

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Universitätsklinik für Wiederkäuer
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Wittek, Dipl. ECBHM)

Untersuchungen zur Wirkung der Neuraltherapie bei subklinischen Mastitiden bei Milchkühen

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Würde eines

DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Mag. med. vet. Max Winkler

Wien, im November, 2022

22 **Betreuer:**

23 Sonja Franz, Ao. Univ.-Prof. Dr.,

24 Universitätsklinik für Wiederkäuer, Klinische Abteilung für Wiederkäuermedizin

25 Veterinärmedizinische Universität Wien

26

27 Thomas Wittek, Univ.-Prof. Dr., Dipl. ECBHM

28 Universitätsklinik für Wiederkäuer, Klinische Abteilung für Wiederkäuermedizin

29 Veterinärmedizinische Universität Wien

30

31 Harald Pothmann, Dr.,

32 Universitätsklinik für Wiederkäuer, Abteilung Bestandsbetreuung bei Wiederkäuern

33 Veterinärmedizinische Universität Wien

34

35 **Begutachter:**

36 Gerhard Litscher, Univ.-Prof. Dipl.-Ing, Dr., Dr.

37 Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

38 Medizinische Universität Graz

39

40 **Inhaltsverzeichnis**

41	1.	Einleitung und Fragestellung	3
42	2.	Literaturübersicht.....	6
43	3.	Publikation	12
44	4.	Erweiterte Diskussion.....	19
45	5.	Zusammenfassung.....	24
46	6.	Summary	26
47	7.	Literaturverzeichnis.....	27

48

49

1. Einleitung und Fragestellung

Die subklinische Mastitis ist definiert als eine Erkrankung des Euters von Milchkühen ohne systemische Entzündungszeichen bei gleichzeitig erhöhtem Zellgehalt in der Viertelgemelksprobe von >100.000 Zellen/ml mit oder ohne dem Nachweis von Pathogenen (International Dairy Federation 2013). Sie verursacht erhebliche wirtschaftliche Verluste mit Prävalenzen zwischen 13 % und 53 % (Fox et al. 1995) je nachdem, welche stochastische Grundgesamtheit betrachtet wird. Untersuchungen beziehen sich zum Beispiel auf das Land (Hiitiö et al. 2017), die Region (Hashemi et al. 2011), die Herde (Erskine et al. 2003) oder auch verschiedene Methoden der Zellgehaltsmessungen (Narayana et al. 2018). Durchschnittlich entstehen pro Jahr und pro Fall Kosten von ca. 1.000 € bis 1.300 € (van den Borne et al. 2010a). Die subklinische Mastitis führt zu einer verringerten Milchleistung bei Milchkühen (Seegers et al. 2003; Halasa et al. 2007). Auf Herdenebene führt ab 200.000 somatische Zellen/ml Milch jede weitere Zunahme um 100.000 somatischen Zellen/ml Milch zu einem Abfall der Milchleistung um 2,5 % (Bradley und Green 2005). Darüber hinaus stellen die verursachenden Erreger der subklinischen Mastitis eine Gefahr für gesunde Kühe der Herde dar (Down et al. 2013). Die Therapie basiert in der Regel auf dem Einsatz von Antibiotika (McDougall et al. 2009). Die antibiotische Therapie wird sowohl während der Laktation als auch zu Beginn der Trockenstehzeit eingesetzt, systemisch oder intramammär und oft in Kombination mit Zitzenversiegeln, um das Risiko des Eindringens von Erregern über den Strichkanal zu vermindern (Golder et al. 2016).

Die Behandlung der pathogen induzierten subklinischen Mastitis mit Antibiotika stellt einen wesentlichen Beitrag zu dem weltweit hohen Verbrauch von Antibiotika dar (Krömker und Leimbach 2017). Der übermäßige Einsatz und Missbrauch von Antibiotika beim Menschen und in der Tierhaltung, beschleunigt das Auftreten von antimikrobiellen Resistenzen (Sandgren et al. 2008; WHO 2019). Aufgrund der beschriebenen Nachteile antibiotischer Behandlungen wird der Einsatz anderer Behandlungsmethoden bei Mastitiden untersucht.

80 Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Erforschung der Wirkung von Probiotika, die bei
81 in vitro Versuchen im Hinblick auf epithelialen Zellschutz hoffnungsvolle Ergebnisse
82 hervorbringen (Wu et al. 2015). Bei in vivo Applikationen zeigt sich die positive Wirkung
83 aber nicht durchgängig (Catozzi et al. 2019). Die Verringerung pathogener Mikroorga-
84 nismen kann nachgewiesen werden, aber nicht die Verringerung der Zellzahlen in der
85 Milch (Klostermann et al. 2008). Nagahata et al. (2019) wiederum konnten eine Ver-
86 ringerung pathogener Mikroorganismen sowie eine Verringerung der Zellzahlen nach
87 probiotischer Behandlung nachweisen. Im Gegensatz zu der Gabe von Antibiotika,
88 verändert sich das Mikrobiom in der Milchdrüse bei der Behandlung mit Probiotika
89 kaum (Catozzi et al. 2019). Nach der Behandlung der subklinischen Mastitis mittels
90 Schallimpulstherapie wiesen zwei Drittel der Kühe der Behandlungsgruppe wieder
91 eine für den menschlichen Verbrauch geeignete Milchqualität auf, wobei die bakterio-
92 logische Heilungsrate bei 52,6 % lag (Leitner et al. 2018). Eine weitere Möglichkeit
93 einer nicht antibiotischen Therapie der subklinischen Mastitis ist die neuraltherapeuti-
94 sche Behandlung des Ohrakupunkturpunktes für das Euter mit einem Lokalanästheti-
95 kum (Kothbauer 1999). Die Neuraltherapie ist eine Regulationstherapie (Wander und
96 Weinschenk 2012), bei der verschiedene Pharmazeutika an oder in Regionen des Kör-
97 pers injiziert werden (Zohmann und Kasper 1994). Ziel der Behandlung ist die Lö-
98 schung peripherer Reize und die Stimulation regulatorischer Prozesse. Damit soll ent-
99 weder eine Homöostase im Zielorgan erreicht, oder physiologische Prozesse im Kör-
100 per wiederhergestellt werden (Zohmann und Kasper 1994). Die Durchführung der Neu-
101 raltherapie am Ohr wird Aurikulotherapie genannt. Soweit bekannt gibt es bis dato
102 keine systematische Studie zur Verbesserung der Eutergesundheit von Milchkühen
103 durch Aurikulotherapie.

104 Die Hypothese für diese Forschungsarbeit ist, dass dreimal wiederholte Injektionen
105 von Procainhydrochlorid am Ohrakupunkturpunkt des Euters im Abstand von 48 Stun-
106 den zu einer Verringerung des Milchzellgehaltes führen.

107 Dazu wurden 85 klinisch gesunde Kühe aus neun Milchviehbetrieben an vier Studien-
108 tagen (0, 2, 4 und 6) mit einem somatischen Zellgehalt >100.000 Zellen/ml auf min-
109 destens einem Viertel an Tag 0 in die Studie aufgenommen. Während des Studien-

110 zeitraums wurde die Zellzahl von insgesamt 784 Viertel analysiert, 385 Viertel von ins-
111 gesamt 40 Kühen waren in der Kontrollgruppe und 399 Viertel von insgesamt 45 Kü-
112 hen waren in der Behandlungsgruppe. Die Auswertung der Zellzahlentwicklung er-
113 folgte hinsichtlich der Variablen Betrieb, Jahreszeit, Position der Ohrmarke, der Verlauf
114 des bakteriologischen Status, Euterhälfte, Laktationsperiode und Laktationstag.

2. Literaturübersicht

Die Aurikulothérapie ist eine Methode, bei der bestimmte Punkte des Ohres stimuliert werden. In der Literatur werden verschiedene Synonyme für den Begriff Aurikulothérapie verwendet, wie Ohrakupunktur oder Aurikularmedizin. Die Ziele der Aurikulothérapie sind Schmerzzustände, Suchtzustände oder Erkrankungen im Körper durch Stimulation von bestimmten Ohrakupunkturpunkten zu behandeln, um Homöostase im Zielorgan zu erreichen (Soliman und Frank 1999; Gori und Firenzuoli 2007; Nogier 2014; Litscher und Litscher 2016).

Generell wird das Ohr von Hirn- und Spinalnerven innerviert. Beim Menschen sind das der *N. auriculotemporalis*, der aurikuläre Ast des *N. vagus*, der *N. occipitalis minor* und der *N. auricularis major*. Das Innervationsgebiet des aurikulären Astes ist für den Menschen bekannt. Er versorgt hauptsächlich den Bereich der Ohrmuschel und den größten Teil des Bereichs um den *Meatus acusticus* (He et al. 2012). Beim Rind wird das Ohr durch den *N. auriculotemporalis*, dem aurikulären Ast des *N. vagus*, dem *Ramus auricularis rostralis*, dem *N. auricularis major* und dem *N. auricularis caudalis* des *Ramus n. facialis* versorgt (Nickel et al. 2004). Nach einer persönlichen Mitteilung von König (Horst Erich König, am 10.07.2020) könnte die vordere Ohrmuschel des Rindes bis zu Spitze des Ohres und der *Meatus acusticus* durch den aurikulären Ast des *N. vagus* innerviert sein. Im Gegensatz zum Menschen ist das genaue Innervationsgebiet des aurikulären Asts beim Rind aber nicht bekannt. Die vagale Innervation der Milchdrüse beim Rind und dessen Funktion wird in der maßgeblichen Literatur ebenfalls nicht beschrieben (z.B. Nickel et al. 2004).

Nach Erkenntnissen aus der Neurowissenschaft ist das Immunsystem funktionell und anatomisch mit dem Nervensystem verbunden (Tracey 2002). Dabei ist die immunregulatorische Rolle des *N. vagus* bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen bereits gut untersucht (Maier et al. 1998; Bonaz et al. 2017). Die Stimulation des *N. vagus* beeinflusst den vagalen Tonus und führt zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Bildes bei entzündlichen Erkrankungen im Körper, wie zum Beispiel bei Rheumatoider Arthritis (Drewes et al. 2019), Autoimmunerkrankungen des Muskel-Skelett-

145 Systems (Courties et al. 2021) oder Reizdarmsyndrom (Pellisier et al. 2014). Die Sti-
146 mulation des *N. vagus* kann über seinen zervikalen oder aber auch über seinen auri-
147 kulären Ast erfolgen. Bei Ratten reguliert die Akupunktur des aurikulären Herzpunktes
148 die kardiovaskuläre Funktion, indem sie barorezeptor-sensitive Neuronen im *Nucleus*
149 *tractus solitarii* (NTS) aktiviert. Die Reaktion wird durch die Anästhesie des NTS mit
150 Lokalanästhetika verringert (Gao et al. 2011). Bei Mäusen mit postoperativem Ileus
151 und einer induzierten Endotoxämie wird durch die transkutane Stimulation des auriku-
152 lären Astes des *N. vagus* mit Strom die intestinale Zytokinexpression verringert und
153 die Leukozytenrekrutierung in das manipulierte Darmsegment reduziert, sowie die
154 gastrointestinale Passage verbessert. Die durch die Endotoxämie verursachte Freiset-
155 zung von Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) wird ebenfalls re-
156 duziert (Hong et al. 2018). Bei Kaninchen mit Bluthochdruck kann mittels Elektroaku-
157 punktur am Ohr der systolische und der diastolische Druck gesenkt und die Atemfre-
158 quenz erhöht werden (Xu et al. 1992). Bei Menschen mit Morbus Crohn führt die Sti-
159 mulation des aurikulären Astes des *N. vagus* zu einem erniedrigten TNF-alpha Plas-
160 maspiegel und hat somit entzündungshemmende Eigenschaften. Die Stimulation des
161 *N. vagus* stellt daher eine neue therapeutische Option für die Behandlung von Morbus
162 Crohn dar (Bonaz et al. 2017).

