

Aus dem Klinischen Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinisches Zentrum für Wiederkäuer- und Kamelidenmedizin

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek, Dipl.ECBHM)

**Entwicklung definierter Kennzahlen zur Eutergesundheit und Melkhygiene in einem
Milchviehbetrieb nach Umzug in einen Liegeboxenlaufstall mit Einstreu von
Güllefeststoffen und Umstellung auf ein automatisches Melksystem**

Diplomarbeit
zur Erlangung der Würde eines
MAGISTER MEDICINAE VETERINARIAE
der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Daniel Heneckl

Wien, im April 2024

1. Begutachter und Betreuer: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek, Dipl.ECBHM

Klinisches Zentrum für Wiederkäuer- und Kamelidenmedizin

Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen

Veterinärmedizinische Universität Wien

Mitbetreuende wissenschaftliche Assistentin:

Dr.med.vet. Martina Baumgartner

2. Begutachter: PD Dr.med.vet. Michael Iwersen

Zentrum für Systemtransformation und Nachhaltigkeit in der Veterinärmedizin

Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen

Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitenden Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	6
2.	ABSTRACT	7
3.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
4.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	9
5.	LITERATURÜBERSICHT	10
5.1.	BEDEUTUNG UND EPIDEMIOLOGIE DER WICHTIGSTEN MASTITISERREGER.....	10
5.2.	KUHASSOZIIERTE MASTITISERREGER	10
5.2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	11
5.2.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	11
5.2.3.	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	12
5.2.4.	<i>Mykoplasmen</i>	12
5.3.	UMWELTASSOZIIERTE MASTITISERREGER.....	12
5.3.1.	<i>Streptococcus uberis</i>	13
5.3.2.	<i>Enterokokken</i>	13
5.3.3.	<i>Enterobacteriaceae</i>	13
5.3.4.	<i>Nicht-Aureus Staphylokokken</i>	15
5.4.	DIE MELKUNG ALS RISIKOFAKTOR FÜR EUTERERKRANKUNGEN.....	15
5.4.1.	Melken mit automatischen Melksystemen	16
5.4.2.	Gesetzliche Vorgaben für automatisches Melken	16
5.5.	GÜLLESEPARAT ALS RISIKOFAKTOR FÜR DIE EUTERGESUNDHEIT	17
5.5.1.	Einsatz von Gülleseparat in der Milchviehhaltung.....	17
5.5.2.	Gesetzliche Vorgaben für den Einsatz in der Milchviehhaltung	18
6.	MATERIAL UND METHODEN.....	19
6.1.	BETRIEBSERHEBUNG	19
6.2.	PROBENNAHME UND SPEZIELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ERHEBUNG DER EUTERGESUNDHEIT	19
6.2.1.	Aseptische Entnahme von Viertelgemelksproben für die bakteriologische Untersuchung..	19
6.2.2.	Zitzentupferproben.....	20

6.2.3. Tupferproben der Melkbecher	21
6.3. LABORDIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN	22
6.3.1. Bakteriologische Untersuchung der Viertelgemelksproben	22
6.3.2. Bakteriologische Untersuchung der Zitzentupferproben.....	23
6.3.3. Tankmilchzellzahl und -keimzahl	23
6.3.4. LKV-Daten	23
6.3.5. Roboterdaten	23
6.4. STATISTISCHE AUFARBEITUNG	24
7. ERGEBNISSE.....	25
7.1. ERGEBNISSE DER BETRIEBSERHEBUNG.....	25
7.2. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE EUTERGESUNDHEIT	27
7.2.1. Bakteriologische Untersuchung Viertelgemelksproben	27
7.2.2. Bakteriologische Untersuchung der Tupferproben der Zitzenhaut und Zitzenspitze.....	30
7.2.3. Bakteriologischer Untersuchung von Tupferproben der Melkbecher (Zitzengummi)	34
7.2.4. Auswertung der LKV-Daten.....	36
7.2.5. Verlauf der Tankmilchzellzahlen.....	37
7.2.6. Auswertung der Melkroboterdaten	38
8. DISKUSSION	40
8.1 UMSTELLUNG VON KONVENTIONELLER MELKUNG AUF EIN AMS - EINFLUSS AUF DIE EUTERGESUNDHEIT	40
8.2 EINFLUSS DER EINSTREU VON GÜLLESEPARAT AUF DIE BELASTUNG DER ZITZENHAUT MIT POTENZIELL EUTERPATHOGENEN KEIMEN	42
8.3 WICHTIGE KONTROLLPUNKTE FÜR DIE SICHERSTELLUNG DER EUTERGESUNDHEIT	44
9. SCHLUSSFOLGERUNG	46
10. LITERATUR	47
11. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	55
12. TABELLENVERZEICHNIS	57
DANKSAGUNG	58

1. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von als Einstreu verwendetem Gülleseparat auf die Eutergesundheit von Milchkühen in einem Liegenboxenlaufstall mit automatischen Melksystem zu klären. Hierzu wurde ein Milchviehbetrieb in Oberösterreich bei der Umstellung von Anbinde- in Laufstallhaltung mit Liegeboxen und Einstreu von Güllefeststoffen wissenschaftlich begleitet: Bei insgesamt fünf Betriebsbesuchen wurden aseptische Viertelgemelksproben, Tupfer von Zitzenhaut und Zitzenspitze und Tupferproben der Melkbecher genommen. Weiters wurden Tankmilchzellzahlen und Milchleistungsdaten des Betriebes sowie Daten des Melkroboters, die Anzahl der Melkungen/Tier/Tag, Milchmenge/Melkung/Tier und die Anzahl der unvollständigen Melkungen/Woche in die Untersuchungen einbezogen. Als eine wesentliche Maßnahme wurden alle fünf positiv auf *S. aureus* getesteten Tiere vor dem Umzug in den neuen Laufstall aus dem Bestand ausgeschieden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellzahlen im Betrieb nach der Umstellung im Jahresverlauf kontinuierlich sanken und sich unter 100 000 Zellen pro Milliliter einpendelten. Der Prozentsatz der BU-negativen Tiere stieg von 75 % vor der Umstellung auf 81 % (BU im Juni 2022). Nach Umstellung auf Liegeboxenlaufstall mit Einstreu und Separatormaterial und Implementierung eines automatischen Melksystemes traten vermehrt umweltassoziierte Mastitiserreger auf (Nicht-Aureus Staphylokokken, Streptokokken, Coliforme). Die Untersuchung von Tupferproben der Zitzenhaut und Zitzenspitze ergab, dass die Gesamtkeimzahl an der Strichkanalmündung zwischen der ersten Untersuchung in der Umstellungsphase im Jänner und der dritten Untersuchung im Juni statistisch signifikant von $1,2 \times 10^6$ KBE auf 96×10^3 KBE (Median, n=10) absank ($p < 0,05$). Gleichzeitig kam es zu einem signifikanten Anstieg der Coliformen und Enterokokken in den Tupferproben der Zitzenhaut: die Coliformen stiegen von durchschnittlich (Median) 14 KBE/cm² in der Umstellungsphase auf 120 KBE/cm² im Juni, die Enterokokken von 38 KBE/cm² auf 750 KBE/cm² ($p < 0,05$) im selben Zeitraum. Die Untersuchung von Tupferproben der Melkbecher ergab, dass durch Zwischendesinfektion mit Peressigsäure eine Reduktion der Keimbelastung von 87,1 % bis zu 99,6 % erzielt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass Gülleseparat als Einstreumaterial zu einer vermehrten Besiedelung der Zitzenhaut mit umweltassoziierten Mastitiserregern führt, die durch ein konstantes Hygienemanagement niedrig gehalten werden muss.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of recycled manure solids (RMS) used as bedding material on the udder health of dairy cows in a free stall barn with an automatic milking system. For this purpose, udder health of cows in an Austrian farm changing from a tie stall with conventional milking to a free stall barn with automatic milking was investigated over a study period of nine months. Quarter milk samples, swabs from teat skin and teat orifice and swabs from the teat cups were taken aseptically during 5 farm visits and examined bacteriologically according to standardized protocols. In addition, data provided by the milking robot (e.g., milk yield, milking frequency), bulk milk somatic cell counts (BMSCC) and single cow SCC from the monthly Dairy Herd Improvement (DHI) program were evaluated. Before transition to the new barn five cows tested positive for *S. aureus* were culled. SCC decreased continuously after transition to the new barn. Bacteriological examinations (BE) confirmed a shift from *S. aureus* to Non-Aureus Staphylococci and environmental streptococci in the follow-up herd visits in April and June 2022. BE of teat swabs revealed a significant reduction of total bacterial counts on the teat orifice between January and June 2022 ($p < 0.05$) from 1.2×10^6 to 96×10^3 (median, $n=10$) while bacterial counts of coliforms and enterococci on the teat skin increased significantly from 14 (median, $n=8$) to 120 CFU/cm² teat skin ($n=7$) for coliforms, respectively from 38 ($n=8$) to 750 CFU/cm² ($n=8$) for environmental streptococci ($p < 0.05$). Swab samples of the teat cups showed that automated cluster disinfection with peracetic acid achieved a reduction in CFU between 87.05 % and 99.6 %. Our study suggests that RMS as bedding facilitate colonization of teat skin with environmental pathogens. It is concluded that strict hygiene measures as well as a proactive management of the dairy herd and the automatic milking system are necessary to ensure udder health in farm with recycled manure solids as a bedding material and robotic milking.

3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMS	Automatisches Melksystem
BAA	Galle-Äsculin-Azid-Agar
CMT	California Mastitis Test
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E.	Escherichia
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
FEQ	Fett-Eiweiß-Quotient
GKZ	Gesamtkeimzahl
KAA	Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar
KBE	Koloniebildende-Einheit
<i>Kl.</i>	<i>Klebsiella</i>
KOH	Kaliumhydroxid
LKV	Leistungskontrollverband
LPS	Lipopolysaccharide
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
NAS	Nicht- Aureus Staphylokokken
NMC	National Mastitis Council
PAMP	Pathogen-Assoziiertes Molekulares Muster
Se.	Serratia
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sc.</i>	<i>Streptococcus</i>

4. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Technik der Gülle-Separation für die Gewinnung von Einstreumaterial für Liegeboxen im Milchviehlaufstall wird zunehmend genutzt. In grünlandbetonten Gebieten lässt sich dies vor allem mit betriebswirtschaftlichen Überlegungen erklären, da Stroh im Betrieb selbst nicht immer anfällt und der Zukauf von Einstreumaterial durch Einsatz von Gülle-Separat reduziert werden kann. Aber auch aus ökologischer Sicht macht es Sinn, Gülle von Feststoffen zu trennen, da bei der Düngung der Futterflächen die flüssige Phase, welche bei der Separation entsteht, die Pflanzendecke besser durchdringt und somit weniger Stickstoff in die Luft verloren geht. Aber wie lassen sich diese Vorteile mit Gesichtspunkten der Eutergesundheit vereinbaren? Da dieses Einstreumaterial mikrobiell belastet ist, und der Einsatz in Milchviehbetrieben kontroversiell diskutiert wird, wurde dieses Thema für die Untersuchung aufgegriffen. Dazu wurde der Umstieg von Anbindehaltung mit Gummimatten und Sägespänen als Einstreu auf Laufstallhaltung mit Einstreu separierter Gülle in Tiefboxen in einem landwirtschaftlichen Betrieb wissenschaftlich begleitet. Gleichzeitig erfolgte im Versuchsbetrieb auch eine Umstellung der Melktechnik von Rohmelkanlage auf ein automatisches Melksystem (AMS), was eine weitere Herausforderung darstellte. Folgende Hypothesen sollten im Rahmen dieser Diplomarbeit geprüft werden:

1. Durch die Einstreu von separierter Gülle werden die Zitzenhaut und auch die Melkbecher mit potenziell euterpathogenen Keimen belastet.
2. Durch ein konstantes Hygienemanagement gelingt es, das Risiko für intramammäre Infektionen bei Umstieg auf ein AMS niedrig zu halten. Nach einem umstellungsbedingten Anstieg der Zellzahl sinkt diese wieder auf das Niveau vor der Umstellung ab.
3. Die Verwendung definierter Kontrollpunkte ist ein hilfreiches Steuerungsinstrument für die Sicherstellung der Eutergesundheit

Zur Testung dieser Hypothesen wurde der Eutergesundheitsstatus im Betrieb vor der Umstellung, in der Umstellungsphase und einige Monate nach der Umstellung durch bakteriologische Untersuchungen von Viertelgemelksproben, Zitzenhauttupfern und Tupferproben der Melkbecher dokumentiert. Gleichzeitig wurden wichtige Kennzahlen für die Eutergesundheit (Zellzahlverlauf, Auftreten klinischer Mastitiden, Kennzahlen für das Melkmanagement beim Melkroboter, etc.) erhoben und ausgewertet.

