K.; Høiby, N.; Jensen, P. Ø.; Sørensen, S. J.; Bjarnsholt, T. (2010): Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. In: *FEMS microbiol. immunol.* 59 (3), S. 324–336. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x.

Cascajosa-Lira, A.; Prieto Ortega, A. I.; Guzmán-Guillén, R.; Cătunescu, G. M.; La Torre, J. M. de; Guillamón, E.; Jos, Á.; Cameán Fernández, A. M. (2021): Simultaneous determination of Allium compounds (Propyl propane thiosulfonate and thiosulfinate) in animal feed using UPLC-MS/MS. In: *Food. Chem. Toxicol.* 157, S. 112619. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112619.

Chakraborty, S.; Dhama, K.; Tiwari, R.; Iqbal Yattoo, M.; Khurana, S. K.; Khandia, R.; Munjal, A.; Munuswamy, P.; Kumar, M. A.; Singh, M.; Singh, R.; Gupta, V. K.; Chaicumpa, W. (2019): Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. In: *Vet Q* 39 (1), S. 76–94. DOI: 10.1080/01652176.2019.1642546.

Cheng, W. N.; Han, S. G. (2020): Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. In: *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 33 (11), S. 1699–1713. DOI: 10.5713/ajas.20.0156.

Cobirka, M.; Tancin, V.; Slama, P. (2020): Epidemiology and Classification of Mastitis. In: *Animals* 10 (12). DOI: 10.3390/ani10122212.

- Collado, R.; Solà, C.; Martín, R.; Roca, M.; Prenafeta, A. (Hg.) (2018): Analyzing antibodies induced by UBAC vaccination. A Poster. International Bovine Mastitis Conference NMC. Milano, Italy, 11. - 13.06.
- Cook, N.; Reinemann, D. (2006): A Tool Box for Assessing Cow, Udder and Teat Hygiene. Online verfügbar unter <https://www.semanticscholar.org/paper/A-Tool-Box-for-Assessing-Cow-%2C-Udder-and-Teat-Cook-Reinemann/5cd946b6130397c7ecd2548e36416c34d2348f69>.
- Costa, A.; Bovenhuis, H.; Penasa, M. (2020): Changes in milk lactose content as indicators for longevity and udder health in Holstein cows. In: *J. Dairy Sci.* 103 (12), S. 11574–11584. DOI: 10.3168/jds.2020-18615.
- Costa, A.; Egger-Danner, C.; Mészáros, G.; Fuerst, C.; Penasa, M.; Sölkner, J.; Fuerst-Waltl, B. (2019): Genetic associations of lactose and its ratios to other milk solids with health traits in Austrian Fleckvieh cows. In: *J. Dairy Sci.* 102 (5), S. 4238–4248. DOI: 10.3168/jds.2018-15883.
- DeVries, T. J.; Aarnoudse, M. G.; Barkema, H. W.; Leslie, K. E.; Keyserlingk, M. A. G. von (2012): Associations of dairy cow behavior, barn hygiene, cow hygiene, and risk of elevated somatic cell count. In: *J. Dairy Sci.* 95 (10), S. 5730–5739. DOI: 10.3168/jds.2012-5375.
- DLQ (2020): DLQ-Richtlinie 2.0. Definitionen und Berechnungen von Indikatoren und Zugehörigen Vergleichswerten zur Durchführung der betrieblichen Eigenkontrolle und des nationalen Tierwohlmonitorings. Q Check, Tierwohl in der Milchviehhaltung mit System.
- Donlan, R. M. (2000): Role of biofilms in antimicrobial resistance. In: *ASAIO Journal* 46 (6), S. 47-52. DOI: 10.1097/00002480-200011000-00037.
- Donlan, R. M.; Costerton, J. W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In: *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2), S. 167-193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
- Dufour, S.; Fréchette, A.; Barkema, H. W.; Mussell, A.; Scholl, D. T. (2011): Invited review: effect of udder health management practices on herd somatic cell count. In: *J. Dairy Sci.* 94 (2), S. 563–579. DOI: 10.3168/jds.2010-3715.
- Duval, E.; Keyserlingk, M. A. G. von; Lecorps, B. (2020): Organic Dairy Cattle: Do European Union Regulations Promote Animal Welfare? In: *Animals* 10 (10), S. 1786. DOI: 10.3390/ani10101786.
- Ericsson Unnerstad, H.; Lindberg, A.; Persson Waller, K.; Ekman, T.; Artursson, K.; Nilsson-Ost, M.; Bengtsson, B. (2009): Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. In: *Vet. Microbiol.* 137 (1-2), S. 90–97. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.12.005.

European Parliament and the Council of the European Union (2019): Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. EU. In: *Off. J. Eur. Union*, S. 43–146. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>, zuletzt geprüft am 07.06.2023.

Fehlings, K. (2009): Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. Unter Mitarbeit von M. Zschöck, B. Baumgärtner, M. Geringer, J. Hamann und K. Knappstein. 3. Auflage. Gießen: Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.

Fehlings, K.; Hamann, J.; Klawonn, W.; Knappstein, K.; Mansfeld, R.; Wittkowski, G.; Zschöck, M. (Hg.) (2012): Leitlinien - Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem. Unter Mitarbeit von Arbeitsgruppe Schverständigenausschuss Subklinische Mastitis der Fachgruppe "Milchhygiene" der DVG. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. 5., überarbeitete Auflage. Gießen: Verlag der DVG Servive GmbH, S. 24–113.

Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. (2016): Biofilms: an emergent form of bacterial life. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (9), S. 563–575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.

Gindhart, I. (2014): Untersuchungen zur Behandlung der akuten katarrhalischen Mastitis bei Milchkühen mit und ohne Anwendung eines nicht-steroidalen Antiphlogistikums unter Berücksichtigung eines geeigneten diagnostischen Entscheidungsbaums, München. Ludwig-Maximilians-Universität München. Dissertation.

Giovanni, G.; Zecconi, A. (2002): Field study on epidemiology of clinical mastitis in five Italian dairy herds. In: *MSI* 57 (1), S. 3–6. Online verfügbar unter <https://eureka-mag.com/research/003/770/003770894.php>.