163 Der NTS besitzt bei der Anwendung der Aurikulotherapie eine wichtige Rolle. Mit sei-
164 nen umfangreichen Verbindungen zu viszerale Organen und anderen Hirnstrukturen
165 ist er das verbindende Element zwischen dem aurikulären Ast des *N. vagus* und den
166 Organen im Körper. Durch die Haut des äußeren Gehörgangs werden kutane Reize
167 als sensorische Informationen vom aurikulären Ast des *N. vagus* aufgenommen und
168 über afferente somatosensorische Neuronen über das *Ganglion superius nervi*
169 *glossopharyngei* in die *Medulla oblongata* und den NTS transportiert. Diesen Teil der
170 Reizweiterleitung, die das autonome und das zentrale Nervensystem umfasst, wird als
171 „aurikulovagaler afferenter Pfad“ bezeichnet (He et al. 2012). Eine Entzündung wird in
172 einem betroffenen Organ ausgelöst, indem exogene und/oder endogene molekulare
173 Produkte afferente Aktionspotentiale im *N. vagus* aktivieren. Diese Aktionspotentiale
174 steigen zum NTS und anderen Gehirnstrukturen auf (Andersson und Tracey 2012).
175 Daraufhin sind zwei verschiedene Immunantworten möglich: a) die humorale Antwort

176 durch den Transport von Entzündungszellen und Zytokinen in das Ursprungsgebiet
177 über Blut- und Lymphgefäße und b) eine neuronale Antwort über den *N. vagus*, ge-
178 nannt cholinergem Entzündungsweg. Während die humorale Antwort langsam ist, er-
179 folgt die neuronale Antwort auf eine Entzündung durch Reizleitung über das autonome
180 Nervensystem und ist deswegen schnell (Tracey 2002). Bei Ratten wird durch manu-
181 elle Stimulation des zervikalen oder aurikulären Astes des *N. vagus* die Menge an
182 zirkulierendem TNF-alpha im Serum signifikant verringert, wodurch die Reaktion des
183 Körpers auf Entzündungsfaktoren unterdrückt wird (Borovikova et al. 2000). Dieser
184 cholinerge anti-inflammatorische Weg erklärt die Wirksamkeit der Akupunktur des *N.*
185 *vagus* zur Bekämpfung eines Entzündungsgeschehens im Körper (Tracey 2002).
186 Bei verschiedenen Nutz- und Haustieren sind anatomische und physiologische Bezie-
187 hungen zwischen Ohrakupunkturpunkten und bestimmten Körperbereichen bekannt
188 (Zohmann 1989; Egerbacher und Layroutz 1996; Ambronn et al. 2001). Beim Hund
189 stimmt die Lage zahlreicher Knorpeldurchbrüche mit Gefäß-Nervenbündeln, so ge-
190 nannte Perforationen im Bereich der *Scapha* und der *Anthelix*, bis zu 80 % mit den
191 bekannten Ohrakupunkturpunkten überein (Egerbacher und Layroutz 1996). Beim
192 Rind gibt es bislang hierzu keine bekannten Daten.

193 Man unterscheidet zwischen aktiven und nicht aktiven Ohrakupunkturpunkten. Wäh-
194 rend bei Entzündungen eines Organs inaktive Ohrakupunkturpunkte histologisch keine
195 Veränderungen aufweisen, werden pathologische Veränderungen an aktiven Ohraku-
196 punkturpunkten beschrieben. Beim Hund gelingt am aktiven Ohrakupunkturpunkt der
197 histologische Nachweis zahlreicher Mastzellen, einer ausgeprägten lymphozytären In-
198 filtration und der Nachweis stark erweiterter Lymphgefäße. Dieses histologische Bild
199 wird durch einen Stimulus eines entsprechenden gereizten Organs mittels eines Neu-
200 ropeptids (Substanz P) ausgelöst, welches die Mastzellen im Bereich eines Gefäßner-
201 venbündels zur Sekretion anregt. Klinisch entsteht eine lokale Entzündungsreaktion,
202 die als Ödem der Dermis oder in weiterer Folge als Hyperämie sichtbar wird. Bei Pal-
203 pation kann es zu einer Hyperästhesie kommen. Bei chronischen Erkrankungen kön-
204 nen sichtbare Gewebsläsionen entstehen (Egerbacher und Layroutz 1996; Kothbauer
205 1999). Der elektrische Widerstand der Haut ist an aktiven Ohrakupunkturpunkten er-
206 niedrigt. Mit einem Punktesuchgerät können daher auch nicht sichtbare, aber aktive

Ohrakupunkturpunkte nachgewiesen werden (Kothbauer 1986). Letztere können ebenfalls durch Palpation und Reibung sichtbar gemacht werden. Innerhalb einer kurzen Zeitspanne entstehen nach Manipulation Rötungen und Schwellungen. Diese Reaktionen gelten als Nachweis für aktive Ohrakupunkturpunkte und können damit diagnostisch eingesetzt werden (Egerbacher und Layroutz 1996; Kothbauer 1999). Entscheidet man sich für eine Stimulation dieser Punkte, werden sie nach bekannten Techniken aus der Akupunktur behandelt. Stimuliert wird mittels Nadelung mit Akupunkturnadeln (kurzfristig mit mehreren Wiederholungen oder mittels permanenter Nadeln), Laserbehandlung (Round et al. 2013), dem Anlegen von Strom (Elektrische Akupunktur) (He et al. 2012) oder aber neuraltherapeutisch mittels Injektionen von pharmazeutischen Substanzen an den Akupunkturpunkt. Verwendete Substanzen sind homöopathische Mittel, Vitamin B1 Präparate und Lokalanästhetika (Litscher und Litscher 2016). Häufig verwendete Lokalanästhetika in der Neuraltherapie sind Lidocainhydrochlorid und Procainhydrochlorid (Zohmann und Kasper 1994). Procainhydrochlorid gehört zur chemischen Substanzklasse der Aminoester, während Lidocainhydrochlorid ein Säureamid ist. Lokalanästhetika mit Aminoestergruppen werden durch die Butyrylcholinesterase im Plasma zu para-Aminobenzoessäure hydrolysiert. Procainhydrochlorid hat eine kurze Wirkungsdauer und mit einem niedrigen Verteilungskoeffizienten den längsten Wirkungseintritt aller Lokalanästhetika. Sämtliche Lokalanästhetika unterliegen dem gleichen Mechanismus der Analgesie, nämlich der Blockade der autonomen Nervenleitung über die Hemmung von Natriumkanälen entlang der Nervenfasern und besitzen daher eine sympathikushemmende Wirkung (Wander und Weinschenk 2012; Schleip et al. 2013). In Österreich darf bei Rindern als Lebensmittel liefernde Tierart nur Procainhydrochlorid eingesetzt werden (Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen 2021). Unabhängig von der Methode ist das Ziel der Aurikulo-therapie immer die Wiederherstellung der Homöostase im Zielorgan (Litscher und Litscher 2016).

Für diese Arbeit stützt sich die Auswahl des Ohrakupunkturpunktes für das Euter beim Rind auf die Kartographie eines Rinderohres mit Ohrakupunkturpunkten des österreichischen Veterinärmediziners Oswald Kothbauer (Abb. 1). Sie stammt aus klinischen Beobachtungen an etwa 80 Rindern mit jeweils klar definierten Krankheitsbildern

(Kothbauer 1999). In dieser Kartographie wird ein Zusammenhang zwischen bestimmten Krankheiten und insgesamt 25 Projektionsstellen für beide Ohrinnenflächen hergestellt (13 rechtes Ohr, 12 linkes Ohr). Diese Korrespondenzpunkte entsprechen Ohrakupunkturpunkten. Pathologien von Organen oder einzelner Körperregionen lösen an ihren Korrespondenzpunkten im Ohr beim Rind Reaktionen aus. Reaktionen an bestimmten Korrespondenzpunkten werden für orthopädische Krankheiten an Karpal- und Tarsalgelenk, sowie für Krankheiten in Organen oder ganzen Organkomplexen wie Euter, Genital- und Intestinaltrakt, sowie bei bestimmten puerperalen Krankheiten wie *Retentio secundinarum* und Hypokalzämie beschrieben (Kothbauer 1986). Die Korrespondenzpunkte für das Euter liegen laut Kothbauer (1999) unterhalb der *Plicae auriculares longitudinales mediales* im mittleren Drittel des Ohres. Diese Position entspricht gleichzeitig der empfohlenen Position für die Identifikationsohrmarken bei Rindern (Abb. 2).

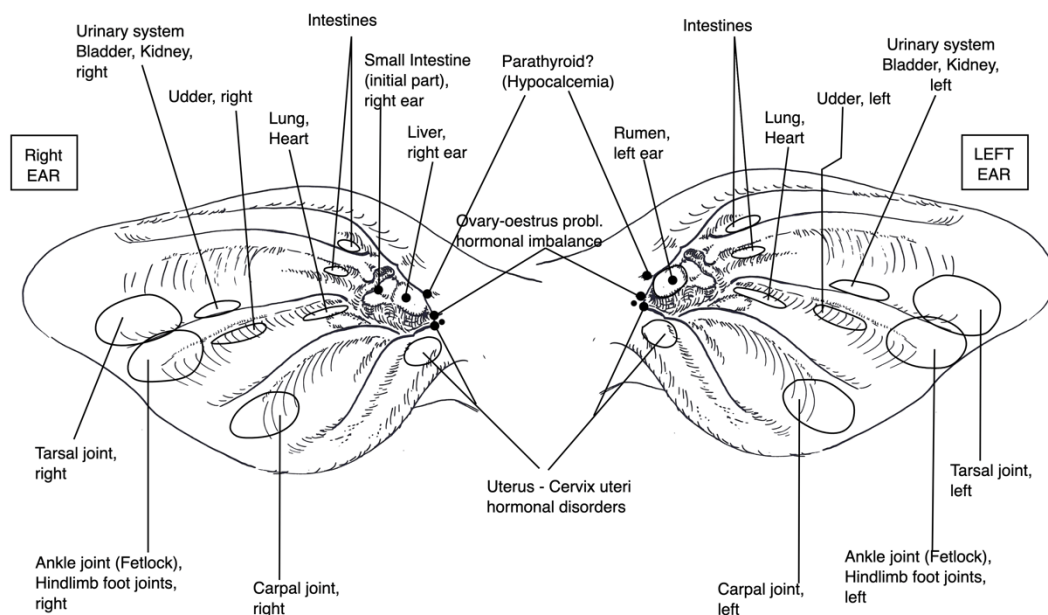
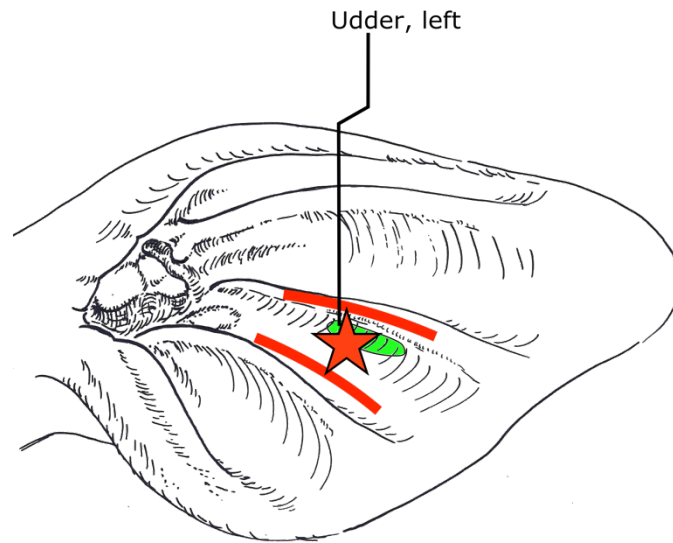


Abbildung 1. Ohrakupunkturpunkte des linken und rechten Ohrs beim Rind nach O. Kothbauer (1999). Bild der Ohren des Rindes nach O. Kothbauer (Veterinary Acupuncture - Basic Principles and Their Clinical Applications with Ear Acupuncture on Cattle and Some References to the Horse. Zweimühlen-Verlag, München, Germany, 1999).