5. LITERATURÜBERSICHT

Mastitiden sind multifaktorielle Erkrankungen: Neben den mikrobiellen Auslösern und tierspezifischen Faktoren (wie Alter oder Laktationsstadium) haben vor allem Managementfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf das Auftreten und den Verlauf der Erkrankung (1). In der Literaturübersicht wird daher im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit auf die wichtigsten Einflussfaktoren eingegangen, wobei die Mastitis-Pathogene als direkte Auslöser von Mastitiden sowie die Melkung (mit dem Schwerpunkt Eutergesundheit und AMS) und Aufstallung (mit dem Schwerpunkt Einstreuverfahren) als wichtigste Einflussgrößen beschrieben werden.

5.1. Bedeutung und Epidemiologie der wichtigsten Mastitiserreger

Als Mastitis wird eine entzündliche Erkrankung des Euters bezeichnet, die in den meisten Fällen nach einer Infektion mit Bakterien entsteht (2). Mastitiserreger können je nach dem primären Erregerreservoir in kuh- bzw. umweltassoziierte Pathogene eingeteilt werden, auch wenn neuere epidemiologische Studien mit molekularen Methoden zeigen, dass die Grenzlinie zwischen kontagiös und umweltassoziiert teilweise mehr auf Stammes- als auf Speziesebene verläuft (2).

Umweltassoziierte Mastitiden werden durch Bakterien ausgelöst, die aus dem unmittelbaren tierischen Umfeld in die Milchdrüse gelangen. Dagegen werden kontagiöse Mastitiden von Bakterien verursacht, welche besonders an die Milchdrüse adaptiert sind und über erregerhaltige Milch übertragen werden. Diese Einteilung wird häufig auch herangezogen, um gezielte Maßnahmen zur Vermeidung von Neuinfektion zu setzen.

5.2. Kuhassoziierte Mastitiserreger

Zu den weltweit bedeutendsten kuhassoziierten Mastitiserregern gehören *Staphylococcus* (S.) *aureus*, *Streptococcus* (Sc.) *agalactiae*, *Sc. canis*, *Mycoplasma bovis* sowie verschiedene Subspezies von *Sc. dysgalactiae* (3).

5.2.1. *Staphylococcus aureus*

Bei *S. aureus* handelt es sich um eine sehr häufige und bedeutende Ursache von Mastitiden bei Wiederkäuern. Untersuchungen zeigen, dass etwa 3 bis 5 % aller Kühe mit *S. aureus* infiziert sind (4). Die Mastitiden verlaufen meist subklinisch, klinische Fälle gehen mit Euterschwellung und Sekretveränderungen einher. Die ökonomische Bedeutung von *S. aureus* resultiert aus dem gehäuftem Auftreten der Erkrankung innerhalb der Herden, da es sich um kontagiöse Mastitiden mit negativen Einflüssen auf Milchleistung und Milchqualität handelt (5). Studien zeigen weiters, dass die bakteriologische Heilungsrate nach Therapie von einer Vielzahl von Faktoren abhängt: höheres Alter der Kuh, hohe Zellzahl in der Milch, länger andauernde Infektionen und mehrere infizierte Viertel wurden als kuhspezifische Faktoren identifiziert, die einen negativen Einfluss auf die Heilungsraten ausüben (6). Da *S. aureus* vor allem im Zuge der Melkung über Melkbecher, Reinigungstücher oder Hände des Melkers übertragen werden kann, ist es erforderlich, dass die im 5-Punkte- bzw. im 10-Punkte-Programm des National Mastitis Council (NMC) angeführten Maßnahmen konsequent umgesetzt werden. Diese umfassen neben einer strikten Melkhygiene (z. B. Zitendeseinfektion nach dem Melken) auch die regelmäßige Kontrolle der Melktechnik, die rasche Therapie klinischer Mastitiden, das antibiotische Trockenstellen und die Merzung chronisch infizierter Kühe (7, 8).

5.2.2. *Streptococcus agalactiae*

Mastitiden durch *Sc. agalactiae* werden auch als Gelber Galt bezeichnet. *Sc. agalactiae* gehört zu den Lancefieldgruppe-B-Streptokokken und ist ein hoch ansteckender, kuhassoziierter Mastitiserreger, der vor allem im Zuge der Melkung über Melkerhände, Zitzenbecher oder mangelhafte Zitzenreinigung vor dem Melken von Kuh zu Kuh übertragen wird (9). Gezielte prophylaktische Routinemaßnahmen hinsichtlich Melkhygiene (Einmalhandschuhe, Verwendung eines sauberen Reinigungstuches pro Kuh, Melkzeugzwischeninfektion) und die rasche Therapie aller infizierten Kühe innerhalb eines Betriebes sind Voraussetzung für eine Sanierung positiver Bestände (9). Durch diese Maßnahmen und durch das antibiotische Trockenstellen konnte die Prävalenz von Galtmastitiden stark verringert werden (10). Allerdings haben epidemiologische Untersuchungen gezeigt, dass neben bovinen Stämmen auch humanassoziierte Stämme am Infektionsgeschehen beteiligt sein können (11).

5.2.3. *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus (Sc.) dysgalactiae ist eine häufige Ursache von klinischen und subklinischen Eutererkrankungen. Etwa 2 bis 5 % aller klinischen Mastitiden sind auf Infektionen mit *Sc. dysgalactiae* zurückzuführen, wobei sowohl kontagiöse als auch umweltassoziierte Stämme beschrieben werden, welche sich hinsichtlich der Übertragungswege und Ansteckungsquellen unterscheiden. Vor allem in der Früh lactation, wenn das Immunsystem der Kuh durch diverse Stressoren rund um die Kalbung belastet ist (12) und durch Mängel in der Melkhygiene kann es zu kuhassoziierten Infektionen kommen, während umweltassoziierte Mastitiden vor allem aus Infektionen in der Trockenstehzeit hervorgehen können (3). Daneben erhöhen auch Zitzenverletzungen die Wahrscheinlichkeit für Infektionen des Euters.

5.2.4. *Mykoplasmen*

Beim Rind tritt vor allem *Mykoplasma (M.) bovis* auf, ein hochkontagiöser Mastitiserreger, der aber auch mit Pneumonien, Arthritiden, Otitis Media, Keratokonjunktivitis oder Infektionen des Reproduktionstraktes assoziiert sein kann (13). Innerhalb infizierter Herden breitet sich *M. bovis* sehr schnell aus. Akute Erkrankungen können mit schweren klinischen Symptomen, die teilweise mehrere Organsysteme betreffen, einhergehen (14). Euterentzündungen sind durch hochgradigen Milchrückgang bei gleichzeitig massivem Zellzahlanstieg charakterisiert. Sind Mykoplasmen in Populationen endemisch, werden häufiger subklinische und chronische Verlaufsformen beobachtet. Die Mastitiden sprechen auf antibiotische Therapien kaum an und verlaufen rasch chronisch. Mykoplasmen werden in der kulturellen Routinediagnostik oft nicht nachgewiesen, da sie sehr langsam wachsen und spezielle Inkubationsbedingungen benötigen.

5.3. Umweltassoziierte Mastitiserreger

Umweltassoziierte Mastitiden gehören zu den häufigsten Infektionen in großen und leistungsstarken Milchviehherden. Neben *Sc. uberis* und anderen grampositiven katalasen negativen und äskulin positiven Kokken (wie Enterokokken oder Laktokokken, die oft auch als Streptococci Like Organisms, SLO bezeichnet werden) gehören vor allem Coliforme zu den häufigsten ätiologischen Ursachen umweltassoziiierter Mastitiden.

5.3.1. *Streptococcus uberis*

Mit Prävalenzen von bis zu 37% gehört *Sc. uberis* zu den wichtigsten Ursachen klinischer Mastitiden (11). Als umweltassoziierter Mastitiserreger tritt er vorrangig in Form klinischer Mastitiden auf, daneben kommen auch subklinische Formen mit starker Zellzahlerhöhung vor (15). Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass es in manchen Betrieben auch zu Übertragung von *Sc. uberis* von Kuh zu Kuh kommen kann (16–18). In diesen Herden können neben unterschiedlichen Stämmen bei verschiedenen Kühen auch einheitliche und dominierende Stämme nachgewiesen werden (11). Weiters haben Kühe in der peripartalen Phase, sprich in der späten Trockenstehzeit sowie in der Früh lactation, ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit *Sc. uberis* (12, 19).

Sc. uberis kommt ubiquitär in der unmittelbaren tierischen Umgebung, aber auch im Kot und im Genitaltrakt vor. Weiters haben Untersuchungen gezeigt, dass eine Korrelation zwischen dem Keimgehalt im Kot und auf der Zitzenhaut besteht (20).

5.3.2. Enterokokken

Bei *Enterococcus (Ec.)* spp. (auch als Streptokokken der Lancefield-Gruppe D bezeichnet) sind als Ursache von Infektionen der Milchdrüse vor allem *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* zu nennen (21, 22). Diese Mastitiserreger sind Teil der physiologischen Darmflora vieler Säugetiere und verursachen umweltassoziierte Infektionen (23, 24). Weiters ist in Bezug auf die Lebensmittelsicherheit zu sagen, dass eine Übertragung von potentiell pathogenen und antimikrobiell resistenten Enterokokken auch über kontaminierte Lebensmittel möglich ist (21–23, 25).

5.3.3. *Enterobacteriaceae*

Mastitisrelevante *Enterobacteriaceae* werden häufig unter der Bezeichnung Coliforme zusammengefasst. Dieser Gruppe gramnegativer Stäbchen ist gemeinsam, dass die Mastitiden durch die Interaktion des bakteriellen Lipopolysacharids (LPS) mit der angeborenen Immunantwort im Euter entstehen (26). LPS ist ein Bestandteil der äußeren Zellwand und wird als Pathogen-Assoziiertes Molekulares Muster (PAMP) der Coliformen von spezifischen Rezeptoren der Makrophagen (Toll-Like Rezeptoren) erkannt, was zur Bildung von Zytokinen und in der Folge zu akuten Entzündungsreaktionen führt.

5.3.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia (E.) coli ist der häufigste gramnegative umweltassoziierte Mastitiserreger. Als ein Kommensale im tierischen Darm gelangt *E. coli* über den Kot in die Umwelt. Nach galaktogener Infektion treten meist akute Mastitiden mit Euterschwellung, Milchveränderung, aber auch mit Fieber, Festliegen und Pansenstillstand auf. Diese akuten Symptome werden durch LPS ausgelöst, welche Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien sind und bei Zelluntergang freigesetzt werden (26, 27). Aus diesem Grund wird zusätzlich zur antibiotischen Behandlung die Gabe von steroidal oder nicht-steroidal Antiphlogistika und eine Flüssigkeitstherapie notwendig (28–30). Studien haben gezeigt, dass der Schweregrad der Mastitis von tierspezifischen Faktoren wie Alter, Laktationsstadium aber auch von Umweltfaktoren wie Hitzestress beeinflusst wird (31).