Glatz-Hoppe, J. S. (2019): Weiterentwicklung von Bewertungswerkzeugen zur Charakterisierung der Versorgungssituation von Milchkühen mittels Daten aus der Milchkontrolle. Universität Rostock. Dissertation.

Gomes, F.; Saavedra, M. J.; Henriques, M. (2016): Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. In: *Pathog. Dis.* 74 (3). DOI: 10.1093/femspd/ftw006.

Gösling, M.; Klocke, D.; Reinecke, F.; Zoche-Golob, V.; Tho Seeth, M.; Paduch, J.-H.; Krömker, V. (2019): Pasture-associated influence on the udder health of dairy herds in Northern Germany. In: *MSI* 72 (1), S. 2–10.

Gösling, M.; Klocke, D.; Reinecke, F.; Zoche-Golob, V.; Tho Seeth, M.; Paduch, J.-H.; Krömker, V. (2021): Associations of husbandry management factors with the new infection risk of bovine intramammary infections in lactation of dairy herds in Northern Germany. In: *MSI* 74 (1), S. 1–8. DOI: 10.48435/MSI.2021.1.

- Green, M. J.; Green, L. E.; Medley, G. F.; Schukken, Y. H.; Bradley, A. J. (2002): Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. In: *J. Dairy Sci.* 85 (10), S. 2589–2599. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74343-9.
- Groh, L. J.; Mansfeld, R.; Baumgartner, C.; Sorge, U. S. (2022): Apparent prevalence and risk factors for udder skin diseases and udder edema in Bavarian dairy herds. In: *J. Dairy Sci.* 105 (12), S. 9934–9943. DOI: 10.3168/jds.2022-21867.
- Guzmán-Soto, I.; McTiernan, C.; Gonzalez-Gomez, M.; Ross, A.; Gupta, K.; Suuronen, E. J.; Mah, T.-F.; Griffith, M.; Alarcon, E. I. (2021): Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. In: *iScience* 24 (5), S. 102443. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102443.
- Hagnestam, C.; Emanuelson, U.; Berglund, B. (2007): Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. In: *J. Dairy Sci.* 90 (5), S. 2260–2270. DOI: 10.3168/jds.2006-583.
- Hansmann, V. K.; Volling O; Krömker, V. (2019): Udder health in organic dairy herds in Northern Germany. In: *MSI* 72 (3), S. 16–24.
- Hensen, S. M.; Pavčić, M. J.; Lohuis, J. A.; Hoog, J. A. de; Poutrel, B. (2000): Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. In: *J. Dairy Sci.* 83 (9), S. 1966–1975. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75073-9.
- Hillerton, Eric (Hg.) (2000): Detecting Mastitis Cow-Side. 39th National Mastitis Council. Atlanta, GA, USA, 13-16. February. Annual Meeting Proceedings.
- Hohmann, M.-F.; Wenthe, N.; Zhang, Y.; Krömker, V. (2020): Bacterial Load of the Teat Apex Skin and Associated Factors at Herd Level. In: *Animals* 10 (9), S. 1647. DOI: 10.3390/ani10091647.
- Hossain, M. K.; Paul, S, Hossain, MM; Islam; Alam, M. G. (2017): Bovine Mastitis and Its Therapeutic Strategy Doing Antibiotic Sensitivity Test. In: *Austin J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 4 (1), S. 1–12. DOI: 10.26420/austinjvetscianimhusb.2017.1030.
- Hussain, R.; Javed, M. T.; Khan, A.; Mahmood, F.; Kausar, R. (2012): Mastitis and associated histo-pathological consequences in the context of udder morphology. In: *Int J Aric Biol* 14 (6), S. 947–952.
- Jamali, H.; Barkema, H. W.; Jacques, M.; Lavallée-Bourget, E.-M.; Malouin, F.; Saini, V.; Stryhn, H.; Dufour, S. (2018): Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. In: *J. Dairy Sci.* 101 (6), S. 4729–4746. DOI: 10.3168/jds.2017-13730.

Jong, E. de; Creyten, L.; Vlieghe, S. de; McCubbin, K. D.; Baptiste, M.; Leung, A. A.; Speksnijder, D.; Dufour, S.; Middleton, J. R.; Ruegg, P. L.; Lam, T. J. G. M.; Kelton, D. F.; McDougall, S.; Godden, S. M.; Lago, A.; Rajala-Schultz, P. J.; Orsel, K.; Krömker, V.; Kastelic, J. P.; Barkema, H. W. (2023a): Selective treatment of nonsevere clinical mastitis does not adversely affect cure, somatic cell count, milk yield, recurrence, or culling: A systematic review and meta-analysis. In: *J. Dairy Sci.* 106 (2), S. 1267–1286. DOI: 10.3168/jds.2022-22271.

Jong, E. de; McCubbin, K. D.; Speksnijder, D.; Dufour, S.; Middleton, J. R.; Ruegg, P. L.; Lam, T. J. G. M.; Kelton, D. F.; McDougall, S.; Godden, S. M.; Lago, A.; Rajala-Schultz, P. J.; Orsel, K.; Vlieghe, S. de; Krömker, V.; Nobrega, D. B.; Kastelic, J. P.; Barkema, H. W. (2023b): Invited review: Selective treatment of clinical mastitis in dairy cattle. In: *J. Dairy Sci.* 106 (6), S. 3761–3778. DOI: 10.3168/jds.2022-22826.

Keefe, G. (2012): Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. In: *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28 (2), S. 203–216. DOI: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010.

Kelly, P.; O'Sullivan, K.; Berry, D.; More, S.; Meaney, W.; O'Callaghan, E.; O'Brien, B. (2009): Farm management factors associated with bulk tank somatic cell count in Irish dairy herds. In: *Ir Vet J* 62 Suppl 4 (Suppl 4), S45-51. DOI: 10.1186/2046-0481-62-S4-S45.

Kibebew, K. (2017): Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View. In: *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. Online verfügbar unter <https://www.semanticscholar.org/paper/Bovine-Mastitis%3A-A-Review-of-Causes-and-Point-of-Kibebew/844fd9630171cea031c6b97b77f5da8a4a16cb90>.