258

259 *Abbildung 2. Ohrakupunkturpunkt des Euters im linken Ohr eines Rindes. Der Bereich zwischen den roten Linien stellt den Bereich*
 260 *dar (Stern), in dem die Ohrmarken in der Regel eingezogen werden. Werden die Ohrmarken korrekt platziert, wird der Ohraku-*
 261 *punkturpunkt für das Euter nach Kothbauer oft verletzt. Bild eines Ohres des Rindes gemäß Kothbauer (Veterinary Acupuncture*
 262 *- Basic Principles and Their Clinical Applications with Ear Acupuncture on Cattle and Some References to the Horse. Zweimühlen-*
 263 *Verlag, München, Deutschland, 1999).*

3. Publikation

Winkler, M., Franz, S., Wittek, T., & Pothmann, H. (2021). A potential treatment approach for subclinical mastitis in dairy cows: Auriculotherapy of the auricular branch of the vagus nerve. *Journal of Dairy Research*, 88(4), 407-412.
<https://doi.org/10.1017/S002202992100087X>

Research Article

Cite this article: Winkler MJ, Franz S, Wittek T and Pothmann H. A potential treatment approach for subclinical mastitis in dairy cows: auriculotherapy of the auricular branch of the vagus nerve. *Journal of Dairy Research* <https://doi.org/10.1017/S002202992100087X>

Received: 15 March 2021
Revised: 22 September 2021
Accepted: 27 September 2021

Keywords:

Auriculotherapy; non-antibiotic therapy; somatic cell count; subclinical mastitis; vagus nerve

Author for correspondence:

Max Jochen Winkler,
Email: maxjochenwinkler@gmail.com

A potential treatment approach for subclinical mastitis in dairy cows: auriculotherapy of the auricular branch of the vagus nerve

Max Jochen Winkler¹, Sonja Franz¹, Thomas Wittek¹ and Harald Pothmann²

¹University Clinic for Ruminants and ²Clinical Unit for Herd Health Management in Ruminants, University of Veterinary Medicine, Vetmeduni Vienna, Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna, Austria

Abstract

This research aims to test the hypothesis that neural therapy (NT) on the auricular branch of the vagus nerve (ABVN) in dairy cows diagnosed with subclinical mastitis (SCM) results in a reduction of the somatic cell count. Therapeutic options for SCM are mostly based on use of antibiotics and often lead to unsatisfactory results. An alternative therapy targeting the anti-inflammatory properties of the vagus nerve showing good efficacy, economic viability and without major side effects would be of considerable interest. Auriculotherapy (AT) was performed using three repeated infiltrations of 8.0 mg (0.4 ml) procaine hydrochloride (2%) at the location of the ear tag associated with the auricular acupuncture point (AAP) of the udder. Some 85 clinically healthy cows from nine dairy farms were sampled for evaluation of quarter somatic cell count (QSCC) on four days (d0, d2, d4 and d6). Quarters with a QSCC > 100 000 cells/ml on d0 were included in the analysis. Over the study period, a total of 784 quarters were analysed, 385 control (CON) quarters from 40 cows and 399 treated (TRE) quarters from 45 cows. Results showed that AT of the ABVN resulted in a significant reduction of the QSCC after three treatments. The effect was independent of bacteriological culture results of the quarter milk samples. The bacteriological cure rate, however, was not influenced by AT. To our knowledge this is the first report of AT reducing QSCC in dairy cows with SCM. Before AT can be regarded as an alternative therapeutic approach, further research should focus on possible long-term effects of AT on the reduction of SCC, any bacterial elimination and the neural pathways of AT in dairy cows with SCM.

According to the International Dairy Federation (IDF) recommendations subclinical mastitis in dairy cows is defined as a disease without clinical inflammatory signs of the udder and a SCC > 100 000 cells/ml with the presence or absence of pathogens. Subclinical mastitis is commonly detected by measuring SCC, but there is no standardized approach in terms of SCC cut-off values and evaluation on basis of individual composite SCC or QSCC. As a consequence, the reported prevalence of SCM varies widely between 13 and 53% (Fox *et al.*, 1995), since the chosen criteria vary with country (Hiitiö *et al.*, 2017), region (Hashemi *et al.*, 2011), herd (Erskine *et al.*, 2003) and method of SCC count (Narayana *et al.*, 2018).

Subclinical mastitis causes substantial economic losses in dairy herds not least from reduced milk yield ranging from approx. € 1000 to 1300 per case annually (Seegers *et al.*, 2003; Halasa *et al.*, 2007; van den Borne *et al.*, 2010). For every 100 000 somatic cells/ml increase exceeding 200 000 somatic cells/ml, in the bulk tank SSC the herd yield is estimated to decrease by 2.5% (Bradley and Green, 2005). In addition, SCM leads to extra labour and treatment costs and represents a major reservoir of contagious pathogens, which are risk factors for uninfected cows in the herd (Down *et al.*, 2013).

Therapeutic options for SCM are typically based on the use of antibiotics (McDougall *et al.*, 2009). These are used both during lactation as well as at the start of the drying-off period, often in combination with teat sealants (Golder *et al.*, 2016). There are, however, limitations in cases of chronic infections, where antibiotic therapy is not considered to be cost-effective (Gruet *et al.*, 2001; Erskine *et al.*, 2003). Excessive use and misuse of antibiotics in agriculture, humans and animal husbandry accelerate the occurrence of antimicrobial resistance and have a negative impact on the environment worldwide (Sandgren *et al.*, 2008). Pathogen induced SCM is a major cause for the worldwide consumption of antibiotics (Krömker and Leimbach, 2017). Due to the disadvantages of antibiotic treatment, recent research has explored the use of non-drug strategies, e.g. feeding of probiotics or plant extracts and immunoprophylaxis to improve udder health in SCM (Wu *et al.*, 2015, 2018; Seroussi *et al.*, 2018; Catozzi *et al.*, 2019).

Since the late 1990s, a number of studies have investigated the immunoregulatory role of the vagus nerve in different inflammatory disorders (Maier *et al.*, 1998; Bonaz *et al.*, 2017). The direct stimulation of the vagus nerve branches leads to a significant improvement of

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press on behalf of Hannah Dairy Research Foundation. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is unaltered and is properly cited. The written permission of Cambridge University Press must be obtained for commercial re-use or in order to create a derivative work.



CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

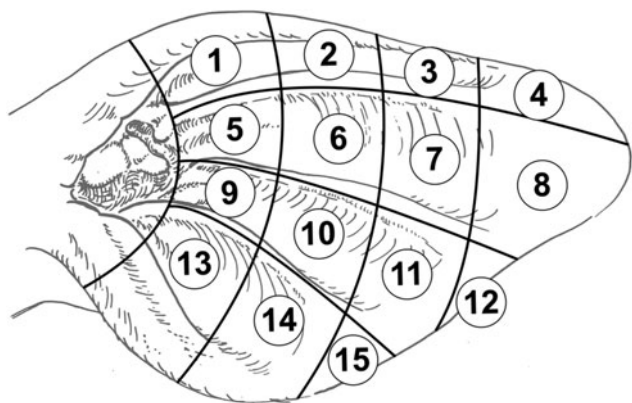


Fig. 1. Scheme to track the position of ear tags in dairy cows. Numbers 1–15 (in circles) represent positions. Position 10 usually represents the location of ear tags in cows. Figure based on the picture of cattle's ear according to Kothbauer (Veterinary Acupuncture – Basic Principles and Their Clinical Applications with Ear Acupuncture on Cattle and Some References to the Horse. Zweimühlen-Verlag, Munich, Germany, 1999).

the clinical presentation in various severe inflammatory diseases (Meregnani *et al.*, 2011). In addition to a direct stimulation of the cervical branch of the vagus nerve (Koopman *et al.*, 2016) a non-invasive approach was established by stimulation of the auricular branch of the vagus nerve (ABVN) *via* electric current (Hong *et al.*, 2018), acupuncture (He *et al.*, 2012) or the injection of substances (Litscher and Litscher, 2016). These therapeutic methods are part of AT. The existence of associations between different regions or organs of the body and certain points or zones of the human ear was first published in the 1950s (Nogier, 1957). The development of AT for humans is described in detail (Wirz-Ridolfi, 2019). Several studies used ABVN stimulation showing that AT influences the vagal tone to regulate cardiovascular, gastrointestinal and respiratory disorders in different species, e.g. rats (Gao *et al.*, 2011), mice (Hong *et al.*, 2018), rabbits (Xu *et al.*, 1992), cats (Nomura and Mizuno, 1984) or humans (Bonaz *et al.*, 2017). To our knowledge, only a limited amount of research on AT has been performed in cattle, although a bovine ear chart containing 27 auricular acupuncture points (AAP) was published about 20 years ago (Fig. S1 in online Supplementary File) (Kothbauer, 1999). For cattle, Kothbauer (1999) described relationships between certain diseases and active AAP. Provoking individual regions or organs triggers a reaction in the corresponding AAP, which can be directly observed by surface conductivity measurements (as reviewed in Kothbauer, 1986, 1999). Under clinical conditions or after manual irritation, the AAP shows signs of inflammation like marked reddening, swelling, occurrence of exudate or, under more severe clinical conditions, superficial skin lesions (Kothbauer, 1986). The projection zone for the udder is located below the *pliae auriculares longitudinales mediales* in the middle third of the ear (Ear tag position 10 in Fig. 1 and AAP of the udder in Fig. S1 in online Supplementary File) (Kothbauer, 1999). This location (position 10) corresponds largely with the position of the ear tags of cattle (Fig. 1).

To our knowledge, no systematic research is published relating ABVN stimulation to improve udder health or addressing any other organs in dairy cows. Therefore, the purpose of our study was to assess the potential effect of ABVN stimulation with local anaesthetics at the positions of the ear tags of dairy cows suffering from SCM. It was hypothesized that stimulation of the

auricular branch of the vagus nerve by neural therapy has an anti-inflammatory effect on the subclinical inflamed udder and results in decreased SCC.