5.3.3.2. *Serratia spp.*

Serratia (Serr.) spp. sind gramnegative Bakterien, die ebenfalls mit dem Kot ausgeschieden werden, wobei in Zusammenhang mit bovinen Mastitiden vor allem *Serr. marcescens* und seltener auch *Serr. liquefaciens* nachgewiesen werden (32). *Serr. marcescens* kommt ubiquitär vor (wird über Kot ausgeschieden), kann aber auch aus Pflanzenmaterial, feuchtem Futter und Wasserstellen isoliert werden (33). Untersuchungen von Ausbrüchen auf Herdenebene haben ergeben, dass es auch zu galaktogenen Infektionen durch kontaminierte Zitzendippmittel kommen kann (34). Die Infektionen können als akute klinische, aber auch als chronische und rekurrende Mastitiden mit Milchveränderung bzw. hohen Zellzahlen verlaufen (35).

5.3.3.3. *Klebsiella spp.*

Die zur Familie der Enterobacteriaceae gehörenden gramnegativen Mastitiserreger *Klebsiella (Kl.) pneumoniae* und *Kl. oxytoca* gehören ebenfalls zu den umweltassoziierten Pathogenen. Dieses Bakterium lässt sich auf den Laufgängen, in der Einstreu, in der Erde, im Wasser und im Kot von Säugetieren nachweisen (36). Besonders hoch belastet können Sägespäne sein. Eine durch *Kl. pneumoniae* ausgelöste Mastitis kann zu einem massiven Milchrückgang aber auch zum Tod des Tieres führen (37). Da dieser Erreger lange im Euter persistieren kann und antibiotisch kaum zu therapieren ist, muss der Fokus darauf liegen, eine Infektionen durch ein gutes Hygienemanagement zu verhindern (27, 38).

5.3.4. Nicht-Aureus Staphylokokken

Die Gruppe der Nicht-Aureus Staphylokokken (NAS) besteht aus mehr als 50 verschiedenen Spezien und in etwa ein Dutzend davon können regelmäßig in aseptisch entnommenen Milchproben nachgewiesen werden (39–41). Im Zusammenhang mit Mastitiden werden bei Kühen häufig *Staphylococcus (S.) chromogenes*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. epidermidis* und *S. xylosus* nachgewiesen (42–44). NAS sind Besiedler der Haut und können an der Zitzenspitze und im Strichkanal längere Zeit persistieren und eine Infektion der milchableitenden Wege sowie des Drüsengewebes bedingen (45–47). Häufig führt eine Infektion mit NAS zu subklinischen Mastitiden mit Zellzahlerhöhung oder zu mild verlaufenden klinischen Eutererkrankungen (48, 49). Da NAS auch als Besiedler des Strichkanales auftreten können, wird die klinische Relevanz teilweise kontrovers diskutiert. Einige Autoren betrachten NAS als wichtige Mastitiserreger mit hohem Maß an Antibiotikaresistenz und einer Fähigkeit, chronische Infektionen auszulösen (39, 50), andere wiederum schätzen das Risiko, welches von NAS hinsichtlich Eutergesundheit ausgeht, als eher gering ein und klassifizieren sie als minor pathogens (51). Es wird sogar beschrieben, dass das Vorhandensein auf der Zitzenspitze eine gewisse Schutzfunktion gegenüber Infektionen mit major pathogens darstellen kann (52).

5.4. Die Melkung als Risikofaktor für Eutererkrankungen

Der maschinelle Milchentzug ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung einer Mastitis. Das Infektionsgeschehen kann auf unterschiedliche Wege beeinflusst werden. Einerseits können durch ein kontaminiertes Melkgeschirr euterpathogene Erreger auf die Zitze und in weiterer Folge in das Euter transportiert werden. Dies ist besonders kritisch, wenn zuvor ein infiziertes Tier gemolken wurde und vor der nächsten Melkung das Melkgeschirr und die Zitzengummis nicht oder nicht genügend desinfiziert werden. So können durch Rückspül- bzw. Rückspray-Effekte Kontaminationen der Zitzenspitze erfolgen. Diese Effekte entstehen durch Vakuumschwankungen im System. Des Weiteren kann durch maschinellen Milchentzug das Zitzengewebe geschädigt werden, sodass die natürlichen mechanischen Abwehrmechanismen der Zitze, welche das Eindringen von Erregern verhindern können, beeinträchtigt sind (53).

5.4.1. Melken mit automatischen Melksystemen

Neuere Studien tragen vor allem der enormen Bedeutung automatischer Melksysteme (AMS) Rechnung und beschreiben spezifische Risikofaktoren in Betrieben mit Melkrobotertechnologie. Das Melken mit AMS hat gegenüber dem konventionellen Melksystem eine Reihe von Vorteilen: Im Vergleich zum konventionellen Melken erhöht sich die durchschnittliche Melkhäufigkeit und das Intervall zwischen den Melkungen kann kuhindividuell je nach Laktationsstadium eingestellt werden, was eindeutige Vorteile hinsichtlich Milchleistung und Eutergesundheit bringt (54). Darüber hinaus kann beim Melkroboter viertelbasiert gemolken werden, wodurch Blindmelken vermieden wird.

Die Tatsache, dass Melkroboter bisher nicht imstande sind, Zitzen entsprechend dem Verschmutzungsgrad zu reinigen, stellt eine Herausforderung dar. Auch die Erkennung von Mastitiden bzw. veränderter, und damit nicht verkehrsfähiger Milch, wird oft als Schwachpunkt bei der Beurteilung von AMS genannt (54).

5.4.2. Gesetzliche Vorgaben für automatisches Melken

Als Lebensmittelproduzenten gelten für Milcherzeuger die Verordnung (EG) Nr.178 (2002) für Lebensmittelsicherheit, die Verordnung (EG) Nr. 852 (2004) für Lebensmittelhygiene und die Verordnung (EG) Nr. 853 (2004) für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Die Anforderungen an Rohmilch werden in der VO (EG) Nr. 853 (2004) dargestellt. Das Melken muss unter hygienisch einwandfreien Bedingungen erfolgen und es muss gewährleistet sein, dass die Zitzen, das Euter und angrenzende Körperteile vor Melkbeginn sauber sind, sowie dass die Milch jedes Tieres vom Melker oder nach einer Methode, die zu gleichen Ergebnissen führt, auf organoleptische sowie abnorme physikalisch-chemische Merkmale hin kontrolliert wird. Milch mit abnormen Merkmalen darf nicht für den menschlichen Verzehr verwendet werden. Tiere, die infolge einer tierärztlichen Behandlung Rückstände in die Milch übertragen können, müssen eindeutig identifiziert werden können und Milch, die vor Ablauf der vorgeschriebenen Wartezeit gewonnen worden ist, darf nicht für den menschlichen Verzehr verwendet werden. Zitzenbäder und/oder -sprays dürfen nur verwendet werden, wenn sie von der zuständigen Behörde zugelassen wurden und so angewendet werden, dass sie nicht in unannehmbarem Ausmaß Rückstände in der Milch hinterlassen. Nach dem Melken muss die Milch unverzüglich an einen sauberen Ort gebracht werden, welcher so ausgeführt ist, dass eine Kontamination ausgeschlossen ist. Im Fall der täglichen Abholung muss die Milch auf max. 8°C und bei nicht

täglicher Abholung auf max. 6°C abgekühlt werden. Alle derzeit am Markt etablierten AMS können einige der in der VO (EG) Nr. 853 (2004) genannten Anforderungen nicht erfüllen: Dies betrifft vor allem die Kontrolle der Sauberkeit von Zitzen und Euter (55). Weiters können bislang Hersteller keinen Nachweis bringen, dass diese die Norm DIN 20966 "Automatische Melkeinrichtungen-Anforderung und Prüfung" gänzlich erfüllen. Deswegen gibt es seit 4. September 2012 ein verschärftes Regulativ für Betriebe mit automatischem Melksystem, das vorsieht, dass vier bis sechs Wochen und ein bis zwei Wochen vor der geplanten Umstellung des Melksystems Viertelgemelksproben der gesamten Herde zytobakteriologisch untersucht werden. Das Ziel ist, dass mit kuhassoziierten Erregern infizierte Tiere identifiziert werden und die Herde vor der Implementierung des AMS saniert werden kann. Weiter soll die zuständige Behörde über die Installation des AMS, über die zytobakteriologischen Untersuchungsergebnisse und über eventuell durchgeführte Sanierungsmaßnahmen informiert werden. Weiter soll der Betreiber der Anlage dafür sorgen, dass die Sauberkeit und die Gesundheit der Tiere zweimal täglich kontrolliert wird und der Betrieb an einer Prüfung in Anlehnung an die Milchleistungsprüfung teilnimmt. Hierbei sollen 30% der Tiere eine somatische Zellzahl von 250.000 Zellen/ml nicht überschreiten. Wird ein Zellgehalt von 400.000 Zellen/ml überschritten, sollen Maßnahmen zur Sicherstellung der Milchqualität eingeleitet werden (55).

5.5. Gülleseparat als Risikofaktor für die Eutergesundheit

Bei der Gülleseparierung werden die Faserstoffe aus der Gülle ausgepresst, zurück bleiben Dünngülle und Feststoffe, die entweder in Biogasanlagen oder als Einstreumaterial weiter Verwendung finden (56).

5.5.1. Einsatz von Gülleseparat in der Milchviehhaltung

Neben der Melkung können Einstreu und Haltung die Eutergesundheit wesentlich beeinträchtigen. In vielen Ländern werden Feststoffe aus der Gülleseparation bereits als Einstreumaterial eingesetzt (57, 58). Im Vergleich zu anderen Einstreumaterialien konnte in Gülleseparat ein deutlich höherer Keimgehalt nachgewiesen werden (59). Jedoch wird berichtet, dass kein Zusammenhang zwischen der Einstreu von Gülleseparat und einer erhöhten Mastitisinzidenz besteht (60). Obwohl das Einstreumaterial in den Liegeboxen die Hauptquelle für euterpathogene Krankheitserreger im Stall ist (61). Ausschlaggebend bei der

Verwendung von Gülleseparat speziell, hinsichtlich der Eutergesundheit, ist das Management des Betriebes (57).

5.5.2. Gesetzliche Vorgaben für den Einsatz in der Milchviehhaltung

In den EU-Verordnungen (EG) Nr. 1069/2009 und 142/2011 ist der Umgang mit tierischen Nebenprodukten geregelt. Das Gülleseparat wie auch die Dünngülle werden als unverarbeitete Gülle angesehen. Laut VO (EG) Nr. 1069/2009 darf unverarbeitete Gülle nur auf landwirtschaftlichen Flächen ausgebracht werden oder, durch in VO (EG) Nr. 142/2011 aufgeführten Vorgaben, zu verarbeiteter Gülle aufbereitet werden und dann in den Verkehr gebracht werden. Auf EU-Ebene ist der Einsatz von Gülleseparat als Einstreu nicht weiter geregelt. In einer Informationsbroschüre der österreichischen Landwirtschaftskammer, welche in Kooperation mit dem Forschungsinstitut Raumberg-Gumpenstein und dem Sozialministerium entstanden ist, wird darauf hingewiesen, dass bis auf eine anderslautende Regelung auf EU-Ebene Gülleseparat als Einstreumaterial eingesetzt werden kann, wenn für die Produktion der Einstreu nur betriebseigene Gülle verwendet wird, das Material am Betrieb bleibt und nur hofeigene Geräte verwendet werden (62). Bei gleichzeitiger Einhaltung der Grundsätze der guten landwirtschaftlichen Praxis wird dann von keinem erhöhten Hygienierisiko ausgegangen. Bei Separatoren, welche auf mehreren Betrieben eingesetzt werden, ist ein geeignetes Reinigungskonzept zu erstellen, um die Verbreitung von Krankheitserregern zwischen den Betrieben zu verhindern.