Kiesner, K.; Wente, N.; Volling, O.; Krömker, V. (2016): Selection of cows for treatment at dry-off on organic dairy farms. In: *J. Dairy Res.* 83 (4), S. 468–475. DOI: 10.1017/S0022029916000662.

Köllmann, K.; Zhang, Y.; Wente, N.; Lücken, A.; Leimbach, S.; Krömker, V. (2021): Effects of Suckling on the Udder Health of Foster Cows. In: *Ruminants* 1 (2), S. 100–117. DOI: 10.3390/ruminants1020008.

Krömker, V. (Hg.) (2007): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. 43 Abbildungen, 65 Tabellen. Unter Mitarbeit von Rupert M. Bruckmaier, Hermann Frister, Thomas Kützemeier, Lutz Rudzik, Torsten Sach und Peter Zangerl. Stuttgart: Parey, S. 47–51.

Krömker, V.; Friedrich, J.; Klocke, D. (2008): Ausscheidung und Nachweis von *Staphylococcus aureus* über Milch aus infizierten Milchdrüsenvierteln. In: *Tierarztl Prax Ausg G* 36 (06), S. 389–392. DOI: 10.1055/s-0038-1623865.

Krömker, V.; Leimbach, S. (2017): Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. In: *Reprod. Domest. Anim.* 52 Suppl 3, S. 21–29. DOI: 10.1111/rda.13032.

Krömker, V.; Paduch, J.-H.; Bormann, A.; Friedrich, J.; Zinke, C. (2010): Nachweisverfahren zur Beurteilung der Keimbelastung in Einstreumaterialien und des daraus resultierenden Mastitisrisikos. In: *Tierärztl Prax Ausg G* 38 (02), S. 73–78. DOI: 10.1055/s-0038-1623840.

Krömker, V.; Schmenger, A.; Klocke, D.; Mansion-de Vries, E. M.; Wente, N.; Zhang, Y.; Leimbach, S. (2021): Non-inferiority Trial Investigating the Efficacy of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Antimicrobial Treatment of Mild to Moderate Clinical Mastitis in Dairy Cows With Long-lasting Udder Diseases. In: *Front. Vet. Sci.* 8, S. 1–11. DOI: 10.3389/fvets.2021.660804.

Krömker, V.; Volling, O. (Hg.) (2013): Status der Eutergesundheit in Milchviehherden auf der Basis von Daten der Milchleistungsprüfung in Niedersachsen. Unter Mitarbeit von D. Neuhoﬀ, C. Stumm, S. Ziegler, G. Rahmann, U. Hamm und U. Köpke. Ideal und Wirklichkeit - Perspektiven Ökologischer Landbewirtschaftung. 12. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau. Bonn, 5.-8. März. Berlin: Dr. Köster.

Krömker, V.; Volling, O.; Gauly, M. (2013): Strategien für eine herausragende Eutergesundheit in Milchviehbetrieben. In: *Veterinärspiegel* 23 (03), S. 128–130. DOI: 10.1055/s-0033-1350775.

Kruif, A.; Mansfeld, R.; Hoedemaker, M. (Hg.) (2007): Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. 96 Tabellen. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Enke, S. 103–270.

LKV Bayern (2021): Leistungsprüfung und Beratung in der Milchviehhaltung in Bayern 2021. Hg. v. Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. Online verfügbar unter <https://www.lkv.bayern.de/lkv-bayern/>, zuletzt geprüft am 20.02.2023.

Lowe, J. L.; Stone, A. E.; Akers, K. A.; Clark, J. D.; Bewley, J. M. (2015): Effect of alley-floor scraping frequency on *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, environmental *Streptococcus* species, and coliform counts. In: *Prof. Anim. Sci.* 31 (3), S. 284–289. DOI: 10.15232/pas.2015-01385.

Magro, S.; Costa, A.; Santinello, M.; Penasa, M.; Marchi, M. de (2023): Udder health-related traits in cow milk: phenotypic variability and effect on milk yield and composition. In: *animal* 17 (6), S. 100823. DOI: 10.1016/j.animal.2023.100823.

McMullen, C. K.; Sargeant, J. M.; Kelton, D. F.; Churchill, K. J.; Cousins, K. S.; Winder, C. B. (2021): Modifiable management practices to improve udder health in dairy cattle during the dry period and early lactation: A scoping review. In: *Journal of dairy science* 104 (9), S. 10143–10157. DOI: 10.3168/jds.2020-19873.

- Mollenhorst, H.; van der Tol, P. P. J.; Hogeveen, H. (2010): Somatic cell count assessment at the quarter or cow milking level. In: *J. Dairy Sci.* 93 (7), S. 3358–3364. DOI: 10.3168/jds.2009-2842.
- Monsallier, F.; Verdier-Metz, I.; Agabriel, C.; Martin, B.; Montel, M.-C. (2012): Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. In: *Dairy Sci. Technol.* 92 (3), S. 265–278. DOI: 10.1007/s13594-012-0064-7.
- Moussavi, H. A.; Mesgaran, M. D.; Gilbert, R. O. (2012): Effect of mastitis during the first lactation on production and reproduction performance of Holstein cows. In: *Trop Anim Health Prod* 44 (7), S. 1567–1573. DOI: 10.1007/s11250-012-0107-3.
- Müller, S. (2022): Erfassung des Gesundheitszustandes von Fleckviehkühen anhand eines Euter- und Pansen-scoring und Veränderungen nach Eingabe der Animal Health Vision Lösungen auf zwei bayerischen Milchviehbetrieben, Freising. Hochschule Weihenstephan-Triesdorf. Fakultät Agrar- und Energiesysteme. Bachelor Thesis.
- Müller, S.; Nitz, J.; Tellen, A.; Klocke, D.; Krömker, V. (2023): Effect of Antibiotic Compared to Non-Antibiotic Dry Cow Treatment on the Bacteriological Cure of Intramammary Infections during the Dry Period—A Retrospective Cross-Sectional Study. In: *Antibiotics* 12 (3), S. 429. DOI: 10.3390/antibiotics12030429.
- Müller, U.; Sauerwein, H. (2010): A comparison of somatic cell count between organic and conventional dairy cow herds in West Germany stressing dry period related changes. In: *Livestock Science* 127 (1), S. 30–37. DOI: 10.1016/j.livsci.2009.08.003.
- Munoz, M. A.; Ahlström, C.; Rauch, B. J.; Zadoks, R. N. (2006): Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. In: *J. Dairy Sci.* 89 (9), S. 3425–3430. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72379-7.
- Nitz, J.; Wente, N.; Zhang, Y.; Klocke, D.; Tho Seeth, M.; Krömker, V. (2021): Dry Period or Early Lactation-Time of Onset and Associated Risk Factors for Intramammary Infections in Dairy Cows. In: *Pathogens* 10 (2). DOI: 10.3390/pathogens10020224.
- Oltenacu, P. A.; Broom, D. M. (2010): The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. In: *Anim. Welf.* 19 (S1), S. 39–49. DOI: 10.1017/S0962728600002220.
- Osterås, O.; Whist, A. C.; Sølverød, L. (2008): Risk factors for isolation of *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus dysgalactiae* from milk culture obtained approximately 6 days post calving. In: *J. Dairy Res.* 75 (1), S. 98–106. DOI: 10.1017/S0022029907002890.
- Pantoja, J. C. F.; Hulland, C.; Ruegg, P. L. (2009): Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. In: *J. Dairy Sci.* 92 (1), S. 139–148. DOI: 10.3168/jds.2008-1477.