Material and methods

The study procedures were discussed and approved by the Ethics Committee of the University of Veterinary Medicine, Vienna, in accordance with Good Scientific Practice guidelines and the national authority according to §8 of Law for Animal Experiments, Tierversuchsgesetz-TVG (BMWF-68.205/0033-WF/V/3b/2017) of Austria.

Animals and study design

Nine conventional Simmental dairy farms in Lower Austria, which obtained monthly milk recording data from the regional Dairy Herd Improvement Service (Landeskонтрольverband), participated in this study. The farm inclusion criteria were that at least 80% of cows showed SCC < 150 000 cells/ml and that a maximum of 15% had SCC > 200 000 cells/ml milk on average over the year. Only cows with an individual composite SCC of > 200 000 cells/ml milk in the latest milk record data were enrolled to increase the probability for finding cows with QSCC > 100 000 cells/ml in at least one quarter. All selected cows were clinically healthy and received no treatment with antibiotics and/or nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the current lactation. In our study, cows with QSCC > 100 000 cells/ml independent of the bacteriological result were defined as having SCM, which is in accordance with the definition of the IDF. The Excel randomization function determined the allocation of cows to control group (CON) without any treatment, and treatment group (TRE) with application of local anaesthetics. Documentation of data was performed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office Cooperation, Redmond, WA, USA). In addition, data relating days in milk (DIM), parity, farms, season, position of ear tag, affected udder side and bacteriological analysis were documented.

Collection of quarter milk samples for determination of QSCC and bacteriological examination

Quarter milk samples were collected on days 0 (before treatment), 2, 4, and 6 for measurement of QSCC. Furthermore, aseptic quarter milk samples were taken on d0 and d6 for bacteriological examination. After sampling, all milk samples were immediately stored at 4°C and delivered to an analytical laboratory (Qualitätslabor Niederösterreich, Gmünd, Austria) on the same day. An automated somatic-cell counter (Fossomatic™ FC, Foss, DK-3400 Hilleroed, Denmark) analysed the QSCC. Collection and microbiological procedures were defined and performed as outlined by the National Mastitis Council (Hogan and National Mastitis Council (U.S.), 1999).

Auriculotherapy with local anaesthetics

Neural therapy on the ABVN of the scar of the left ear was performed in TRE on d0, d2 and d4. For this purpose, each cow was restrained in the feeding fence and the head was tied to the right side of the animal using a halter. The whole ear, especially the area around the ear tag, was examined for pathological changes such as marked reddening, swelling, exudate and hyperalgesia

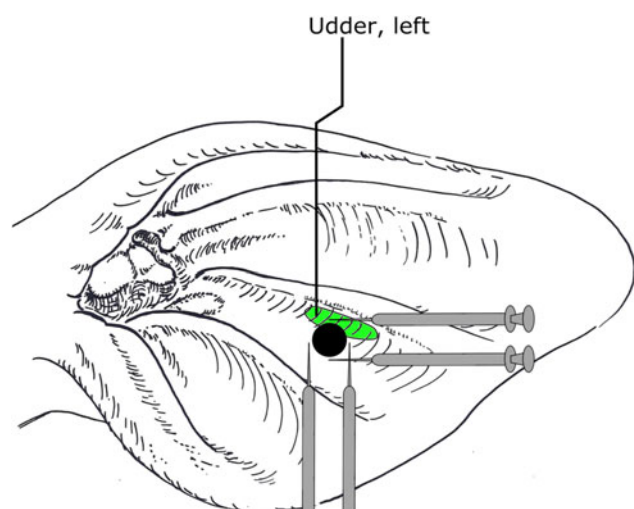


Fig. 2. Schematic illustration of intracutaneous application of local anaesthetics at each location clockwise at 12, 3, 6 and 9 around an ear tag. Black circle represents the ear tag corresponding with position number 10. Oval area represents the ear acupuncture point for the udder. Figure based on the picture of cattle's ear according to Kothbauer (Veterinary Acupuncture – Basic Principles and Their Clinical Applications with Ear Acupuncture on Cattle and Some References to the Horse. Zweimühlen-Verlag, Munich, Germany, 1999).

by palpation. After clipping all long hair of the pinna, the area was cleaned and disinfected using 70% ethyl alcohol-soaked cotton balls (Ethanol 70%, Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Austria). Cows of TRE group were treated by intracutaneous infiltration of 0.1 ml procaine hydrochloride 2% (Procamidol® 20 mg/ml, Richterpharma AG, Wels, Austria) at each location clockwise at 12, 3, 6 and 9 around the ear tag (Fig. 2) using 1 ml syringes (Omnifix®-F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and 0.6 × 30 mm needles (Henry Schein Inc. Melville, USA). Cows from CON group were handled identically, however, without injection of local anaesthetics.

Statistical analysis

All data were analysed with the statistical program SPSS (SPSS version 20; IBM Corporation, NY, USA). Because QSCC values were not normally distributed, data were $\log_{10}$ transformed and categorized for subsequent analysis. A general linear model with repeated measurements (one-way analysis of variance: ANOVA) was used to compare the change of QSCC over the sampling days (d0, d2, d4 and d6). The group variable CON and TRE was included in the model to exclude a potential confounding interaction. The change of QSCC over time within CON and TRE was compared using ANOVA and adjusted by Bonferroni post hoc test. The sampling days were defined as within-subject variable and d0 was taken as simple contrast to compare with. Independent variables (DIM, parity, farm, season, position of the ear tag, udder side, and bacteriological result) were included in the analysis of variance (ANCOVA). Moreover, effects on QSCC change in bacteriological positive samples on d0, AAP corresponding to position of ear tag (yes/no), side of udder quarter (left/right) were evaluated in CON and TRE. Bacteriological cure was defined as absence, on d6, of the bacteria identified on d0. Differences in bacteriological cure rate between CON and TRE were analysed by χ^2 -test. In general, values were considered significant when $P \leq 0.05$.

Table 1. Median, first and third quartile of quarter somatic cell count (in 1.000 cells/ml milk) of control (CON) and treatment group (TRE) on days (d) 0, 2, 4 and 6

Group		d0	d2	d4	d6
CON (n = 40)	Quarters (n)	98	97	93	98
	Median	397	489	380	337
	Quartile 1	191	215	263	217
	Quartile 3	888	1301	1016	963
TRE (n = 45)	Quarters (n)	100	100	99	100
	Median	447	499	475	343
	Quartile 1	186	215	227	156
	Quartile 3	1321	1593	1981	1025

Results

Based on the monthly milk record data over all four seasons of the nine participating dairy farms, 99 cows were initially enrolled into the study. Finally, 85 dairy cows met the inclusion criteria, whereas 14 were excluded from further analyses because of clinical mastitis ($n = 7$) or QSCC < 100 000 cells/ml at all quarters on d0 ($n = 7$). The milk samplings on days d0, d2, d4 and d6 resulted in a total of 784 QSCC, corresponding to 385 QSCC of CON (40 cows) and 399 QSCC of TRE (45 cows). Cows were grouped according to parity into primiparous ($n = 21$), two lactation ($n = 19$) and more than two lactation cows ($n = 45$). Moreover, the stage of lactation was then stratified into thirds, resulting in categories, $\text{SCC} \leq 100$ ($n = 16$), $100 - 199$ ($n = 24$) and ≥ 200 ($n = 45$) DIM. Since sampling in summer was performed at one farm only, the data of the season summer was restricted to those of the one specific farm. The position of the ear tag was categorized according to Fig. 1. None of the cows in the study showed signs of inflammation at the scar around the ear tags. Bacteriological examinations of milk samples were performed on days 0 and 6. Median QSCC on d0 was higher in TRE (447 000) than in CON (397 000). The changes of median QSCC over time demonstrated an increase from d0 to d2 and a decrease from then on in both groups (Table 1). Descriptive statistics of QSCC of previously mentioned categories (variables) in groups CON and TRE are shown in online Supplementary File Table S1.

Effect of AT over time on the change of QSCC in TRE compared with CON

The initial analysis included the groups (CON, TRE) as potential confounding variables into the model. The results indicated an interaction between the groups and time revealing significant differences in QSCC over the time ($P < 0.05$). The analysis of repeated measurements within groups showed a significant change of QSCC over the time (d0 to d6; $P = 0.001$) in TRE, whereas within CON ($P > 0.05$) no differences were found (Fig. 3). The pairwise comparison between the sampling days resulted in a significant reduction of QSCC after the third treatment from d0 to d6 ($P < 0.01$) (Table S2 in online Supplementary File). Including independent variables (DIM, parity, bacteriological result, farm, season, position of the ear tag, udder side) into the analysis (ANCOVA) affected the results, indicating different effects of farms and season on QSCC in CON and

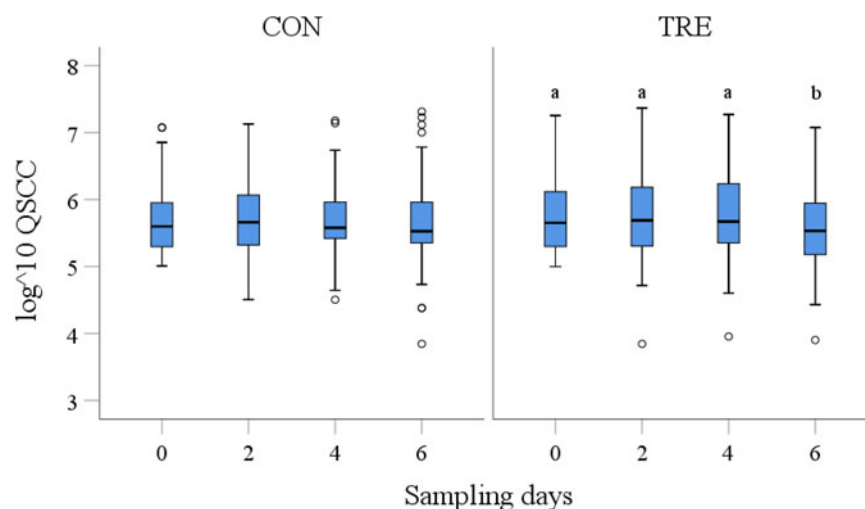


Fig. 3. Log transformed somatic cell counts (QSCC) of control (CON) and treatment (TRE) group on sampling days 0, 2, 4 and 6 (x-axis). General linear regression model with Bonferroni-adjustment indicates differences between QSCC over the time in TRE. Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$). Outliers are diagrammed as circles (o). On line 158 Fig.1 corrected to Fig. 3

of ear tag position on QSCC in TRE (Table S3 in online Supplementary File). Including the covariates into the pairwise comparison, however, resulted in a significant reduction of QSCC from d0 to d6 only in TRE ($P < 0.01$).