6. Material und Methoden

6.1. Betriebserhebung

Die Studie wurde auf einem Milchviehbetrieb in Oberösterreich durchgeführt, der von Anbindehaltung und konventioneller Melkung in einen Liegeboxenlaufstall mit Einstreu von Separatormaterial und Melkroboter übersiedelte. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von Anfang Oktober 2021 bis Juni 2022 und teilte sich in eine Phase vor der Umstellung (2 Betriebsbesuche), eine Umstellungsphase (1 Betriebsbesuch) sowie eine Phase nach der Umstellung (2 Betriebsbesuche). Im Rahmen der Betriebsbesuche wurden der Herdenstatus, Zell- und Keimzahlverlauf, Betriebshygiene, Herdenmanagement inkl. betriebsinterner Kontrolle der Eutergesundheit, Trockenstellverfahren, Melkhygiene und Melkarbeit, Mastitismanagement, Fütterung, Wasserversorgung und Tierhaltung dokumentiert. Weiters wurden bei allen Betriebsbesuchen Proben für weiterführende Untersuchungen entnommen. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Milchleistungsdaten, Tankmilchzellzahl und -keimzahl ausgewertet.

6.2. Probennahme und spezielle Untersuchungen zur Erhebung der Eutergesundheit

Bei jedem der fünf Betriebsbesuche wurden alle laktierenden Tiere beprobt. Es wurde ein Schalmtest durchgeführt und Viertelgemelksproben aseptisch für eine bakteriologische Untersuchung entnommen. Nach der Umstellung auf Einstreu mit Güllefeststoffen wurden bei den beiden Betriebsbesuchen noch Zitzenhauttupferproben für die Untersuchung der Keimbelastung auf der Zitzenhaut und der Zitzenspitze (Strichkanalmündung) entnommen. Weiters wurden beim letzten Betriebsbesuch auch Tupfer der Melkbecher des Roboters nach der Abnahme und nach der Zwischendesinfektion mit Peressigsäure entnommen.

6.2.1. Aseptische Entnahme von Viertelgemelksproben für die bakteriologische Untersuchung

Im Zuge der Milchprobenentnahme wurde ein California Mastitis Test durchgeführt. Anschließend wurden Viertelgemelksproben aseptisch für die bakteriologische Untersuchung entnommen (63). Dazu wurden die Zitzenkuppen bzw. die Strichkanalmündungen mit einem alkoholgetränkten Wattebausch desinfiziert, wobei eine vorgegebene Reihenfolge in der Weise eingehalten wurde, dass die Zitzenkuppen nicht durch die Desinfektion bzw.

Probennahme wiederum kontaminiert wurden. Die Milch wurde in sterile Probenröhrchen gemolken, die sofort verschlossen und bis zur Aufarbeitung der Proben im Labor gekühlt bei max. 6°C gelagert wurden.

6.2.2. Zitzentupferproben

Die Tupfer der Zitzenhaut und der Zitzenspitze wurden mit einer Nass-Trockentupfertechnik an der Zitzenhaut und an der Zitzenspitze nach einem modifiziertem Protokoll von (20) sowie (61) genommen. Die Probennahmen erfolgten an 10 Kühen, jeweils zum Zeitpunkt der Melkung (d. h. nachdem die Kuh die Melkbox mit Melkanrecht betreten hatte). Dazu wurde der Melkvorgang vor der automatisierten Reinigung mittels Reinigungsbecher unterbrochen. Anschließend wurden jeweils die Zitzen rechts vorne und links hinten mit trockenem Euterpapier grob gereinigt. Der erste Tupfer wurde in ein steriles 15 ml Kunststoffröhrchen (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Ö) mit Ringerlösung (Viertelstärke) Tabletten für Milchuntersuchung® (VWR International GmbH, Darmstadt, D) getaucht und an der rechten Zitze lateral über eine Länge von 5 cm (Lineal) über der Zitzenbasis angesetzt und horizontal liegend mit leichtem Druck in Richtung Zitzenkuppe geführt (Abbildung 1). In derselben Art und Weise und an derselben Stelle wurde der zweite und trockene Tupfer über die Zitze geführt. Die Zitze links hinten wurde auf die gleiche Weise beprobt, sodass insgesamt eine Fläche von annähernd 10 (2x5) cm² beprobt wurde. Im Anschluss daran wurden beide Tupferpaare (rechts vorne und links hinten jeweils feucht/trocken) in ein beschriftetes steriles Röhrchen mit 2 ml viertelstarker Ringerlösung überführt. Für die Probennahme an der Zitzenspitze (Strichkanalmündung) wurde ein Tupfer wie oben beschrieben angefeuchtet und direkt an die Strichkanalmündung rechts vorne bzw. links hinten vertikal angesetzt und mehrmals, leicht bohrend, um die Achse gedreht. Auf dieselbe Weise erfolgte wiederum die Entnahme des zweiten, jedoch trockenen Tupfers. Beide Tupferpaare wurden wiederum in ein Probenröhrchen mit 2 ml Ringerlösung überführt und gekühlt bis zur Aufarbeitung (innerhalb von max. 8 Stunden) transportiert bzw. gelagert.



Abb. 1: Vorgangsweise bei der Entnahme der Zitzenhauttupfer (links) bzw. der Tupferproben der Zitzenspitze (rechts). Feucht- und Trockentupfer des Zitzenpaares rv und lh wurden jeweils in einem sterilen Röhrchen mit 2 ml Ringerlösung aufgenommen (Mitte).

6.2.3. Tupferproben der Melkbecher

Für diese Beprobung wurden nur jene Kühe mit einer Melkberechtigung am AMS verwendet von denen auch Zitzenhauttupfer entnommen wurden. Um eine Beeinflussung der mikrobiellen Belastung der Zitzengummi durch die Zitzenhauttupfer zu vermeiden, wurden für die Tupferproben nur jeweils die Melkbecher rechts hinten und links vorne beprobt. Unmittelbar nachdem der Melkroboter den letzten Zitzenbecher abgenommen und in Parkposition gezogen hatte, wurde der Melkvorgang wiederum durch Umschalten in den manuellen Modus unterbrochen. Mit einem sterilen und nicht angefeuchteten Tupfer wurde die Probe von der Innenseite des Zitzengummischafes (Mitte) durch dreimalige spiralförmige Bewegung entnommen. Anschließend wurde der Tupfer wiederum in ein mit 2 ml viertelstarker Ringerlösung gefülltes Röhrchen überführt. Die Probennahme des Melkbeckers links vorne wurde auf dieselbe Weise durchgeführt, der Tupfer wurde in dasselbe Röhrchen aufgenommen wie die Tupferprobe des Melkbeckers, der links vorne angesetzt war. Alle Proben wurden rasch ins Labor der Klinik für Wiederkäuer transportiert, gekühlt gelagert und am nächsten Morgen ausplattiert.

6.3. Labordiagnostische Untersuchungen

6.3.1. Bakteriologische Untersuchung der Viertelgemelksproben

Für die bakteriologische Untersuchung wurden die Viertelgemelksproben bei 1300 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden Überstand (normal, leicht wässrig, stark wässrig oder serumartig) und Sediment nach Menge und Qualität (+ bis +++ weiß, gelb oder blutig) beurteilt. Dann wurde der Überstand dekantiert und das Sediment auf Schafblutagar SBA (Columbiaagar, Oxoid, Wesel, D) mit 5% Schafblut mittels Öse mäanderförmig ausgestrichen (alle vier Viertelgemelksproben auf eine Agarplatte). Ein zweiter Sedimentausstrich wurde auf einen Objektträger aufgetragen und für den semiquantitativen Nachweis von Leukozyten und Bakterien nach Gram gefärbt. Die Beurteilung erfolgte unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion). Nach jeweils 24 und 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Keimwachstum anhand von Kolonienmorphologie und Hämolyseverhalten beurteilt. Für die weitere Identifizierung bzw. Bestätigung wurden biochemische Testverfahren verwendet: Streptokokken wurden mithilfe des Katalase-Testes (Katalase-negativ) bestätigt und zur weiteren Differenzierung sowohl auf Galle-Äskulin-Azid Agar (BAA Agar, Merck Millipore, Darmstadt, D), auf SBA mit Äskulinzusatz (SBA+ESC, Merck Millipore) und auf einen modifizierten Rambachagar (MRAM) aufgebracht. Äskulinnegative Streptokokken wurden mittels Lancefield Serogruppenbestimmung (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid) weiterdifferenziert: Äskulinnegative α -hämolsierende Kokken der Lancefieldgruppe C wurden als *Sc. dysgalactiae* befundet. Typisch für *Sc. uberis* ist die Kolonienmorphologie auf Columbiaagar mit 5% Schafblut, fehlendes Wachstum auf BAA bei gleichzeitiger Äskulinspaltung auf SBA+ESC Agar und einem blaufarbenen Kolonienwachstum auf MRAM Agar (β -Galactosidase positiv). Enterokokken kennzeichnen sich durch Äskulin positives Wachstum auf SBA+ESC und einer Schwarzfärbung auf BAA.

Für katalasepositive Bakterien wurde ein KOH-Test durchgeführt. Bei positiven Kulturen wurde ein Oxidasetest zur Differenzierung zwischen Coliformen (Oxidase-negativ) von *Pseudomonas spp.* bzw. *Pasteurella spp.* (Oxidase-positiv) angeschlossen. Coliforme wurden weiter anhand der Kolonienmorphologie auf MacConkey (MAC) Agar (Oxoid) differenziert. Staphylokokken wurden mittels Clumping factor A Nachweis (Staphytest Plus, Oxoid) und Koagulasetest (Remel Coagulase plasma®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) als Nicht-Aureus Staphylokokken (NAS, beide Tests negativ, bzw. Clumpingfaktortest zwar positive., Koagulase -Röhrchentest jedoch negativ) oder als *S. aureus* (beide Tests positiv),

befundet. In der Routinediagnostik nicht eindeutig klassifizierbare Mastitis-Pathogene wurden mittels MALDI ToF MS an der Universitätsklinik für Geflügel und Fische identifiziert.

6.3.2. Bakteriologische Untersuchung der Zitzentupferproben

Für die bakteriologischen Untersuchungen zur mikrobiellen Belastung der Zitzenhaut, der Zitzenspitze und der Melkbecher wurde ein Plattenausstrichverfahren durchgeführt: je 100 µl Keimsuspension wurden unverdünnt, bzw. in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} mittels Spateltechnik auf SBA sowie auf die Selektivnährböden MAC Agar, BPA, Kanamycin Äskulin Azid Agar (KAA für Äskulinpositive Streptokokken) und BAA aufgebracht. Je nach Probenmaterial (Tupfer der Zitzenhaut, der Melkbecher oder Einstreumaterial) wurden jene Verdünnungsstufen mit Wachstum von 3 bis 300 KBE pro 100 µl Suspension ausgezählt.

6.3.3. Tankmilchzellzahl und -keimzahl

Es werden ca. alle 7 Tage von der Molkerei der Fett-, Eiweiß- und Laktose-Wert in Prozent, die Zellzahl und Keimzahl in Tsd./ml wie auch der Harnstoffwert in mg/100 ml erfasst und dem Betrieb zur Verfügung gestellt.

6.3.4. LKV-Daten

Die MLP (Milchleistungsprüfung) wird im Durchschnitt alle 30-40 Tage vom LKV OÖ (Landeskontrollverband Oberösterreich) durchgeführt. Beim AMS wird ein Milchsammelgerät für 24 Stunden an den Roboter angeschlossen, welches bei jeder Melkung eine Probe für die Messung der Zellzahl und der Milchinhaltsstoffe zieht.