Patel, K.; Godden, S. M.; Royster, E.; Crooker, B. A.; Timmerman, J.; Fox, L. (2019): Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. In: *J. Dairy Res.* 102 (11), S. 10213–10234. DOI: 10.3168/jds.2019-16692.

Pedersen, R. R.; Krömker, V.; Bjarnsholt, T.; Dahl-Pedersen, K.; Buhl, R.; Jørgensen, E. (2021): Biofilm Research in Bovine Mastitis. In: *Front. Vet. Sci.* 8, S. 656810. DOI: 10.3389/fvets.2021.656810.

Piepers, S.; Deberdt, K.; Visscher, A.; Verbeke, J.; Vliegheer, S. (Hg.) (2011): Immunological response to an experimental intramammary inoculation with a killed *Staphylococcus aureus* strain in vaccinated and non-vaccinated lactating dairy cows. 3rd International symposium on Mastitis and Milk Quality ; 44th Annual conference of the American Association for Bovine Practitioners. St Louis, MO, USA, 22.09.2011: American Association for Bovine Practitioners (AABP); National Mastitis Council (NMC). Online verfügbar unter <https://biblio.ugent.be/publication/2137671>.

Pinzón-Sánchez, C.; Ruegg, P. L. (2011): Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. In: *J. Dairy Sci.* 94 (7), S. 3397–3410. DOI: 10.3168/jds.2010-3925.

Poojary, M. M.; Putnik, P.; Bursać Kovačević, D.; Barba, F. J.; Lorenzo, J. M.; Dias, D. A.; Shpigelman, A. (2017): Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. In: *J Food Compost Anal* 61, S. 28–39. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.04.007.

PräRi (2020): Tiergesundheit, Hygiene und Biosicherheit in deutschen Milchkuhbetrieben. eine Prävalenzstudie (PraeRi). Online verfügbar unter https://ibei.tiho-hannover.de/praeRi/pages/69#_AB, zuletzt geprüft am 20.02.2023.

Reneau, J. K.; Seykora, A. J.; Heins, B. J.; Endres, M. I.; Farnsworth, R. J.; Bey, R. F. (2005): Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. In: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227 (8), S. 1297–1301. DOI: 10.2460/javma.2005.227.1297.

Rowbotham, R. F.; Ruegg, P. L. (2016): Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. In: *J. Dairy Sci.* 99 (6), S. 4707–4717. DOI: 10.3168/jds.2015-10675.

Ruegg, P. L. (2017): A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. In: *J. Dairy Sci.* 100 (12), S. 10381–10397. DOI: 10.3168/jds.2017-13023.

Ruegg, P. L. (2018): Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. In: *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34 (3), S. 413–425. DOI: 10.1016/j.cvfa.2018.06.002.

Ruegg, P. L. (2021): What Is Success? A Narrative Review of Research Evaluating Outcomes of Antibiotics Used for Treatment of Clinical Mastitis. In: *Front. Vet. Sci.* 8, S. 1–14. DOI: 10.3389/fvets.2021.639641.

Rupp, R.; Boichard, D. (2003): Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. In: *Vet. Res.* 34 (5), S. 671–688. DOI: 10.1051/vetres:2003020.

Schmenger, A.; Krömker, V. (2020): Characterization, Cure Rates and Associated Risks of Clinical Mastitis in Northern Germany. In: *Vet. Sci.* 7 (4), S. 170. DOI: 10.3390/vetsci7040170.

Schönborn, S.; Krömker, V. (2016): Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. In: *Vet. Microbiol.* 196, S. 126–128. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.10.023.

Schreiner, D. A.; Ruegg, P. L. (2002): Effects of Tail Docking on Milk Quality and Cow Cleanliness. In: *J. Dairy Sci.* 85 (10), S. 2503–2511. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74333-6.

Schreiner, D. A.; Ruegg, P. L. (2003): Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. In: *J. Dairy Sci.* 86 (11), S. 3460–3465. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73950-2.

Schwarz, D.; Santschi, D. E.; Durocher, J.; Lefebvre, D. M. (2020): Evaluation of the new differential somatic cell count parameter as a rapid and inexpensive supplementary tool for udder health management through regular milk recording. In: *Prev. Vet. Med.* 181, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105079.

Shaheen, M.; Tantary, H.; Nabi, S. (2016): A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. In: *J Adv Dairy Res* 04 (01). DOI: 10.4172/2329-888X.1000150.

Sharma, N.; Singh, N. K.; Bhadwal, M. S. (2011a): Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. In: *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 24 (3), S. 429–438. DOI: 10.5713/ajas.2011.10233.

Sharma, N.; Singh, N. K.; Singh, O. P.; Pandey, V.; Verma, P. K. (2011b): Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows. In: *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 24 (4), S. 479–484. DOI: 10.5713/ajas.2011.10220.

Sharma, T.; Das, P. K.; Ghosh, P. R.; Banerjee, D.; Mukherjee, J. (2017): Association between udder morphology and in vitro activity of milk leukocytes in high yielding crossbred cows. In: *Vet World* 10 (3), S. 342–347. DOI: 10.14202/vetworld.2017.342-347.