Effect of AT over time on the change of QSCC in bacteriological positive samples of TRE compared with CON

The bacteriological analysis of quarter milk samples on d0 and d6 revealed various bacteria, which were grouped into environmental (i.e. Enterobacteriaceae, *Streptococcus dysgalactiae*, Enterococcus, Acinetobacter), major contagious (i.e. *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*), and minor contagious species (i.e. Non-aureus *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp.). Major pathogens with higher importance, e.g. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and fungi (*Aspergillus fumigatus*) were listed separately. Bacteriological samples with more than one isolate were defined as multiple isolates. The proportion of the bacteriological findings in CON and TRE samples are presented in Table S4 in online Supplementary File. In total, 52.0% (51 of 98) samples in CON and 59.0% (59 of 100) of samples in TRE were bacteriological positive at d0. Minor contagious isolates were predominantly found in both groups. The bacteriological cure rate, defined as the absence of bacteria on d6 compared with d0, was not different between CON (27.5%, 14 of 51) and TRE (20.3%, 12 of 59) ($P = 0.38$). Using the group variable (CON, TRE) in the statistical model, an interaction between the groups and time was evident ($P < 0.05$). The multiple comparison in bacteriological positive milk samples on d0 or d6 or both over time showed a significant reduction of QSCC in TRE ($P = 0.01$), but not in CON. Pairwise comparisons of QSCC in TRE resulted in reduction of QSCC after the third treatment from d0 to d6 ($P = 0.05$) (Table S5 in online Supplementary File). In the bacteriological negative samples (negative on d0 and d6) the reduction in QSCC was also significant in TRE ($P < 0.05$) but not in CON ($P > 0.05$). The pairwise comparison, however, indicated a significant difference between d2 and d6 ($P = 0.01$) (Table S6 in online Supplementary File).

Effect of ear tag position on the results of AT application

The position of the ear tags were documented, indicating 'correct' position if the ear tag corresponded to the AAP of the udder

(position 10). In consequence, 28 ear tags of CON and 32 of TRE were at the position 10 (approximately 70% for both), whereas both in CON and TRE eleven were found at other positions. Ear tags at the position 9, located at the area of the *meatus acusticus*, were found eight in CON and three in TRE. Other ear tags were located at position 6 (one in CON and five in TRE), position 7 (one in TRE), position 13 (one in TRE) and position 14 (two in CON and one in TRE).

There was a significant reduction of QSCC when treatment was performed at the ear tag position 10 ($P < 0.01$). Including the group variable (CON, TRE), an interaction with time was identified ($P < 0.05$). The pairwise comparison of the sampling days revealed that the reduction of QSCC occurred from d2 to d6 ($P < 0.01$) (Table S7 in online Supplementary File). An increased QSCC on d2 after the first treatment was apparent, however, this pattern was also present in CON (Table S1 in online Supplementary File). Moreover, there was an effect on QSCC when treatment was performed at the ear tag position 9 (TRE: $P = 0.001$) demonstrating reduction of QSCC after the third treatment from d0 to d6 (Table S8 in online Supplementary File). Including the group variable in the analyses, however, showed no interaction between the groups and time of QSCC change ($P > 0.05$). Because of the low number of ear tags positions other than 9 and 10 no analyses on position-level were performed.

Effect of the udder (quarter) side on the results of AT application

The bovine ear chart indicates that the AAP for the left udder is on the left ear and the AAP for the right udder is on the right ear (Fig. S1 in online Supplementary File). In CON, 184 samples were taken from the left udder side and 201 from the right udder side. In TRE, 191 samples were taken from the left udder side and 208 were taken from the right udder side. A significant reduction of QSCC was only found in TRE, but independent of the udder side (left: $P = 0.001$, right: $P < 0.05$).

Discussion

The aim of this study was to evaluate the effect of AT in dairy cows with SCM. Both CON and TRE contained a comparable number of quarters, so that the stochastic basis for statistical evaluations was given. Our findings support the hypothesis that there

is a positive effect of ABVN stimulation on the QSCC after the third treatment. Including several variables into the model indicated significant interactions of a few variables. The systematic effect, however, was not confounded because results revealed a group effect on QSCC reduction indicating significant differences between treated and control cows. The significant variable in the data set of TRE was the position of the ear tags. Analysing the ear tag position as dependent variable identified the ear tag position at the AAP as the significant factor on the reduction of QSCC. Among the controls, however, we assume a confounding effect of the different farms and seasons on QSCC as data from the summer season was generated on one farm only. Furthermore, we observed that under certain conditions, e.g. in bacteriologically negative samples or AT at the AAP (position 10), an increase of QSCC after the first treatment was obvious, but three consecutive treatments resulted in a significant reduction of QSCC. In the field, the application of AT in cows suffering from SCM was easy to achieve. Nevertheless, intracutaneous infiltration of LA into the ear can cause the animals some pain and since repeated applications are required for a successful therapy, defensive reactions need to be taken into consideration. Therefore, a tight fixation of the cow's head to the feeding fence is crucial for the safety of both cow and veterinarian.

The underlying principle by which stimulation of the ABVN in cows leads to a decrease of SCC is uncertain. A neural response to inflammation, however, described by a cholinergic anti-inflammatory pathway *via* the vagal nerve was already reported (Tracey, 2002). Furthermore, the stimulation of the vagal nerve led to significantly decreased amounts of circulating TNF in the serum and, therefore, suppressed inflammation (Borovikova *et al.*, 2000). This mechanism might be the underlying principle of the vagal acupuncture, reducing the QSCC in the udder of dairy cows suffering from SCM.

While AT at the ear tag position had no effect on the bacterial cure rate of infected quarters, this effect even in animals with bacteriological positive samples might again be explained by a general support of the immune system. This aspect, however, was not the aim of our study. Even in antibiotic therapy of mastitis, the bacterial cure rate is influenced by many different factors, such as animal- or farm-specific factors, application, dosage and duration of therapy. Furthermore, antibiotics often fail to eliminate bacteria completely (Krömker and Leimbach, 2017). Further research would be desirable to investigate the potential anti-inflammatory effect of AT on longer-term bacteriological cure in cows suffering from mastitis.

The study was designed to perform AT on the scar around the ear tag, assuming that most ear tags are located in the region of the AAP for the udder below the *plicae auriculares longitudinales mediales* in the centre of the cattle's ear. Results showed a significant reduction of QSCC in TRE at the AAP (position 10). In humans, the vagus nerve mainly supplies the area around the auditory meatus *via* the ABVN (He *et al.*, 2012). This area corresponded to a large extent to the ear tag position 9 in the present study. The result that QSCC reduction was also observable in cows treated at ear tag position 10 could be explained because anatomical structures appear to be too different from humans to transfer AAP directly to bovine (Artmeier and König, 1978; Kothbauer, 1986). To our knowledge, the exact course of the nerves in ears of cattle has not been studied yet. Overall, it is not easy to locate the acupuncture points accurately (He *et al.*, 2012), for example, the effect of AT on smoking cessation in humans was independent of the chosen acupuncture point (White and Moody, 2006).

The ear chart by Kothbauer shows many AAP for several organs and regions of the body. It describes an AAP for the 'udder, left' in the left ear and an APP for the 'udder, right' in the right ear (Kothbauer, 1999). Performing AT on the left ear exclusively, allowed us to compare the effect on the left-side quarters (ipsilateral) as well as on the right-side quarters (contralateral). Our results showed a reduction of QSCC in both the left and the right quarters, which does not support the theory of a side related APP of the udder in bovine by Kothbauer (1999), but support the pathway theory of ABVN stimulation to the site of inflammation (Bonaz *et al.*, 2017). The main points in AT to the contrary were the contralateral side, however, there were no significant differences in the effect of a single side or both sides therapy (reviewed by Bao *et al.*, 2017).

In conclusion, applying neural therapy to the scars at the ear tags of lactating cows suffering from subclinical mastitis resulted in a significant reduction of the somatic cell counts in both udder sides, even though the treatment was performed on the left ear exclusively. The effect of neural therapy was found at the position of the cow's ear tag, indicating that the area of vagal innervation at the cow's ears is different compared with humans. Auricular therapy was successful both in bacteriological negative and positive samples. However, the bacterial cure rate was not affected.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S002202992100087X>

Acknowledgment. This work was partially supported by 'Österreichische Gesellschaft der Tierärztinnen & Tierärzte' (ÖGT), Sektion Ganzheitsmedizin. Technical assistance was given by 'Qualitätslabor Niederösterreich' in A-3950 Gmünd, Austria, whose employees evaluated the milk samples. Technical assistance was also given by the farmers, who voluntarily provided their cows for this study and assisted in the practical part. We like to thank Professor D. Logue (Glasgow University) for his help preparing the manuscript.

References

- Artmeier P and König HE (1978) [About ear acupuncture in dogs]. *Kleintierpraxis* 23, 299–306.
- Bao N, Wang Q, Jia YJ, Yang K, Kong LJ, Sun YH, Li XF, Xu J, Zhang XP, Zhang X, Du YZ, Li JL, Yang QQ, Feng XX, Shi J, Jia CS and Wang JL (2017) Research of characteristics of stimulation methods and application of acupoint in auricular needle therapy based on data mining. *Zhen Ci Yan Jiu* 42, 372–376.
- Bonaz B, Sinniger V and Pellissier S (2017) Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine* 282, 46–62.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW and Tracey KJ (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462.
- Bradley A and Green M (2005) Use and interpretation of somatic cell counts in the dairy cow. *In Practice* 27, 310–315.
- Catozzi C, Cuscó A, Lecchi C, De Carlo E, Vecchio D, Martucciello A, D'Angelo L, Francino O, Sanchez Bonastre A and Cecilian F (2019) Impact of intramammary inoculation of inactivated *Lactobacillus rhamnosus* and antibiotics on the milk microbiota of water buffalo with subclinical mastitis. *PLoS ONE* 14, e0210204.
- Down PM, Green MJ and Hudson CD (2013) Rate of transmission: a major determinant of the cost of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 96, 6301–6314.
- Erskine RJ, Wagner S and DeGraves FJ (2003) Mastitis therapy and pharmacology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 19, 109–138.