6.3.5. Roboterdaten

Die automatisiert gesammelten Daten des AMS wurden von uns in die Interpretation der diversen Untersuchungen hineingenommen und ausgewertet. Für uns interessante Werte waren:

- Anzahl der Melkungen/Tier/Tag
- Milchmenge/Melkung/Tier
- Anzahl der unvollständigen Melkungen/Woche

6.4. Statistische Aufarbeitung

Aufgrund der Fragestellung und des Studiendesigns als Fallstudie wurden die erhobenen Daten vorrangig deskriptiv aufgearbeitet. Für die statistischen Analysen wurden die Software IBM SPSS Statistics 29.0 (IBM, Armonk, NY, USA) und Microsoft Excel 2022 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die erhobenen Daten wurden auf Normalverteilung geprüft (Kolmogorov-Smirnov Test, signifikant für $p > 0,2$). Nicht normal verteilte Daten wurden grafisch als Boxplots dargestellt. Die Keimzahlverläufe auf der Zitzenhaut und der Zitzenspitze wurden statistisch mittels einfaktorieller Varianzanalyse geprüft. Als post Hoc Test wurde der Bonferroni Test durchgeführt ($p < 0,05$). Die Keimzahlen (Gesamtkeimzahl, Coliforme, Staphylokokken, Enterokokken) der Tupferproben, der Zitzenhaut und der Zitzenspitzen wurden ebenfalls für den jeweiligen Untersuchungszeitpunkt zusammengefasst (Minimum, Maximum, Median) und in Form von Boxplots dargestellt. Als Boxplots werden auch die täglich vom Roboter erfassten Fehlversuche beim Ansetzen der Melkbecher, sowie die Entwicklung der Melkfrequenz pro Tier und Tag und der Milchleistungen pro Kuh und Melkung wöchentlich zusammengefasst.

7. Ergebnisse

7.1. Ergebnisse der Betriebserhebung

Der untersuchte Fleckvieh-Zuchtbetrieb im oberösterreichischen Alpenvorland ist Mitglied bei Leistungskontrollverband Oberösterreich und es werden standardmäßig zehn Milchleistungsprüfungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt des ersten Betriebsbesuches im Oktober 2021 wurden 32 laktierende Kühe, drei trockenstehende Kühe und zwölf trächtige Kalbinnen sowie Kälber im Betrieb gehalten, sodass die Gesamtherde 80 Tiere umfasste. Vor der Umstellung im Dezember 2021 wurden die Kühe in Anbindehaltung (Kurzstand) auf Gummimatten mit Sägespänen als Einstreu gehalten. Alle Laktierenden wurden mittels einer Rohrmelkanlage mit insgesamt zwei Melkzeugen gemolken und erhielten eine aufgewertete Grundfutterration (AGR) auf Basis von Grassilage. Die durchschnittliche Milchleistung lag bei 7.250 kg ECM.

Am Betrieb wurde die Eutergesundheit über Tankmilchdaten (Zellzahl) und über die Milchleistungsprüfung (Zellzahl) kontrolliert. Bei Kühen welche hier, oder klinisch auffällig wurden, wurde ein Schalmtest gemacht und Viertelgemelksproben aseptisch für eine bakteriologische Untersuchung (BU) entnommen. Weiters wurden regelmäßig Milchproben nach dem Abkalben und zum Trockenstellen im Labor des Tiergesundheitsdienstes (TGD) Oberösterreich in Ried bakteriologisch untersucht. Tiere mit positivem Erregernachweis beim Trockenstellen wurden in Absprache mit dem bestandsbetreuenden Tierarzt antibiotisch mit Cloxacillin bei Staphylokokken-Mastitiden (Orbenin[®], Zoetis, Wien, Österreich) bzw. mit Benethamathydrojodid, Benethamin-Penicillin und Framycetinsulfat (Benestemycin[®], Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim, Deutschland) bei Nachweis von Streptokokken trockengestellt. Zusätzlich erhielten alle Kühe (auch die mit negativem BU-Befund) einen intramammären Zitzenversiegler (Ubroseal blue Dry Cow[®], Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim, Deutschland). Generell erfolgte das Trockenstellen sieben Wochen vor dem errechneten Abkalbetermin und abrupt. Weil die Landwirte um die *S. aureus* Problematik im Betrieb wussten, wurde eine strikte Melkreihenfolge in der Weise eingehalten, dass die Tiere mit kontagiösen (kuhassozierten) Erregern zum Schluss gemolken wurden. Weiters wurden alle Kühe, welche mit *S. aureus* infiziert waren, nicht in den neuen Stall mitübersiedelt und unmittelbar vor dem Umzug aus dem Bestand ausgeschieden. Bei den Betriebsbesuchen vor der Umstellung wurden Melkhygiene und Melkarbeit sowie die allgemeine Tierhygiene beurteilt. Dabei wurden die Sauberkeit der Laktierenden wie auch Sauberkeit der Stand- und Liegeflächen, besonders im hinteren Drittel und im Euterbereich, als mangelhaft bewertet. Vor

dem Ansetzen des Melkzeugs wurden die Zitzen mit einem desinfizierenden Schaumpräparat und Einmalpapiertüchern unter optischer Kontrolle gereinigt und in einen Vormelkbecher vorgemolken. Anschließend wurden nach einer Anrüstzeit von ca. 30 bis 60 Sekunden die Melkbecher angesetzt. Nachgemolken wurde durch kurzes mechanisches Belasten des Melkzeuges, wobei auch mäßiges Blindmelken beobachtet wurde.

Mit dem Umzug in den neuen Stall wurden die Kühe in einem Liegeboxenlaufstall mit 73 Liegeboxen untergebracht. Diese wurden mit einer Kalk-Strohmatratze gefüllt und dann regelmäßig mit Separationsmaterial nachgestreut. Mit dem Umzug in den neuen Stall wurde auch auf ein Automatisches Melksystem umgestellt. Seither wird mit einem Melkroboter der Fa. DELAVAL (Einboxenanlage, VMS 310, DELAVAL, Tumba, Schweden) gemolken.

Die Einstreutiefe der Liegeboxen beträgt 22 cm. Für die erste Befüllung wurde ein Stroh-Kalk-Wasser-Gemisch verwendet. Anschließend wurde reines Gülleseparationsmaterial ohne weitere Nachbehandlung eingestreut. Das Separationsmaterial wird direkt am Betrieb mit einem kleinen 2,2 kW Pressschneckenseparator (PSS 2.2-400, Perwolf, Obdach, Österreich) produziert. Die Pressschneckenumdrehungen betragen 49/min und der Pressdruck schwankte zwischen 30 und 40 bar.

Die Untersuchungen zur Gesamtkeimbelastung und zur Konzentration potenzieller Mastitiserreger in der Einstreu werden in der Diplomarbeit von Anna Schuler (64) ausführlich beschrieben, sodass hier nur die Ergebnisse der Untersuchung frisch gepresster Einstreu zum besseren Verständnis wiedergegeben werden.

Im frischen Separationsmaterial wurde bei der ersten Untersuchung im April 2022 ein Trockensubstanzgehalt (TS) von 74,0% und ein pH-Wert von 8,51 gemessen, bei der Untersuchung im Juni 2022 wurden ein Trockensubstanzgehalt von 77,0% bei einem pH-Wert von 8,54 gemessen. Die Gesamtkeimzahl lag im April bei $8,84 \times 10^8$ KBE, im Juni bei $6,21 \times 10^8$ KBE pro Gramm Trockensubstanz. Das frisch gepresste Material wurde regelmäßig und ohne Zwischenlagerung unmittelbar in die Liegeboxen eingebracht. Die Liegeboxen werden zweimal täglich händisch gepflegt und mit einem Hoflader nach Bedarf nachgestreut. Der planbefestigte Betonboden wird mehrmals täglich mit einem automatischen Entmistungssystem abgeschoben.

7.2. Untersuchungsergebnisse Eutergesundheit

7.2.1. Bakteriologische Untersuchung Viertelgemelksproben

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen der Viertelgemelksproben aller Kühe vor (zwei Untersuchungen), während (eine Untersuchung) und nach der Umstellungsphase (zwei Untersuchungen) sind in Tabelle 2 wiedergegeben und in den Abbildungen 2 und 3 grafisch dargestellt. Man sieht, dass nach der Umstellung und dem Ausscheiden der *S. aureus* positiven Kühe, keine Infektionen durch *S. aureus* mehr auftraten und der prozentuelle Anteil negativ getesteter Kühe ansteigt.

Tab.1 : Ergebnisse der bakteriologisch untersuchten Viertelgemelksproben (BU-Ergebnis) vor der Umstellung (November und Dezember 2021), in der Umstellungsphase (Jänner 2022) und nach der Umstellung (April und Juni 2022).

BU-Ergebnis		Datum der Untersuchung				
		05-NOV-21	09-DEC-21	13-JAN-22	06-APR-22	24-JUN-22
negativ	Anzahl	25	24	21	22	22
	%	75,8 %	75,0 %	77,8 %	73,3 %	81,5 %
<i>S. aureus</i>	Anzahl	3	5	0	0	0
	%	9,1 %	15,6 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
NAS*	Anzahl	2	1	0	5	3
	%	6,1 %	3,1 %	0,0 %	16,7 %	11,1 %
Streptokokken	Anzahl	1	1	5	0	1
	%	3,0 %	3,1 %	18,5 %	0,0 %	3,7 %
Coliforme	Anzahl	1	0	0	2	0
	%	3,0 %	0,0 %	0,0%	6,7 %	0,0 %
Enterokokken	Anzahl	1	1	1	1	1
	%	3,0 %	3,1 %	3,7 %	3,3 %	3,7 %
gesamt	Anzahl	33	32	27	30	27
	%	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

*Nicht Aureus Staphylokokken

In Abbildung 2 werden die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung der Viertelgemelksproben dargestellt. Im Säulendiagramm werden in der ersten Säule die Betriebsbesuche vor der Umstellung zusammengefasst, in der zweiten Säule sieht man den Betriebsbesuch während der Umstellungsphase und in der dritten Säule werden die letzten zwei Beprobungen dargestellt, welche nach der Umstellungsphase waren. Es fällt auf, dass sich das Erregerspektrum nach der Umstellung Richtung Nicht Aureus Staphylokokken (NAS), Streptokokken und Coliforme verändert hat, auch wenn die Anzahl der jeweils positiven Tiere

niedrig ist. Dies zeigen auch die Tortendiagramme in Abbildung 3, die die Ergebnisse jeder einzelnen Bestandsuntersuchung darstellen.

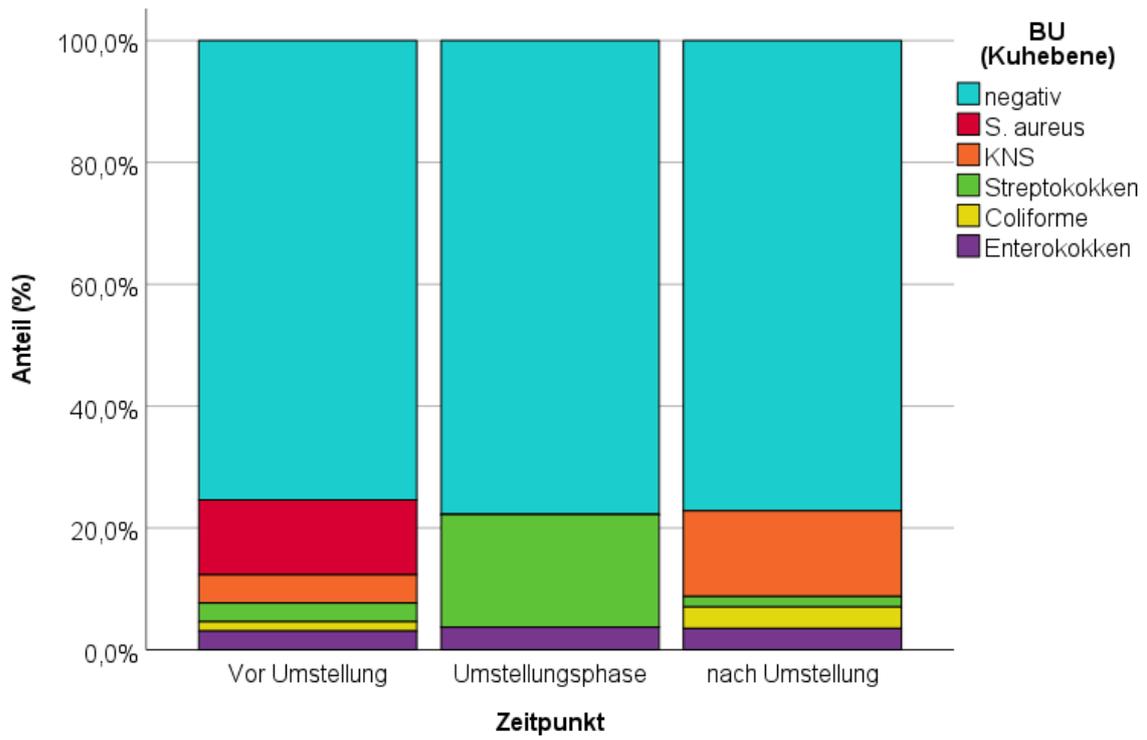


Abb. 2: Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung (BU) von Viertelgemelksproben vor, während und nach der Umstellung. Dargestellt ist die prozentuelle Verteilung von BU-negativen Kühen und den nachgewiesenen Mastitis-Pathogenen.