Sharun, K.; Dhama, K.; Tiwari, R.; Gugjoo, M. B.; Iqbal Yattoo, M.; Patel, S. K.; Pathak, M.; Karthik, K.; Khurana, S. K.; Singh, R.; Puvvala, B.; Amarpal; Singh, R.; Singh, K. P.; Chaicumpa, W. (2021): Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. In: *Vet Q* 41 (1), S. 107–136. DOI: 10.1080/01652176.2021.1882713.

Sol, J.; Sampimon, O. C.; Barkema, H. W.; Schukken, Y. H. (2000): Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. In: *J. Dairy Sci.* 83 (2), S. 278–284. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74875-2.

Spoehr, M.; Uhlenbruck, F.; Steliopoulos, P. (2014): Replacement of dry cow antibiotics by internal teat sealants in healthy udders. In: *Tierärztliche Umschau* 69 (3), S. 55–64.

Stewart, P. S.; Costerton, J. W. (2001): Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. In: *Lancet* 358 (9276), S. 135–138. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1.

Streefland, G. J.; DeRooij, J. (2021): Compositions For Disrupting Biofilm Formation And For Treating Biofilm-Related Disorders. Angemeldet durch AHV INT(NL) am 12.03.2021. Anmeldenr: WO2021NL50168 20210312. Veröffentlichungsnr: WO2021182958 (A1). Patentanmeldung. A61K31/255;A61L2/00;A61P31/00;A61P31/04;A61P31/10. Prioritätsdaten: EP20200163157 20200313.

Svennesen, L.; Nielsen, S. S.; Mahmmod, Y. S.; Krömker, V.; Pedersen, K.; Klaas, I. C. (2019): Association between teat skin colonization and intramammary infection with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in herds with automatic milking systems. In: *J. Dairy Sci.* 102 (1), S. 629–639. DOI: 10.3168/jds.2018-15330.

tho Seeth, M.; Hoedemaker, M.; Krömker, V. (2015): Die physiologischen Vorgänge im Eutergewebe der Milchkuh während der Trockenstehperiode. In: *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, S. 76–83. DOI: 10.2376/0005--9366-128--76.

tho Seeth, M.; Zoche-Golob, V.; Kiesner, K.; Krömker, V. (2014): Trockenperiode und Eutergesundheit. In: *Tierärztliche Umschau* (69), S. 470–473.

Vaarst, M.; Bennedsgaard, T. W. (2002): Reduced Medication in Organic Farming with Emphasis on Organic Dairy Production. In: *Acta Vet Scand* 43 (Suppl 1), S51. DOI: 10.1186/1751-0147-43-S1-S51.

Vaarst, M.; Bennedsgaard, T. W.; Klaas, I.; Nissen, T. B.; Thamsborg, S. M.; Østergaard, S. (2006): Development and daily management of an explicit strategy of nonuse of antimicrobial drugs in twelve Danish organic dairy herds. In: *J. Dairy Sci.* 89 (5), S. 1842–1853. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72253-6.

Vaarst, M.; Thamsborg, S. M.; Bennedsgaard, T. W.; Houe, H.; Enevoldsen, C.; Aarestrup, F. M.; Snoo, A. de (2003): Organic dairy farmers' decision making in the first 2

years after conversion in relation to mastitis treatments. In: *Livestock Production Science* 80 (1-2), S. 109–120. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00310-X.

Valle, P. S.; Lien, G.; Flaten, O.; Koesling, M.; Ebbesvik, M. (2007): Herd health and health management in organic versus conventional dairy herds in Norway. In: *Livest. Sci.* 112 (1-2), S. 123–132. DOI: 10.1016/j.livsci.2007.02.005.

van der Voort, M.; Jensen, D.; Kamphuis, C.; Athanasiadis, I. N.; Vries, A. de; Hogeveen, H. (2021): Invited review: Toward a common language in data-driven mastitis detection research. In: *J. Dairy Sci.* 104 (10), S. 10449–10461. DOI: 10.3168/jds.2021-20311.

van Wagenberg, C. P. A.; Haas, Y. de; Hogeveen, H.; van Krimpen, M. M.; Meuwissen, M. P. M.; van Middelaar, C. E.; Rodenburg, T. B. (2017): Animal Board Invited Review: Comparing conventional and organic livestock production systems on different aspects of sustainability. In: *animal* 11 (10), S. 1839–1851. DOI: 10.1017/S175173111700115X.

Vasquez, A. K.; Nydam, D. V.; Foditsch, C.; Wieland, M.; Lynch, R.; Eicker, S.; Virkler, P. D. (2018): Use of a culture-independent on-farm algorithm to guide the use of selective dry-cow antibiotic therapy. In: *J. Dairy Sci.* 101 (6), S. 5345–5361. DOI: 10.3168/jds.2017-13807.

Versen, F.; Hümmer, C.; Bohlsen, E.; Coenen, D.; Kammer, M.; Jungwirth, J. et al. (Hg.) (2021): Analyse und Vergleich von Milchviehbetrieben mit besonders hoher Lebensleistung hinsichtlich Haltung, Fütterung und Management. KTBL Schrift 523. Unter Mitarbeit von Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL). 53. Internationalen Arbeitstagung, Angewandte Ethologie bei Nutztieren der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG), 25. - 26. 11. Darmstadt: KTBL.

Vicario, D.; Degano, L.; Carnier, P. (2005): Test-day model for national genetic evaluation of somatic cell count in Italian Simmental population. In: *IB* (33), S. 171. Online verfügbar unter <https://journal.interbull.org/index.php/ib/article/view/1022>.

Visscher, A. de; Piepers, S.; Haesebrouck, F.; Vliegheer, S. de (2016): Intramammary infection with coagulase-negative staphylococci at parturition: Species-specific prevalence, risk factors, and effect on udder health. In: *J. Dairy Sci.* 99 (8), S. 6457–6469. DOI: 10.3168/jds.2015-10458.