- Fox LK, Chester ST, Hallberg JW, Nickerson SC, Pankey JW and Weaver LD (1995) Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturition. *Journal of Dairy Science* **78**, 1619–1628.
- Gao XY, Li YH, Liu K, Rong PJ, Ben H, Li L, Zhu B and Zhang SP (2011) Acupuncture-like stimulation at auricular point heart evokes cardiovascular inhibition via activating the cardiac-related neurons in the nucleus tractus solitarius. *Brain Research* **1397**, 19–27.
- Golder HM, Hodge A and Lean IJ (2016) Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation. *Journal of Dairy Science* **99**, 7370–7380.
- Gruet P, Maincent P, Berthelot X and Kaltsatos V (2001) Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Veterinary Drug Delivery* **50**, 245–259.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O and Hogeveen H (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Quarterly* **29**, 18–31.
- Hashemi M, Kafi M and Safdarian M (2011) The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of fars province, south of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* **12**, 236–241.
- He W, Wang X, Shi H, Shang H, Li L, Jing X and Zhu B (2012) Auricular acupuncture and vagal regulation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, 6. Article ID 786839.
- Hiitö H, Vakkamäki J, Simojoki H, Autio T, Junnila J, Pelkonen S and Pyörälä S (2017) Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Veterinaria Scandinavica* **59**, 22.
- Hogan JS (1999) *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Madison, WI: National Mastitis Council.
- Hong GS, Zillekens A, Schneiker B, Pantelis D, Jonge W, Schaefer N, Kalff J and Wehner S (2018) Non-invasive transcutaneous auricular vagus nerve stimulation prevents postoperative ileus and endotoxemia in mice. *Neurogastroenterology & Motility* **31**, e13501.
- Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR, Mehta AD, Levine YA, Faltys M, Zitnik R, Tracey KJ and Tak PP (2016) Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 8284–8289.
- Kothbauer O (1986) [Bovine ear acupuncture investigations]. *Veterinary Medicine Austria* **4/5**, 177–180.
- Kothbauer O (1999) *Veterinary Acupuncture – Basic Principles and their Clinical Applications with Ear Acupuncture on Cattle and Some References to the Horse*, 1st English Edn. Munich, Germany: Zweimuehlen Verlag.
- Krömker V and Leimbach S (2017) Mastitis treatment – reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* **52**, 21–29.
- Litscher D and Litscher G (2016) The history of liquid ear acupuncture and the current scientific state of the art. *Journal of Pharmacopuncture* **19**, 109–113.
- Maier SF, Goehler LE, Fleshner M and Watkins LR (1998) The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Annals of the New York Academy of Sciences* **840**, 289–300.
- McDougall S, Parker KI, Heuer C and Compton CWR (2009) A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology* **134**, 177–185.
- Meregnani J, Clarençon D, Vivier M, Peinnequin A, Mouret C, Sinniger V, Picq C, Job A, Canini F, Jacquier-Sarlin M and Bonaz B (2011) Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* **160**, 82–89.
- Narayana SG, Miglior F, Naqvi SA, Malchiodi F, Martin P and Barkema HW (2018) Genetic analysis of subclinical mastitis in early lactation of heifers using both linear and threshold models. *Journal of Dairy Science* **101**, 11120–11131.
- Nogier P (1957) [About the auricle acupuncture]. *German Journal of Acupuncture & Related Techniques* **VI**, 25–33.
- Nomura S and Mizuno N (1984) Central distribution of primary afferent fibers in the Arnold's nerve (the auricular branch of the vagus nerve): a transganglionic HRP study in the cat. *Brain Research* **292**, 199–205.
- Sandgren CH, Waller KP and Emanuelson U (2008) Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *The Veterinary Journal* **175**, 108–117.
- Seegers H, Fourichon C and Beaudeau F (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research* **34**, 475–491.
- Seroussi E, Blum SE, Krifucks O, Lavon Y and Leitner G (2018) Application of pancreatic phospholipase a2 for treatment of bovine mastitis. *PLoS ONE* **13**, e0203132.
- Tracey KJ (2002) The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853–859.
- van den Borne BHP, Halasa T, van Schaik G, Hogeveen H and Nielsen M (2010) Bioeconomic modeling of lactational antimicrobial treatment of new bovine subclinical intramammary infections caused by contagious pathogens. *Journal of Dairy Science* **93**, 4034–4044.
- White A and Moody R (2006) The effects of auricular acupuncture on smoking cessation may not depend on the point chosen – an exploratory meta-analysis. *Acupuncture in Medicine* **24**, 149–156.
- Wirz-Ridolfi A (2019) The history of ear acupuncture and ear cartography: why precise mapping of auricular points is important. *Medical Acupuncture* **31**, 145–156.
- Wu Q, Liu MC, Yang J, Wang JF and Zhu YH (2015) *Lactobacillus rhamnosus* gr-1 ameliorates *Escherichia coli*-induced inflammation and cell damage via attenuation of ASC-independent nlrp3 inflammasome activation. *Applied and Environmental Microbiology* **82**, 1173–1182.
- Wu Q, Zhu YH, Xu J, Liu X, Duan C, Wang MJ and Wang JF (2018) *Lactobacillus rhamnosus* gr-1 ameliorates *Escherichia coli*-induced activation of nlrp3 and nlr4 inflammasomes with differential requirement for ASC. *Frontiers in Microbiology* **9**, 1661.
- Xu F, Liu X, Liu Z, Chen JS and Dong B (1992) [The role of ear electroacupuncture on arterial pressure and respiration during asphyxia in rabbits]. *Zhen ci yan jiu – Acupuncture research* **17**, 36–32.

4. Erweiterte Diskussion

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Hypothese, dass wiederholte Injektionen von Procainhydrochlorid an dem von Kothbauer beschriebenen Ohrakupunkturpunkt für das Euter zu einer Verringerung des Milchzellgehalts führen. Diese Zellzahlverringerng konnte nach Abschluss der drei Behandlungen gemessen werden. Von den acht untersuchten Variablen (Betrieb, Jahreszeit, Position der Ohrmarke, bakteriologischer Status, Euterhälfte, Laktationsperiode und Laktationstag) erwiesen sich in der Behandlungsgruppe (TRE) die Position der Ohrmarke (Position 10 und 9) und in der Kontrollgruppe (CON) Betrieb und Jahreszeit als signifikante Interaktionen. Da die Daten für einen Betrieb nur aus der Jahreszeit Sommer stammten, ließen sich die beiden Variablen (Betrieb und Jahreszeit) jedoch nicht unabhängig voneinander auswerten. Es ist nicht auszuschließen, dass die Jahreszeit einen Einfluss auf die Zellzahlen ausüben kann (De Vlieghe et al. 2012).

Mit dem vorliegenden Ergebnis bezüglich der Position der Ohrmarke kann der Akupunkturpunkt für das Euter gut eingegrenzt werden. Die stärksten Effekte auf die Reduzierung der Zellzahl sind bei den Behandlungen der Position 10 erzielt worden. Zusätzlich hat die Position 9, die nasal von Position 10 liegt und bis in den *Meatus acusticus* reicht, auch einen positiven Effekt auf die Verringerung der Zellzahl gezeigt. Damit wird Kothbauers Annahme über seine beschriebene Lokalisation des Ohrakupunkturpunktes für das Euter unterstützt (Kothbauer 1999).

Die Behandlungen wurden ausschließlich am linken Ohr durchführt. Die Ergebnisse zeigten eine Reduktion der Zellzahlen in TRE sowohl in den Vierteln der linken (ipsilateral) als auch in den Vierteln der rechten (kontralateral) Euterhälfen der Tiere. Dieses Ergebnis unterstützt damit nicht die Theorie der seitenbezogenen Ohrakupunkturpunkte des Euters beim Rind (Kothbauer 1999). In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls sinkende Zellzahlen beobachtet, wenn aus Sicht der Euterhälfte der Ohrakupunkturpunkt auf der kontralateralen Seite liegt. In einem Review zur Ohrakupunktur kommt Bao et al. (2017) zu dem generellen Ergebnis, dass die wirksamen Hauptpunkte hauptsächlich kontralateral zu finden sind.

307 Die Zellzahlen der bakteriologisch positiven Euterviertel der TRE Gruppe haben sich
308 verringert, wenngleich sich die bakteriologische Heilungsrate nicht verbesserte. In der
309 vorliegenden Studie wurde vor der ersten Intervention an d0 und 48 Stunden nach der
310 dritten und letzten Intervention an d6 jeweils eine Probe für die bakteriologische Un-
311 tersuchung pro Euterviertel genommen. Bei anderen Studien hingegen wurden zur
312 Überprüfung der bakteriellen Heilungsrate zwei Proben in einem größeren Abstand
313 nach der letzten Behandlung genommen, zum Beispiel an den Tagen 21 und 42
314 (McDougall 2021) sowie an den Tagen 21 und 28 (van den Borne et al. 2010b) sowie
315 an den Tagen 16 und 30 (Barkema et al. 2006). Ein positiver Kurzzeiteffekt konnte in
316 dieser Studie nicht gemessen werden, Langzeiteffekte wurden nicht untersucht.

317 Üblicherweise wird die pathogen induzierte subklinische Mastitis auf Grundlage eines
318 durchgeführten Antibiotograms mit Antibiotika behandelt. Hierbei ist bekannt, dass die
319 Veränderung der bakteriologischen Heilungsrate von verschiedenen Faktoren ab-
320 hängt, wie zum Beispiel von tier- oder betriebspezifischen Faktoren, wie Dauer der
321 Anwendung, Dosierung oder antimikrobielle Empfindlichkeit der Pathogene (Barkema
322 et al. 2006). Selbst bei antibiotischer Behandlung gelingt es häufig nicht, die Bakterien
323 vollständig zu eliminieren (Krömker und Leimbach 2017). Für die Fälle von subklini-
324 scher Mastitis bei gleichzeitig negativen bakteriologischen Status gibt es keine be-
325 kannte Therapieform, die sich in der Praxis etablieren konnte. Die wiederholte Behand-
326 lung des Ohrakupunkturpunkts für das Euter mit Procainhydrochlorid könnte eine Al-
327 ternative darstellen. Die Behandlung selber ist einfach durchzuführen. An der Ohrin-
328 nenseite, zirkulär um die Narbe der Identifikationsohrmarke, wird an vier Stellen jeweils
329 0,1 ml Procainhydrochlorid intrakutan injiziert, so dass Quaddeln entstehen. Sollte die
330 Narbe nicht im Bereich der Positionen 10 oder 9 liegen, empfiehlt es sich, den Bereich
331 der Position 10 mit insgesamt 0,4 ml an mehreren Stellen zu behandeln (Abb. 2). Je-
332 doch müssen Vorkehrungen getroffen werden, um die Gefahr von Verletzungen für
333 Mensch und Tier auszuschließen. Die Quaddelung mit Proacinhydrochlorid an der
334 Ohrinnenseite ist durch den Nadelstich geringgradig schmerzhaft und bedingt deswe-
335 gen eine adäquate Fixierung in einem Fressgitter. Zusätzlich muss der Kopf des Tieres
336 durch ein festsitzendes Kopfhalter zur Seite weg gebunden werden, damit Abwehrbe-
337 wegungen wie Kopfschütteln oder Kopf- Halsdrehungen, sowie die Beweglichkeit nach

338 vorne und hinten auf ein Minimum reduziert werden können. Mögliche Komplikationen
339 bei der Prozedur der Injektionen ergeben sich durch nicht adäquate Fixierung oder bei
340 starken Abwehrbewegungen des Tieres.

341
342 Laut den Ergebnissen stellte sich eine signifikante Zellzahlreduktion nach der dritten
343 Behandlung ein. Daraus folgt, dass die Behandlung jeweils im Abstand von 48 Stun-
344 den insgesamt dreimal durchgeführt werden sollte. Wird die Behandlung vom Tierarzt
345 bzw. von einer Tierärztin durchgeführt, setzt dies somit ein gutes Zeitmanagement vo-
346 raus. Hingegen führen viele Tierbesitzer und Tierbesitzerinnen die antibiotische The-
347 rapie mit Euterinjektoren nach tierärztlicher Diagnose und bei entsprechender Ausbil-
348 dung selbst durch, meist während der Melkzeiten im Melkstand. Die neuraltherapeuti-
349 sche Behandlung führt aus dieser Perspektive wohl zu mehr Aufwand für alle Beteilig-
350 ten und damit zu höheren Kosten für die Tierbesitzer und Tierbesitzerinnen. Auf der
351 anderen Seite hat die antibiotische Therapie den Nachteil des Verbots der Milchliefere-
352 rung der behandelten Tiere für die Zeitspanne der Behandlung und die Wartezeit nach
353 der letzten Behandlung. Im Gegensatz dazu fällt bei der Behandlung mit Procainhyd-
354 rochlorid nach heutiger Rechtslage keine Wartezeit für die Milch an, sie ist uneinge-
355 schränkt verkehrsfähig.