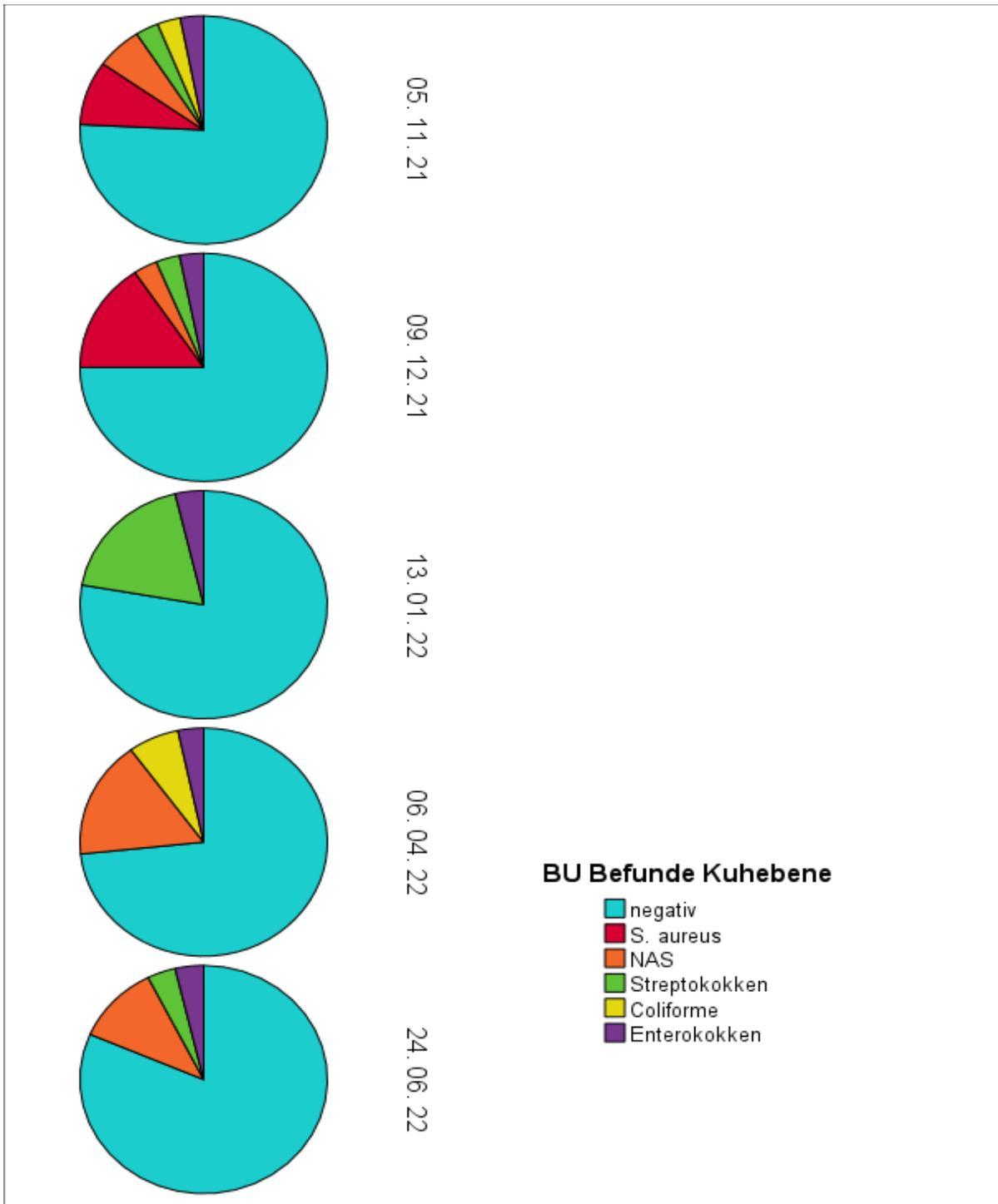


Abb. 3: Prozentuelle Verteilung von BU-negativen und BU-positiven Viertelgemelksproben inklusive der nachgewiesenen Mastitispathogene an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten.

7.2.2. Bakteriologische Untersuchung der Tupferproben der Zitzenhaut und Zitzenspitze

Die Ergebnisse der Zitzenhauttupfer werden in koloniebildenden Einheiten (KBE) pro cm² Zitzenhaut angegeben und es wurden die Gesamtkeimzahl, die Keimzahl der Coliformen, der Staphylokokken und Äskulinpositiven Kokken (inkl. Enterokokken) ausgewertet. Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der Zitzenhauttupferproben an den 3 Untersuchungszeitpunkten zusammen. In Tabelle 4 sind die Gesamtkeimzahl und die Keimzahlen der Coliformen, Staphylokokken und Enterokokken bzw. Äskulinpositiven Kokken der Tupfer der Strichkanalmündung (Zitzenspitze) aufgelistet. Da die Prüfung auf Normalverteilung ergab, dass die Keimzahlen nicht normalverteilt waren, wurden die Daten logarithmiert (dekadischer Logarithmus), wodurch eine Normalverteilung erreicht wurde. In den Abbildungen 4 bis 7 wurde daher der dekadische Logarithmus für die Darstellung der Keimzahl verwendet.

Tab. 2: Auflistung der Keimzahlen (Gesamtkeimzahl, GKZ), der Anzahl der Coliformen (auf MAC Agar), der Staphylokokken (BPA) und der Enterokokken (BAA), bzw. Äskulinpositiven Kokken, KAA) pro cm² Zitzenhaut.

Datum			KBE/cm ² GKZ	KBE/cm ² McConkey	KBE/cm ² BP	KBE/cm ² KAA	KBE/cm ² BAA
12.01.2022	N	Proben	10	8	9	8	8
		Fehlend	0	2	1	2	2
	Median		48550	14	26000	38	280
	Minimum		520	6	3010	12	67
	Maximum		266000	182	59600	740	540
06.04.2022	N	Proben	10	8	10	3	0
		Fehlend	0	2	0	7	10
	Median		29850	27	9300	100	
	Minimum		5166	8	1400	60	
	Maximum		238000	179	178000	140	
23.06.2022	N	Proben	8	7	9	8	7
		Fehlend	2	3	1	2	3
	Median		65050	180	34000	750	100
	Minimum		8400	14	1200	32	60
	Maximum		178000	420	196000	3600	3200

*aufgrund der niedrigen Probenzahl wurden keine Mittelwerte berechnet

Tab. 3: Auflistung der Gesamtkeimzahl (GKZ), sowie der Keimzahlen auf McConkey Agar, auf Baird Parker Agar, auf BAA und KAA in den Tupferproben der Zitzenspitze.

Datum			GKZ	KBE McConkey	KBE BP	KBE KAA	KBE BAA
12.01.2022	N	Proben	10	7	7	8	6
		Fehlend	0	3	3	2	4
	Median		1220000	180	218000	465	3000
	Minimum		7000	120	28000	160	1200
	Maximum		4540000	900	564000	8800	4800
06.04.2022	N	Proben	10	7	10	2	2
		Fehlend	0	3	0	8	8
	Median		565000	720	66500	n.d*	n.d.
	Minimum		54800	80	21500	600	600
	Maximum		2820000	13200	1220000	5700	4700
23.06.2022	N	Proben	8	7	8	9	8
		Fehlend	2	3	2	1	2
	Median		96000	282	30450	320	122
	Minimum		2400	10	1200	60	12
	Maximum		508000	620	182000	1200	1800

*aufgrund der niedrigen Probenzahl konnten keine Mittelwerte berechnet werden

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Messwerte logarithmiert (dekadischer Logarithmus), wodurch eine Normalverteilung erreicht wurde ($p > 0,2$). Die Mittelwertvergleiche mittels ANOVA ergaben für die Gesamtkeimzahlen auf der Zitzenhaut zwar keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf, allerdings kam es zu einem signifikanten Anstieg der Coliformen ($p < 0,05$), mittels Bonferroni Test konnte gezeigt werden, dass lediglich der Anstieg zwischen Jänner und Juni signifikant war ($p = 0,018$).

Abbildung 4 zeigt den Verlauf der Coliformen für die 3 Untersuchungszeitpunkte.

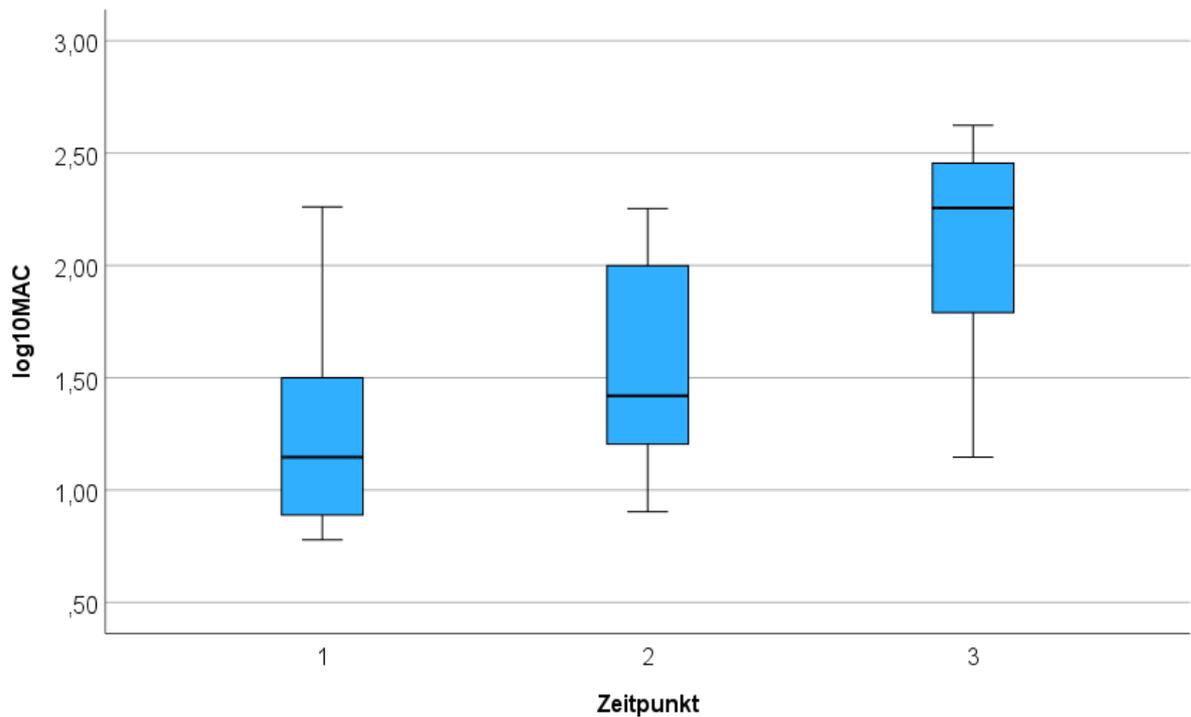


Abb. 4: Verlauf der Coliformen Keime pro cm^2 Zitzenhaut an den drei Untersuchungszeitpunkten in der Umstellungsphase (Jänner) bzw. nach der Umstellung auf Feststoffeinstreu. Die Keimzahlen auf dem MacConkey Agar sind im dekadischen Logarithmus angegeben ($\log_{10}\text{MAC}$).