Vitali, A.; Felici, A.; Lees, A. M.; Giacinti, G.; Maresca, C.; Bernabucci, U.; Gaughan, J. B.; Nardone, A.; Lacetera, N. (2020): Heat load increases the risk of clinical mastitis in dairy cattle. In: *J. Dairy Sci.* 103 (9), S. 8378–8387. DOI: 10.3168/jds.2019-17748.

Volling, O. (2011): Eutergesundheitsmanagement in Milchviehherden mit sehr niedrigem Herdensammelmilchzellgehalt in Niedersachsen, Göttingen. Georg-August-Universität. Fakultät für Agrarwissenschaften. Dissertation.

Volling, O.; Krömker, V.; Brinkmann, J.; March, S.; Weiler, M.; Weiß, M. et al. (Hg.) (2011): Haltungshygiene und Eutergesundheit in ökologisch geführten Milchviehbetrieben. Unter Mitarbeit von G. Leithold, K. Becker, C. Brock, S. Fischinger, A.-K. Spiegel, K. Spory et al. 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau. Gießen, 15.-18.03. Justus-Liebig-Universität Gießen. 2 Bände. Berlin: Dr. Köster (2).

Volling, O.; Krömker, V.; Sieglerschmidt E. (Hg.) (2005): Untersuchungen zur Beziehung zwischen dem ökonomischen Gewinn und Indikatoren der Tiergesundheit in Milchviehbetrieben des ökologischen Landbaus in Niedersachsen. Relationship between the economic profit and animal health indicators in organic dairy farms in lower saxony. Unter Mitarbeit von Julia Heß und G. Rahmann. Ende der Nische, Beiträge zur 8. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau. Kassel. Kassel University: Kassel University press GmbH.

Vollstedt, C.; Streit, W. (2021): Quorum Quenching. 142-149 Seiten / Biologie in unserer Zeit, Bd. 51 Nr. 2 (2021): Kieselalgen. In: *Biol. Unserer Zeit* 51 (2), S. 142–149. DOI: 10.11576/biuz-4250.

Wagenaar, J.-P.; Klocke, P.; Butler, G.; Smolders, G.; Nielsen, J. H.; Canever, A.; Leifert, C. (2011): Effect of production system, alternative treatments and calf rearing system on udder health in organic dairy cows. In: *NJAS-WAGEN J Life Sci* 58 (3-4), S. 157–162. DOI: 10.1016/j.njas.2011.06.001.

Washburn, S. P.; White, S. L.; Green, J. T.; Benson, G. A. (2002): Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. In: *J. Dairy Sci.* 85 (1), S. 105–111. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74058-7.

Weiß, C. (Hg.) (2019): Basiswissen medizinische Statistik. Springer-Verlag GmbH. 7. vollständige und überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 207–209.

Weller, R. F.; Bowling, P. J. (2000): Health status of dairy herds in organic farming. In: *Vet. Rec.* 146 (3), S. 80–81. DOI: 10.1136/vr.146.3.80.

Wieland, M.; Nydam, D. V.; Älveby, N.; Wood, P.; Virkler, P. D. (2018): Short communication: Teat-end shape and udder-level milking characteristics and their associations with machine milking-induced changes in teat tissue condition. In: *J. Dairy Sci.* 101 (12), S. 11447–11454. DOI: 10.3168/jds.2018-15057.

Winter, P. M. (2009): Praktischer Leitfaden Mastitis. Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand. Unter Mitarbeit von Christian Burvenich, Henk Hogeeven, Francesca Nijenhuis, Morten Dem Rasmussen, Florian J. Schweigert, Bart de Spiegeleer und Hans-Heinrich Zehle. Stuttgart: Parey, S. 23–174.

Wittek, T.; Tichy, A.; Grassauer, B.; Egger-Danner, C. (2018): Retrospective analysis of Austrian health recording data of antibiotic or nonantibiotic dry-off treatment on milk yield,

somatic cell count, and frequency of mastitis in subsequent lactation. In: *J. Dairy Sci.* 101 (2), S. 1456–1463. DOI: 10.3168/jds.2017-13385.

Zadoks, R. N.; Middleton, J. R.; McDougall, S.; Katholm, J.; Schukken, Y. H. (2011): Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16 (4), S. 357–372. DOI: 10.1007/s10911-011-9236-y.

Zadoks, R. N.; Tikofsky, L. L.; Boor, K. J. (2005): Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. In: *Vet. Microbiol.* 109 (3-4), S. 257–265. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.05.008.

Zapata-Salas, R.; Guarín, J. F.; Ríos-Osorio, L. A. (2022): Udder health, conceptual construct, and uses of the term: A systematic review from 1962 to 2019. In: *Vet World* 15 (4), S. 855–869. DOI: 10.14202/vetworld.2022.855-869.

Zecconi, A.; Dell'Orco, F.; Vairani, D.; Rizzi, N.; Cipolla, M.; Zanini, L. (2020): Differential Somatic Cell Count as a Marker for Changes of Milk Composition in Cows with Very Low Somatic Cell Count. In: *Animals* 10 (4), S. 604. DOI: 10.3390/ani10040604.

Zeiler, E.; Bechter, M. (2019): Pro Gesund im LKV-Herdenmanager. 3. Auflage. Hg. v. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft und LKV Bayern.

Zhang, Z.; Li, X. P.; Yang, F.; Luo, J. Y.; Wang, X. R.; Liu, L. H.; Li, H. S. (2016): Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. In: *J. Dairy Sci.* 99 (8), S. 6484–6493. DOI: 10.3168/jds.2016-10932.

Zhao, X.; Lacasse, P. (2008): Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. In: *J. Anim. Sci.* 86 (13 Suppl), S. 57–65. DOI: 10.2527/jas.2007-0302.

Zhao, X.; Ponchon, B.; Lanctôt, S.; Lacasse, P. (2019): Invited review: Accelerating mammary gland involution after drying-off in dairy cattle. In: *J. Dairy Sci.* 102 (8), S. 6701–6717. DOI: 10.3168/jds.2019-16377.

Zigo, F.; Farkašová, Z.; Výrostková, J.; Regecová, I.; Ondrašovičová, S.; Vargová, M.; Sasáková, N.; Pecka-Kielb, E.; Bursová, Š.; Kiss, D. S. (2022): Dairy Cows' Udder Pathogens and Occurrence of Virulence Factors in Staphylococci. In: *Animals* 12 (4). DOI: 10.3390/ani12040470.