356
357 Bei dieser Studie handelte es sich um eine experimentelle, randomisierte, kontrollierte
358 Studie, die zum Ergebnis führte, dass die neuraltherapeutische Behandlung des Ohr-
359 akupunkturpunktes für das Euter zu einer Zellzahlreduktion bei subklinischen Mastiti-
360 den führt. Jedoch bleiben weitere Fragen offen, die entweder durch das Studiendesign
361 oder die Ergebnisse nicht restlos geklärt werden konnten. In der Studie sind insgesamt
362 784 Euterviertel inkludiert, davon sind 386 Viertel von 40 Kühen in der Kontrollgruppe
363 und 399 Viertel von 45 Kühen in der Behandlungsgruppe. Der Datensatz ist damit aus-
364 reichend. Neben den nicht auszuwertenden zwei Merkmalen Betrieb und Saison,
365 konnten andere Ohrmarkenpositionen als 10 oder 9 statistisch nicht ausgewertet wer-
366 den. Die von den Herstellern der Ohrmarken empfohlene Stelle für die Anbringung
367 entspricht in unserer Studie der Ohrmarkenposition 10, in der sich auch gleichzeitig

368 der Ohrakupunkturpunkt befindet. Das erklärt warum die meistplatzierten Ohrmarken
369 in den Positionen 10 oder 9 waren.

370 Sechs Tage lang wurden alle 48 Stunden Milchproben zur Zellzahlmessung entnom-
371 men, ebenfalls an Tag 0 und 6 Proben für die bakteriologische Untersuchung. Darüber
372 hinaus wurden weder weitere Milchproben entnommen, noch ein Monitoring über die
373 monatlichen Milchleistungsdaten der Betriebe auf Kuhebene durchgeführt. Daher kann
374 in dieser Studie keine Aussage über den weiteren Verlauf der Zellzahlen sowie über
375 die Entwicklung der bakteriologischen Ergebnisse, noch über einen Langzeiteffekt der
376 neuraltherapeutischen Behandlung getroffen werden. Ob die neuraltherapeutische Be-
377 handlung einen Einfluss auf die Milchqualität und Milchmenge hat, wurde in dieser
378 Studie ebenfalls nicht untersucht, so dass Aussagen dazu nicht möglich sind.

379 Der Mechanismus über die Wirkung der neuraltherapeutischen Intervention lässt sich
380 mit dem vorliegenden Studiendesign nicht aufklären. Die vagale Innervation der bo-
381 vinen Milchdrüse und die genaue vagale Innervation der Ohrinnenseite beim Rind sind
382 unbekannt (Nickel et al. 2004). Laut Studien aus der Neurowissenschaft führt die ma-
383 nuelle Stimulation des aurikulären Asts des *N. vagus* zu einer Veränderung seines
384 Tonus und mündet in einer Reduzierung der Menge an zirkulierenden TNF-alpha oder
385 verschiedenen Interleukinen im Plasma und Serum (Borovikova et al. 2000). In der
386 Folge schwächt sich die Immunantwort auf eine Entzündung ab oder verschwindet
387 klinisch ganz (Tracey 2002). Beim Menschen innerviert der *N. vagus* über seinen au-
388 rikulären Ast hauptsächlich den Bereich um den *Meatus acusticus* (He et al. 2012).
389 Dieser Bereich entspräche beim Rind weitestgehend der Ohrmarkenposition 9 in die-
390 ser Studie. Einen höheren Effekt auf die Reduzierung der Zellzahl hatte jedoch die
391 Behandlung der Position 10, wenngleich Position 9 auch einen Effekt zeigte. Die ana-
392 tomischen Verhältnisse beim Menschen und bei Rindern unterscheiden sich allerdings
393 stark, so dass ein direkter Vergleich der Innervationsgebiete der Ohrinnenflächen zwi-
394 schen diesen beiden Spezies nicht möglich ist (Artmeier und König, 1978; Kothbauer
395 1986). Zirkulierenden Entzündungszellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht ge-
396 messen. Daher konnte nicht geklärt werden, ob die Reduzierung der Zellzahl durch
397 einen möglichen veränderten Tonus des *N. vagus* und die damit einhergehende Ver-
398 ringerung der zirkulierenden Entzündungszellen entstanden ist (Borovikova et al.

2000; Tracey 2002), oder ob dem ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. Ob TNF-alpha beim Rind durch Aurikulothérapie verringert werden kann, müsste daher in einer weiteren Studie herausgefunden werden.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Stimulation des Akupunkturpunktes für das Euter mit einem Neuraltherapeutikum bei Milchkühen mit subklinischer Mastitis führt zu einer Reduktion der Zellzahl innerhalb des Untersuchungszeitraums von 6 Tagen. Ein verlängertes Monitoring würde Aufschluss über einen möglichen Langzeiteffekt geben. In weiterführenden Untersuchungen sollte deswegen der Zellzahlverlauf über die restliche Zeit der Laktationsperiode nach der letzten Behandlung herausgefunden werden. Dies könnte über regelmäßige Viertelgemelksproben geschehen, die vom Tierhalter genommen werden könnten oder über die Milchleistungsdaten der regelmäßigen Milchqualitätskontrollen. Um die bakteriologische Heilungsrate mit anderen Studien besser vergleichen zu können, sollten nach Behandlungsende zwei bakteriologische Untersuchungen durchgeführt werden. Ein weiterer Aspekt ist der Wirkmechanismus. Dieser konnte mit dem vorliegenden Studiendesign nicht geklärt werden (Tracey 2002). Der Fokus der Aurikulothérapie sollte künftig auf den Positionen 9 und 10 liegen. Die Therapie mittels Injektionen hat hier eine Wirkung gezeigt. Neben der Injektionstherapie führen andere Autoren die Stimulation mittels Elektroakupunktur durch (Hong et al. 2018) oder mittels eines Laserhandgerätes (Round et al. 2013). Die Anschaffungskosten für Therapielaser und Elektroakupunkturgeräte sind im Gegensatz zur Injektionstherapie deutlich höher. Die Laserbehandlung dürfte aber dafür im Gegensatz zur Injektionstherapie einfacher in der Durchführung sein, da es sich um ein nicht invasives Verfahren handelt und somit weniger Abwehrreaktionen vom Tier zu erwarten sind.

5. Zusammenfassung

In dieser Untersuchung soll die Hypothese getestet werden, dass die Neuraltherapie am aurikulären Ast des *N. vagus* bei Milchkühen mit einer subklinischen Mastitis, zu einer Verringerung der somatischen Zellzahl in der Milch führt. Die subklinische Mastitis ist eine der wirtschaftlich wichtigsten Erkrankungen in Milchviehbetrieben und führt zu erheblichen Verlusten in der Milchwirtschaft weltweit. Die therapeutischen Möglichkeiten basieren meist auf dem Einsatz von Antibiotika und führen oft zu unbefriedigenden Ergebnissen. Die Etablierung einer wirksamen und wirtschaftlichen Therapie frei von Nebenwirkungen ist von Interesse. Die entzündungshemmenden Eigenschaften des stimulierten *N. vagus* in verschiedenen Organen des Körpers wurde bereits nachgewiesen und wird in dieser Arbeit bei Milchkühen mit subklinischer Mastitis über den aurikulären Ast der *N. vagus* untersucht. Die Aurikulotherapie wurde mit drei wiederholten Infiltrationen von 8,0 mg (0,4 ml) Procainhydrochlorid (2 %) an der Stelle der Ohrmarken durchgeführt, die bei richtiger Platzierung dem aurikulären Akupunkturpunkt des Euters entspricht. 85 klinisch gesunde Kühe aus neun Milchviehbetrieben wurden an vier Studientagen (0, 2, 4 und 6) beprobt, um die Anzahl der somatischen Zellen pro Euterviertel zu bestimmen. Euterviertel mit einem Milchzellgehalt >100.000 Zellen/ml an Tag 0 wurden auch an den weiteren Tagen in die Analyse mit einbezogen. Während des Studienzeitraums wurde die Zellzahl von insgesamt 784 Viertel analysiert, 385 Viertel von insgesamt 40 Kühen waren in der Kontrollgruppe und 399 Viertel von insgesamt 45 Kühen waren in der Behandlungsgruppe. Die Ergebnisse zeigten, dass die Aurikulotherapie des aurikulären Astes des *N. vagus* zu einer signifikanten Reduzierung der somatischen Zellzahl in der Milch führte. Die Wirkung war unabhängig von den bakteriologischen Kulturergebnissen der Viertelgemelksproben. Die bakteriologische Heilungsrate jedoch wurde durch drei aufeinanderfolgende aurikulotherapeutische Behandlungen nicht beeinflusst. Dies ist der erste Bericht über die Reduktion der somatischen Zellzahl in Viertelgemelksproben bei Milchkühen mit subklinischer Mastitis durch Aurikulotherapie. Weitere Untersuchungen sollten sich auf die Wirkungsweise der Aurikulotherapie bei Milchkühen mit subklinischer Mastitis konzentrieren. Darüber hinaus wären die langfristigen Auswirkungen der Aurikulotherapie auf

456 die Verringerung der somatischen Zellzahl und auf die Eliminierung von Bakterien bei
457 subklinischer Mastitis von Interesse.

6. Summary

This study aims to test the hypothesis that neural therapy on the auricular branch of the vagal nerve in dairy cows diagnosed with subclinical mastitis (SCM) results in a reduction of the milk somatic cell count (SCC). SCM is one of the most important problems in dairy farms, leading to substantial economic losses in dairy industry worldwide. Therapeutic options mostly are based on the use of antibiotics and often lead to unsatisfactory results. The identification of an effective and economical therapy free of side effects would be of interest. The anti-inflammatory effect of the stimulated vagal nerve in various organs of the body has already been demonstrated and was studied in this work in dairy cows with SCM via the auricular branch of the vagal nerve. Auriculotherapy (AT) was performed using three repeated infiltrations of 8.0 mg (0.4 mL) procain hydrochloride (2%) at the location of the ear tags associated with the auricular acupuncture point of the udder. 85 clinically healthy cows from nine dairy farms were sampled for evaluation of quarter somatic cell count (QSCC) on four days (d0, d2, d4 and d6). Quarters with a QSCC >100,000 cells/mL on d0 were included in the analysis. Over the study period, a total of 784 quarters were analyzed, 385 control (CON) quarters from 40 cows and 399 treated (TRE) quarters from 45 cows. Results showed that auriculotherapy of the auricular branch of the vagal nerve resulted in a significant reduction of the SCC. The effect was independent of bacteriological culture results of the quarter milk samples. However, the bacteriological cure rate was not influenced by three consecutive AT treatments. This is the first report of auriculotherapy reducing QSCC in dairy cows with SCM as an alternative therapeutic approach. Further research should focus on the pathways of auriculotherapy in dairy cows with SCM. Furthermore, long-term effects of AT on the reduction of SCC and on bacterial elimination in SCM would be of interest. Further studies should also aim to explore the underlying mechanism of the healing effect of auriculotherapy on somatic cell counts.