Auch im Verlauf der Äskulinpositiven Streptokokken auf KAA-Agar konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,01$). Die weitere Bewertung mittels Bonferroni Test zeigte auch hier, dass die Signifikanz durch den Anstieg von Jänner auf Juni 2022 bedingt war ($p = 0,004$), während die Unterschiede zwischen Jänner und April und zwischen April und Juni nicht signifikant waren ($p < 0,05$). In Abbildung 5 ist der Verlauf grafisch dargestellt.

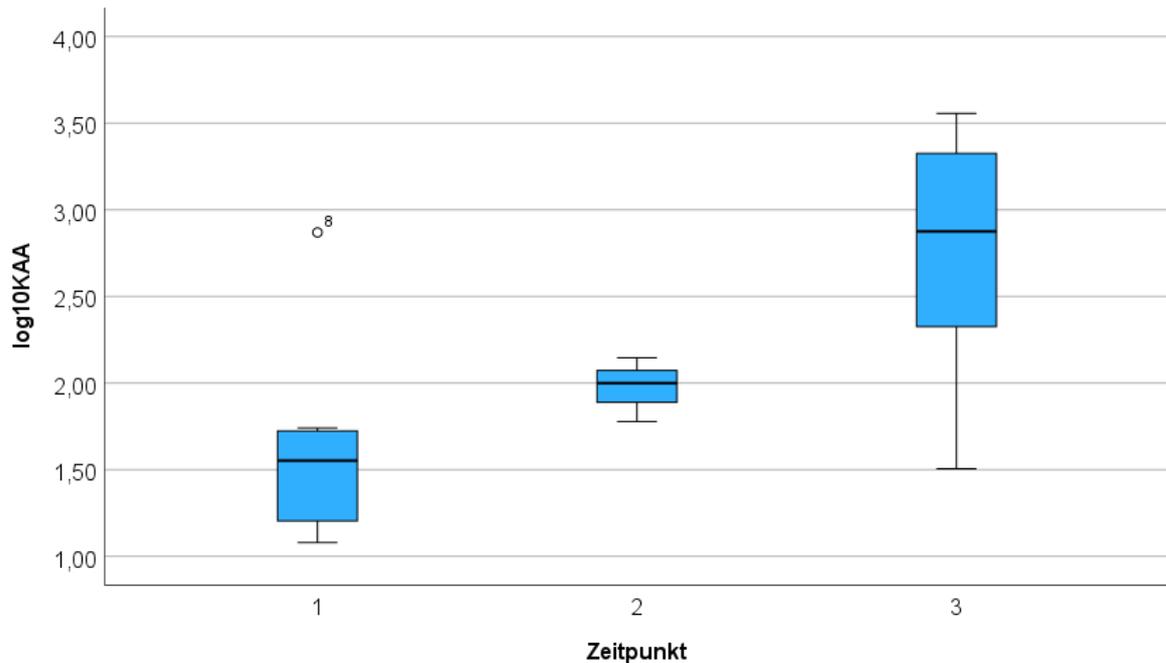


Abb. 5: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Tupferproben der Zitzenhaut (KBE/cm^2) nach Ausstrich auf KKA-Agar mit signifikanten Unterschieden zwischen Zeitpunkt 1 und 3. (Zeitpunkt 1: Jänner, Zeitpunkt 2: April, Zeitpunkt 3: Juni). Die Keimzahlen auf dem KAA-Agar sind im dekadischen Logarithmus angegeben ($\log_{10}\text{KAA}$).

Bei der statistischen Auswertung der Keimzahlen der Tupferproben der Strichkanalmündung (Zitzen spitze) ergaben sich signifikante Unterschiede in Bezug auf den Verlauf der Gesamtkeimzahl ($p = 0,01$) und der Enterokokken ($p = 0,001$). Die Unterschiede im Verlauf der Staphylokokken waren mit $p = 0,05$ gerade nicht mehr signifikant. Die statistische Prüfung mittels Bonferroni Test ergab für die Gesamtkeimzahl signifikante Unterschiede sowohl zwischen der Umstellungsphase und dem Zeitpunkt im Juni ($p = 0,013$) als auch zwischen April und Juni ($p = 0,042$).

Auf BAA und KAA Agar waren im April lediglich Zitzen spitzentupferproben von 2 Tieren auswertbar, daher wurde auf eine grafische Darstellung verzichtet.

Der Verlauf der Gesamtkeimzahl an der Strichkanalmündung ist in Abbildung 6 dargestellt.

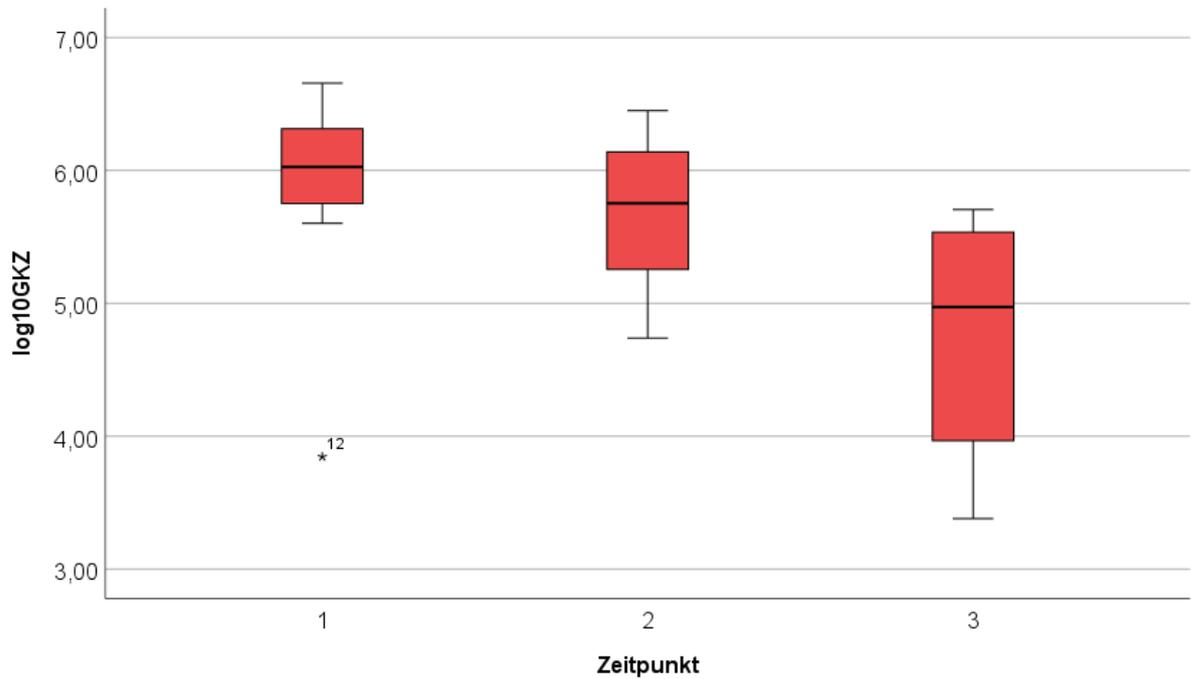


Abb. 6: Verlauf der Gesamtkeimzahl GKZ auf der Zitzenspitze an den drei Untersuchungszeitpunkten in der Umstellungsphase (Zeitpunkt 1, Jänner) bzw. nach der Umstellung auf Feststoffeinstreu im April (2) bzw. im Juni (3). Dargestellt ist wiederum der dekadische Logarithmus der Gesamtkeimzahl ($\log_{10}GKZ$).

7.2.3. Bakteriologischer Untersuchung von Tupferproben der Melkbecher (Zitzengummi)

In Tabelle 4 ist die Gesamtkeimzahl der Tupferproben der Melkbecher vor und nach der Desinfektion mit Peressigsäure aufgelistet. Dabei wurden jeweils nur jene 2 Melkbecher beprobt, die an den Zitzen rechts hinten und links vorne angesetzt wurden. Daher stellen die angegebenen KBE jeweils die Summe der Keimzahlen beider Melkbecher dar. Für die Berechnung der Reduktion wurde die Keimzahl vor der Desinfektion als 100% angenommen und anschließend die prozentuelle Keimreduktion berechnet.

Tab. 4: Ergebnisse der GKZ der Melkbecher vor und nach der Melkbecherdesinfektion mit Peressigsäure (Des. PES).

Probe		Agar	Verdünnung	KBE/100 µl	KBE/2 ml	Mittelwert KBE/2 ml	Reduktion (%)
1	Vor Des. PES	COL	1 zu 10	55	11000		
	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	8	16000	13500	
1	Nach Des. PES	COL	UV	85	1700	1700	87,4
2	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	47	94000	94000	
2	Nach Des. PS	COL	UV	18	360	360	99,6
3	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	50	100000	100000	
3	Nach Des. PS	COL	UV	38	760	760	99,24
4	Vor Des. PS	COL	1 zu 10	17	3400	3400	
4	Nach Des. PS	COL	UV	22	440	440	87,05
5	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	66	132000	132000	
5	Nach Des. PS	COL	UV	142	2840	2840	97,84
6	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	121	242000	242000	
6	Nach Des. PS	COL	UV	106	2120	2120	99,12
7	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	8	16000	16000	
7	Nach Des. PS	COL	UV	28	560	560	96,5
8	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	257	514000	514000	
8	Nach Des. PS	COL	UV	214	4280	4280	99,17
9	Vor Des. PS	COL	UV	44	880		
9	Vor Des. PS	COL	1 zu 10	20	4000		
9	Vor Des. PS	COL	1 zu 100	4	8000	4293	
9	Nach Des. PS	COL	UV	7	140	140	96,7

7.2.4. Auswertung der LKV-Daten

Die ermittelnden Zellzahlen, der monatlich durch den Leistungskontrollverband durchgeführten Probemelkungen, werden in Abbildung 7 in logarithmierter Form in einem Boxplotdiagramm dargestellt. Hier sieht man keine Zellzahlerhöhungen in der Umstellungsphase.