Zigo, F.; Vasil', M.; Ondrašovičová, S.; Výrostková, J.; Bujok, J.; Pecka-Kielb, E. (2021): Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. In: *Front. Vet. Sci.* 8, S. 1–17. DOI: 10.3389/fvets.2021.607311.

12 Anhang

12.1 100 Tage Leistungen der Tiere am konventionellen und ökologischen Betrieb

In Tabelle A1 ist ein Überblick über die Entwicklung der 100 Tage Leistung der Kühe am konventionellen Betrieb gegeben.

Tabelle A1 100 Tage Leistung der ausgewerteten Kühe am konventionellen Betrieb sortiert nach der aktuellen Laktationsnummer

aktuelle Laktationsnummer	100 Tage Leistung in kg in der Laktation 2021	100 Tage Leistung in kg in der Laktation 2022	Differenz in kg Milch	Differenz in %	Behandlungen im Versuchszeitraum
2	3093	3653	560	18%	ja
2	3278	3583	305	9%	ja
2	2957	3379	422	14%	ja
2	2630	3581	950	36%	ja
2	3098	4296	1197	39%	nein
2	2011	2665	654	33%	nein
2	2436	4218	1782	73%	nein
2	3969	4126	157	4%	nein
2	1997	2958	961	48%	nein
3	3718	4604	886	24%	ja
3	4447	4688	241	5%	ja
3	3624	3696	72	2%	nein
4	4331	4211	-120	-3%	ja
4	4273	3447	-826	-19%	ja
5	4482	4435	-46	-1%	ja
6	3788	3657	-131	-3%	nein
7	3767	3700	-67	-2%	ja
8	2343	2014	-330	-14%	nein
Ø prozentuale Entwicklung				+ 15%	

In Tabelle A2 ist ein Überblick über die Entwicklung der 100 Tage Leistung der Kühe am ökologischen Betrieb gegeben.

Tabelle A2 100 Tage Leistung der ausgewerteten Kühe am ökologischen Betrieb sortiert nach der aktuellen Laktationsnummer

aktuelle Laktationsnummer	100 Tage Leistung in kg in der Laktation 2021	100 Tage Leistung in kg in der Laktation 2022	Differenz in kg Milch	Differenz in %	Behandlungen im Versuchszeitraum
3	4439	4065	-374	-8%	ja
3	2981	2657	-325	-11%	ja
3	3436	2988	-448	-13%	ja
3	2895	2863	-32	-1%	nein
4	3541	3275	-266	-8%	ja
4	2861	2740	-121	-4%	nein
4	3169	2581	-588	-19%	nein
4	3967	3456	-511	-13%	nein
4	3424	3301	-123	-4%	nein
5	3748	3281	-467	-12%	ja
5	3377	3369	-9	0%	ja
5	3333	2680	-653	-20%	ja
5	3418	3717	299	9%	ja
5	3549	3053	-496	-14%	nein
5	2752	2764	11	0%	nein
6	3176	2714	-462	-15%	ja
6	3351	3560	209	6%	nein
7	3573	2954	-619	-17%	nein
7	3871	3161	-710	-18%	nein
8	2626	2658	32	1%	ja
<i>Ø prozentuale Entwicklung</i>				-8%	

12.2 Deskriptive Analyse der Zellzahlverläufe um die Trockenstehperiode

In der Tabelle A3 ist die zu Abbildung 12 und Abbildung 13 zugehörige deskriptive Statistik aufgeführt. Bei neun Tieren des konventionellen Betriebes gab es keine letzte PM vor dem TS 2021, da diese Tiere zu dem genannten Zeitpunkt hochtragende Kalbinnen waren. Dementsprechend hatten diese neun Tiere in ihrem Leben erst eine Trockenstehperiode, die sich zwischen ihrer 1. und 2. Laktation erstreckte. Daher konnten sie bei der Auswertung des Infektionsgeschehens über die Trockenstehperiode nicht berücksichtigt werden.

Tabelle A3 Deskriptive Analyse zu den Zellzahlen in 1000/ml in der Probemelkung vor dem Trockenstellen und in den ersten drei Probemelkungen in der Folgelaktation in den Laktationen 2021 und 2022 für beide Betriebe getrennt

Konventioneller Betrieb								
	2021				2022			
	Letzte PM a.p.	1. PM	2. PM	3. PM	Letzte PM a.p.	1. PM	2. PM	3. PM
n	9	9	9	9	9	9	9	9
Mean	122	572	157	296	237	564	435	153
Q 25%	41	54	23	16	49	154	111	65
Median	107	114	91	38	151	401	124	80
Q 75%	131	662	106	59	413	692	308	215
Ökologischer Betrieb								
	2021				2022			
	Letzte PM a.p.	1. PM	2. PM	3. PM	Letzte PM a.p.	1. PM	2. PM	3. PM
n	20	20	20	20	20	20	20	20
Mean	131	89	72	43	156	225	313	293
Q 25%	68	17	19	16	74	17	16	22
Median	119	31	27	20	88	52	42	65
Q 75%	164	90	42	33	218	177	243	116

PM, Probemelkung; a.p., ante partum (vor der Geburt); Q 25%, Quartil 25, Q 75%, Quartil 75

12.3 Deskriptive Analyse der Zellzahlen während der Laktation

In der Tabelle A4 ist die zu Abbildung 18 und Abbildung 19 zugehörige deskriptive Statistik aufgeführt.