7. Literaturverzeichnis

- Ambronn G, Petermann U, Werner L** (2001) Ohrakupunktur in der Veterinärmedizin: Anwendung bei den wichtigsten Tierarten. 1. Auflage. Hrsg: Sonntag, J. Stuttgart, Deutschland.
- Andersson U, Tracey KJ** (2012) Neural reflexes in inflammation and immunity. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 1057–1068.
- Artmeier P, König H** (1978) Über die Ohrakupunktur beim Hund. *Kleintierpraxis* **23**, 299–306.
- Bao N, Wang Q, Jia YJ, Yang K, Kong LJ, Sun YH, Li XF, Jing Xu J, Zhang XP, Zhang X, Du YZ, Li JL, Yang QQ, Feng XX, Shi J, Jia CS, Wang JL** (2017) [Research of Characteristics of Stimulation Methods and Application of Acupoint in Auricular Needle Therapy Based on Data Mining] [Abstract]. *Zhen Ci Yan Jiu* **42**, 372–376.
- Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN** (2006) Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science* **89**, 1877–1895.
- Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S** (2017) Vagus nerve stimulation: A new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine* **282**, 46–62.
- van den Borne BHP, Halasa T, van Schaik G, Hogeveen H, Nielen M** (2010a) Bio-economic modeling of lactational antimicrobial treatment of new bovine subclinical intramammary infections caused by contagious pathogens. *Journal of Dairy Science* **93**, 4034–4044.
- van den Borne BHP, van Schaik G, Lam TJGM, Nielen M** (2010b) Therapeutic effects of antimicrobial treatment during lactation of recently acquired bovine subclinical mastitis: Two linked randomized field trials. *Journal of Dairy Science* **93**, 218–233.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ** (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **405**, 458–462.

516 **Bradley A, Green M** (2005) Use and interpretation of somatic cell counts in the dairy
517 cow. *In Practice* **27**, 310–315.

518 **Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen** (2021) Arzneispezialitätenregis-
519 ter. Accessed January 6, 2021. [https://aspregister.basg.gv.at/aspregister/faces/aspregister.jspx?_afLoop=2355879450739585&_afWindowMode=0&_adf.ctrl-](https://aspregister.basg.gv.at/aspregister/faces/aspregister.jspx?_afLoop=2355879450739585&_afWindowMode=0&_adf.ctrl-state=721dikyvw_4)
520 [state=721dikyvw_4](https://aspregister.basg.gv.at/aspregister/faces/aspregister.jspx?_afLoop=2355879450739585&_afWindowMode=0&_adf.ctrl-state=721dikyvw_4).

522 **Catozzi C, Cuscó A, Lecchi C, De Carlo E, Vecchio D, Martucciello A, D'Angelo**
523 **L, Francino O, Sanchez Bonastre A, Cecilian F** (2019) Impact of intramammary
524 inoculation of inactivated *Lactobacillus rhamnosus* and antibiotics on the milk micro-
525 biota of water buffalo with subclinical mastitis. *PLOS ONE* **14**, e0210204.

526 **Courties A, Berenbaum F, Sellam J** (2021) Vagus nerve stimulation in musculo-
527 skeletal diseases. *Joint Bone Spine* **88**, 424–429.

528 **De Vlieghe S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW** (2012) Invited re-
529 view: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and
530 control. *Journal of Dairy Science* **95**, 1025–1040.

531 **Down PM, Green MJ, Hudson CD** (2013) Rate of transmission: A major determinant
532 of the cost of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* **96**, 6301–6314.

533 **Drewes AM, Brock C, Rasmussen SE, Møller HJ, Brock B, Deleuran BW, Farmer**
534 **AD, Pfeiffer-Jensen M** (2021) Short-term transcutaneous non-invasive vagus nerve
535 stimulation may reduce disease activity and pro-inflammatory cytokines in rheuma-
536 toid arthritis: results of a pilot study. *Scandinavian journal of rheumatology* **50**, 20–27.

537 **Egerbacher M, Layroutz A** (1996) Der Akupunkturpunkt. Ergebnisse histologisch-
538 anatomischer Untersuchungen von Körper- und Ohr-Akupunkturpunkten. *Wiener*
539 *Tierärztliche Monatszeitschrift* **83**, 359–365.

540 **Erskine RJ, Wagner S, DeGraves FJ** (2003) Mastitis therapy and pharmacology.
541 *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **19**, 109–138.

542 **Fox LK, Chester ST, Hallberg JW, Nickerson SC, Pankey JW, Weaver LD** (1995)
543 Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturi-
544 tion. *Journal of Dairy Science* **78**, 1619–1628.

545 **Gao XY, Li YH, Liu K, Rong PJ, Ben H, Li L, Zhu B, Zhang SP** (2011) Acupunc-

ture-like stimulation at auricular point Heart evokes cardiovascular inhibition via activating the cardiac-related neurons in the nucleus tractus solitarius. *Brain Research* **1397**, 19–27.

Golder HM, Hodge A, Lean IJ (2016) Effects of antibiotic dry-cow therapy and internal teat sealant on milk somatic cell counts and clinical and subclinical mastitis in early lactation. *Journal of Dairy Science* **99**, 7370–7380.

Gori L, Firenzuoli F (2007) Ear acupuncture in european traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* **4**, 13–16.

Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly* **29**, 18–31.

Hashemi M, Kafi M, Safdarian M (2011) The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* **12**, 236–241.

He W, Wang X, Shi H, Shang H, Li L, Jing X, Zhu B (2012) Auricular acupuncture and vagal regulation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, Article ID 786839, 6 pages.

Hiitiö H, Vakkamäki J, Simojoki H, Autio T, Junnila J, Pelkonen S, Pyörälä S (2017) Prevalence of subclinical mastitis in finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Veterinaria Scandinavica* **59**, 14 pages.

Hong GS, Zillekens A, Schneiker B, Pantelis D, Jonge W, Schaefer N, Kalff J, Wehner S (2018) Non-invasive transcutaneous auricular vagus nerve stimulation prevents postoperative ileus and endotoxemia in mice. *Neurogastroenterology & Motility* **31**, e13501.

International Dairy Federation (2013) Guidelines for the use and interpretation of bovine milk somatic cell counts (SCC) in the dairy industry. International Dairy Federation AISBL, Brussels.

Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Ross RP, Hill C, Meaney W (2008) Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *The Journal of dairy research*, **75**, 365–373.

577 **Kothbauer O** (1986) Studie zur Ohrakupunktur des Rindes. *Wiener Tierärztliche*
578 *Monatszeitschrift* **4/5**, 177–180.

579 **Kothbauer O** (1999) Veterinary Acupuncture - Basic principles and their clinical ap-
580 plications on cattle: with ear acupuncture on cattle and some references to the horse.
581 Zweimühlen-Verlag, München, Deutschland.

582 **Krömker V, Leimbach S** (2017) Mastitis treatment—reduction in antibiotic usage in
583 dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* **52**, 21–29.

584 **Leitner G, Zilberman D, Papirov E, Shefy S** (2018) Assessment of acoustic pulse
585 therapy (apt), a non-antibiotic treatment for dairy cows with clinical and subclinical
586 mastitis. *PLOS ONE* **13**, e0199195.

587 **Litscher D, Litscher G** (2016) The history of liquid ear acupuncture and the current
588 scientific state of the art. *Journal of Pharmacopuncture* **19**, 109–113.

589 **McDougall S** (2021) Evaluation of fully oxidised β -carotene as a feed ingredient to
590 reduce bacterial infection and somatic cell counts in pasture-fed cows with subclinical
591 mastitis. *New Zealand Veterinary Journal* **69**, 285-293.

592 **Maier SF, Goehler LE, Fleshner M, Watkins LR** (1998) The role of the vagus nerve
593 in cytokine-to-brain communication. *Annals of the New York Academy of Sciences*
594 **840**, 289–300.

595 **McDougall S, Parker KI, Heuer C, Compton CWR** (2009) A review of prevention
596 and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology*
597 **134**, 177–185.

598 **Nagahat H, Mukai T, Natsume Y, Okuda M, Ando T, Hisaeda K, Gondaira S, Hi-**
599 **guchi H** (2020) Effects of intramammary infusion of Bifidobacterium breve on mastitis
600 pathogens and somatic cell response in quarters from dairy cows with chronic sub-
601 clinical mastitis. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* **91**, e13406.

602 **Narayana SG, Miglior F, Naqvi SA, Malchiodi F, Martin P, Barkema HW** (2018)
603 Genetic analysis of subclinical mastitis in early lactation of heifers using both linear
604 and threshold models. *Journal of Dairy Science* **101**, 11120–11131.

605 **Nickel R, Schummer A, Seiferle E** (2004) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere
606 Band 1-4: 4. unveränderte Auflage. Parey.

607 **Nogier R** (2014) How did paul nogier establish the map of the ear?. *Medical Acu-*
608 *puncture* **26**, 76-83.

609 **Pellissier S, Dantzer C, Mondillon L, Trocme C, Gauchez AS, Ducros V, Mathieu**
610 **N, Toussaint B, Fournier A, Canini F, Bonaz B** (2014) Relationship between vagal
611 tone, cortisol, TNF-alpha, epinephrine and negative affects in Crohn's disease and
612 irritable bowel syndrome. *PloS one* **9**, e105328.

613 **Round R, Litscher G, Bahr F** (2013) Auricular acupuncture with laser. *Evidence-*
614 *Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, Article ID 984763, 22 Seiten.

615 **Sandgren CH, Waller KP, Emanuelson U** (2008) Therapeutic effects of systemic or
616 intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation.
617 *The Veterinary Journal* **175**, 108–117.

618 **Schleip R, Findley TW, Chaitow L, Huijing P** (2013) Fascia: The Tensional Net-
619 work of the Human Body. Elsevier.

620 **Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F** (2003) Production effects related to mastitis
621 and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research* **34**, 475–491.

622 **Soliman N, Frank BL** (1999) Auricular acupuncture and auricular medicine. *Physical*
623 *Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* **10**, 547–554.

624 **Tracey KJ** (2002) The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853–859.

625 **Wander R, Weinschenk S** (2012) 7.12 - Neural Therapy. Editors: Schleip R, Findley
626 TW, Chaitow L, Huijing P. Fascia: The Tensional Network of the Human Body.
627 Churchill Livingstone, 375-381.

628 **WHO** (2019) Antibiotic resistance: Using a cultural contexts of health approach to ad-
629 dress a global health challenge. *Cultural Contexts of Health and Well-being* **2**, 1–62.

630 **Wu Q, Liu M, Yang J, Wang JF, Zhu YH** (2015) Lactobacillus rhamnosus gr-1 ame-
631 liorates escherichia coli– induced inflammation and cell damage via attenuation of
632 asc-independent nlrp3 inflammasome activation. *Applied and Environmental Microbi-*
633 *ology* **82**, AEM.03044-15.

634 **Xu F, Liu X, Liu Z, Chen JS, Dong B** (1992) [The role of ear electroacupuncture on
635 arterial pressure and respiration during asphyxia in rabbits]. *Zhen ci yan jiu - Acu-*
636 *puncture research* **17**, 36–32.

637 **Zohmann A** (1989) Die Blockade des Ganglion cervicothoracicum (stellatum) beim

638 Hund zur Untersuchung der Beteiligung des sympathischen Nervensystems an der
639 Projektion eines gereizten Organes in die Ohrmuschel. Dissertation. Veterinärmedizi-
640 nische Universität Wien, Wien.
641 **Zohmann A, Kasper M** (1994) Neuraltherapie in der Veterinärmedizin: Grundlagen-
642 Diagnose-Therapie. Schlütersche Verlag, 236 Seiten.