Tabelle A4 Deskriptive Analyse zu den Zellzahlen in 1000/ml in der Probemelkung in den ersten fünf Probemelkungen in der Laktationen 2021 und 2022 für beide Betriebe getrennt

Konventioneller Betrieb										
	2021					2022				
	1. PM 2021	2. PM 2021	3. PM 2021	4. PM 2021	5. PM 2021	1. PM 2022	2. PM 2022	3. PM 2022	4. PM 2022	5. PM 2022
n	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Mean	340	185	191	515	267	470	324	230	354	459
Q 25%	35	25	29	25	37	94	73	55	54	64
Median	63	39	40	59	71	190	131	87	87	127
Q 75%	59	171	101	153	189	602	280	229	214	552
Ökologischer Betrieb										
	2021					2022				
	1. PM 2021	2. PM 2021	3. PM 2021	4. PM 2021	5. PM 2021	1. PM 2022	2. PM 2022	3. PM 2022	4. PM 2022	5. PM 2022
n	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Mean	89	72	43	87	52	225	313	293	316	92
Q 25%	17	19	16	11	14	17	16	22	20	24
Median	31	27	20	24	23	52	42	65	32	53
Q 75%	90	42	33	52	59	177	243	116	109	108

PM, Probemelkung; Q 25%, Quartil 25, Q 75%, Quartil 75

12.4 Prävalenz und Inzidenz von Mastitis

Beim konventionellen Betrieb stieg sowohl Inzidenz als auch die Prävalenz von Mastitis in den ersten 100 Laktationstagen stark an. Beim ökologischen Betrieb blieben diese Parameter in den Laktationen weitestgehend unverändert (siehe Tabelle A5).

Tabelle A5 Inzidenz und Prävalenz von Mastitis in den ersten 100 Laktationstagen in den Laktationen 2021 und 2022

	Betrieb Konventionell	Betrieb Ökologisch
Inzidenz von Mastitis in den ersten 100 DIM in der Laktation 2021	5,6% (1)	30,0% (6)
Inzidenz von Mastitis in den ersten 100 DIM in der Laktation 2022	44,4% (8)	30,0% (6)
<i>Differenz 2022 / 2021</i>	+ 38,9%	0,0%
Prävalenz von Mastitis in den ersten 100 DIM in der Laktation 2021	5,6% (1)	30,0% (6)
Prävalenz von Mastitis in den ersten 100 DIM in der Laktation 2022	50,0% (9)	35,0% (7)
<i>Differenz 2022 / 2021</i>	+ 44,4%	+ 5,0%

(FETT) = die fett gedruckten Zahlen geben die absoluten Zahlen an Tieren wieder; DIM, days in milk

12.5 Verteilung der Rast- und Gützeiten am konventionellen und ökologischen Betrieb

Tabelle A6 und Tabelle A7 geben einen Überblick über die wichtigsten Fruchtbarkeitskennzahlen nach Betrieben getrennt.

Tabelle A6 Deskriptive Analyse zur Rastzeit und Gützeit der ausgewerteten Tiere im konventionellen Betrieb in den Laktationen 2021 und 2022

Fruchtbarkeitskennzahlen	Rastzeit (d) 2021	Gützeit (d) 2021	Rastzeit (d) 2022	Gützeit (d) 2022
n	12	12	12	12
Mean	68,4	106,9	66,8	112,8
Q 25%	54,8	54,8	46,3	64
Median	67,5	84,5	64	104
Q 75%	80,8	160,5	82,6	153,5

Tabelle A7 Deskriptive Analyse zur Rastzeit und Gützeit der ausgewerteten Tiere im ökologischen Betrieb in den Laktationen 2021 und 2022

Fruchtbarkeitskennzahlen	Rastzeit (d) 2021	Gützeit (d) 2021	Rastzeit (d) 2022	Gützeit (d) 2022
n	17	17	17	17
Mean	61,1	84,2	70,2	79,4
Q 25%	45,5	58	45	45
Median	56	66	64	65
Q 75%	65	109	93	106

13 Danksagung

An erster Stelle danke ich ganz besonders Frau PD Dr. Elke Rauch für die Betreuung der vorliegenden Arbeit. Die schnellen Rückmeldungen, die kontinuierliche Unterstützung und die Freiheit eigenständig an diesem Thema zu arbeiten, haben die idealen Voraussetzungen für meine Forschung geschaffen.

Frau Prof. Dr. Dr. Eva Zeiler danke ich für die gegebene Chance und das Verständnis Praxis und Promotion kombinieren zu können. Ihre fachliche Mitbetreuung meiner Arbeit und die Unterstützung bei allen Vorträgen haben nicht nur meine wissenschaftliche Entwicklung, sondern auch meine persönliche Weiterentwicklung maßgeblich beeinflusst.

Außerdem möchte ich Frau Dr. Jasmin Wenderlein und Herrn Prof. Straubinger meinen großen Dank für die gemeinsame wissenschaftliche Erarbeitung des Papers aussprechen. Die Kombination aus sachlicher Kritik, einem großen Verständnis und dem freundlichen Umgang haben eine sehr angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Frau PD Dr. Carola Sauter-Louis gebührt mein Dank für ihre geduldige Beratung in allen statistischen Angelegenheiten.

Ein ganz besonderer Dank geht an die Betriebsleiter und die Herdenmanagerin der beiden Betriebe, die sich die Zeit genommen haben Einblicke in ihren Betrieb zu gewähren und für stets für meine Fragen offen waren. Ihre aufgeschlossene Art und Ihr Engagement haben diese Arbeit erst ermöglicht. Und vielen Dank an meine studentischen Helferinnen Elisabeth Schmidt und Sabrina Müller, die mich auch in stressigen Situationen unterstützt haben.

Meinen Kolleg: innen an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf Melanie, Peter und Holger und besonders meine Bürokolleg: innen Joanna, Theresa und Florian danke ich vielmals für die tolle Zusammenarbeit. Ohne euren Austausch in beruflichen und auch privaten Angelegenheiten hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht.

Der Tierarztpraxis Freising - Pulling, insbesondere Herrn Dr. Michael Schmaußner, möchte ich für die enorme Flexibilität und die tolle Abwechslung in der Praxis danken. Ohne die gegenseitige Rücksichtnahme und die Unterstützung wäre vieles nicht möglich gewesen.

Bei der Firma AHV Germany, insbesondere Herrn Dirk Ulrich, möchte ich mich für den fachlichen Austausch und die offene Kommunikation bedanken.

Ein großer Dank geht auch an Felix für die mentale Unterstützung, das endlose Verständnis und dass du mir in jeder Situation zur Seite standst.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und besonders meinen Eltern dafür danken, dass sie immer an mich geglaubt haben und sie mir diesen Weg ermöglicht haben. Ihr Vertrauen hat mich immer wieder gestärkt und motiviert.