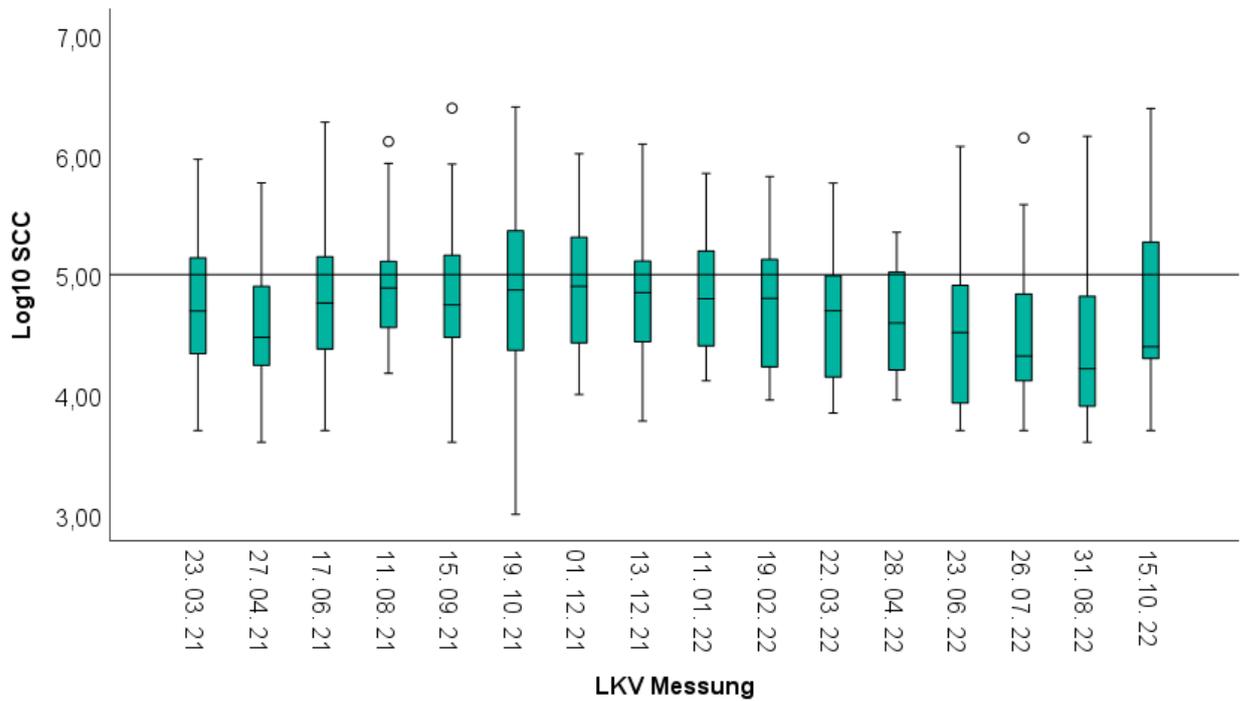
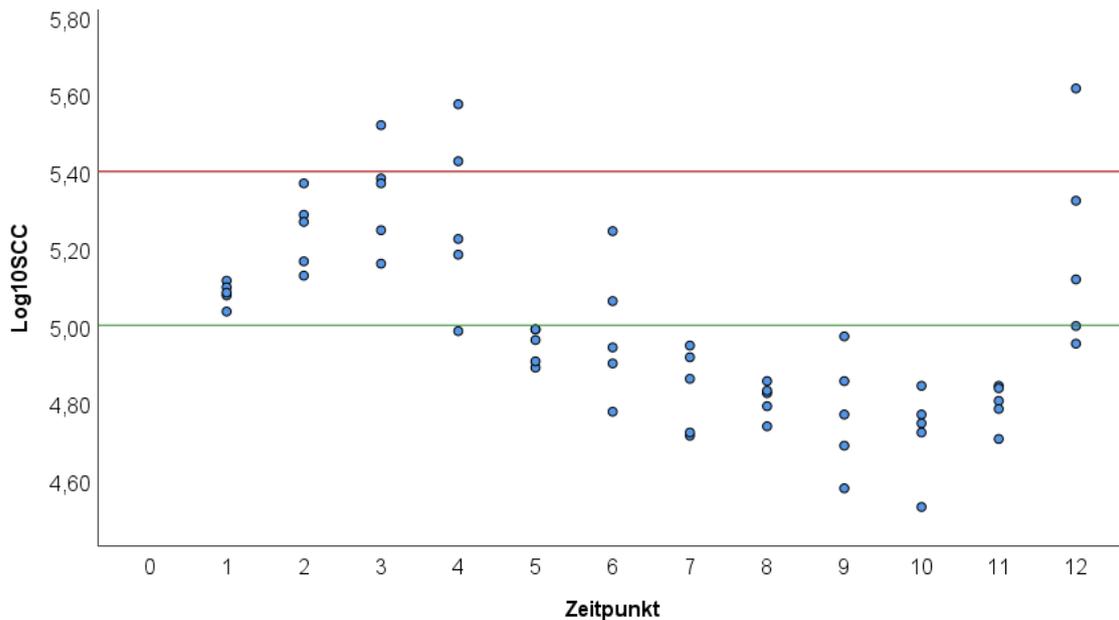


Abb. 7: Boxplotdarstellung des Zellzahlverlaufes vor der Umstellung (bis Messung am 01. 12. 2021), in der Umstellungsphase (13. 12. 2021 und 11. 01. 2022) und nach der Umstellung bis Oktober 2022. Alle Zellzahlmesswerte sind logarithmiert. Ein Log10 von 5,0 entspricht einer Zellzahl von 100.000 Zellen/ml.

7.2.5. Verlauf der Tankmilchzellzahlen

Das in Abbildung 8 angeführte Punktdiagramm stellt den Verlauf der Tankmilchzellzahl dar. Die Punkte stellen die 5 Messungen der Tankmilchzellzahl (als dekadischer Logarithmus) im jeweiligen Monat dar: Die Tankmilchzellzahlen bleiben bis in den Herbst 2022 unter 100.000 Zellen pro Milliliter.

Erst im September 2022 (3 Monate nach Ende der Studienperiode) kommt es durch das Auftreten mehrerer klinischer Mastitiden durch Coliforme zu einem deutlichen Anstieg.



1: Oktober 2021, 2: November, 3: Dezember, 4: Jänner 2022, 5: Februar, 6: März, 7: April, 8: Mai, 9: Juni, 10: Juli, 11: August, 12: September 2022

Abb. 8: Punktdiagramm zum Verlauf der Tankmilchzellzahlen von Oktober 2021 bis September 2022. An jedem Untersuchungszeitpunkt sind die 5 Messungen der Tankmilchzellzahl im jeweiligen Monat logarithmiert dargestellt. Die grüne Linie schneidet die Y-Achse bei einem Zellzahlwert von 100.000 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus), die rote Linie bei einem Zellzahlwert von 250.000 Zellen/ml was der S-Klasse entspricht.

7.2.6. Auswertung der Melkroboterdaten

Die unten aufgeführten Ergebnisse wurden vom AMS automatisch aufgezeichnet. Im Beobachtungszeitraum wurden täglich zwischen 22 und 31 Kühe gemolken. Die durchschnittliche Melkfrequenz pro Tier und Tag lag bei 2,5 Melkungen mit einem leichten, aber konstantem Anstieg über den gesamten Versuchszeitraum bis zum September 2022. In Abbildung 9 ist die Anzahl der durchschnittlichen Melkungen pro Tier und Tag grafisch in Form eines Boxplotdiagrammes dargestellt. Eine Box fasst die Melkfrequenzen pro Tier und Tag in einer Woche zusammen.

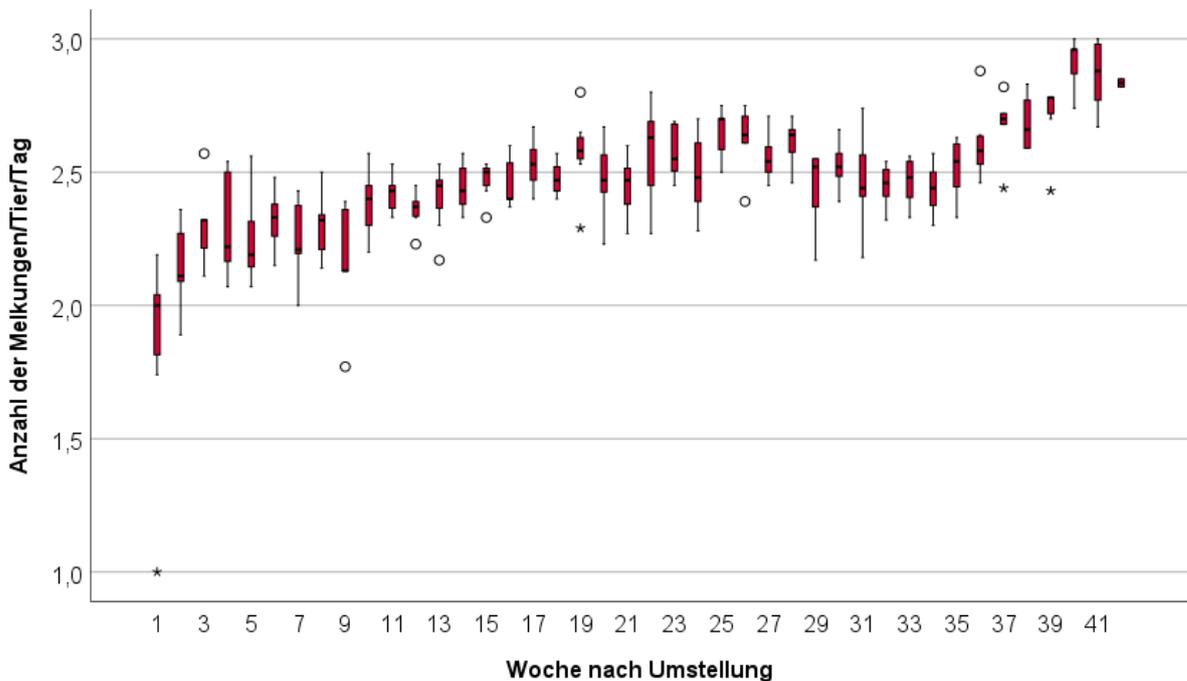


Abb. 9: Entwicklung der Melkfrequenz pro Tier und Tag.

In Abbildung 10 werden die unvollständigen Melkungen pro Woche als Boxplot zusammengefasst. Eine Melkung wird als unvollständig betrachtet, wenn die ermolkenen Milchmenge eines Euterviertels weniger als 50% der erwarteten Milchmenge dieses Viertels beträgt, sie wird jedoch niemals als unvollständig betrachtet, wenn die erwartete Milchmenge weniger als 1 kg und/oder die Milchmenge mehr als 3 kg beträgt.

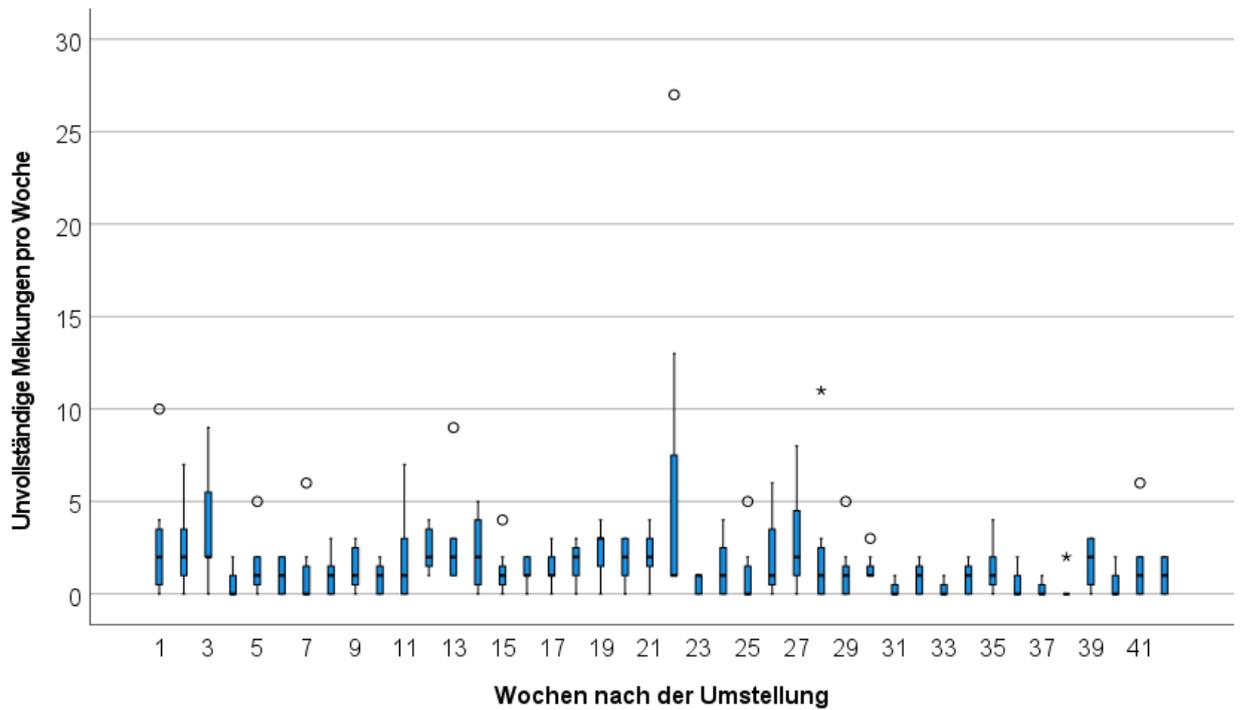


Abb. 10: Boxplotdarstellung der unvollständigen Melkungen pro Woche.

8. Diskussion

Die Aufstallung und Haltung und hier besonders die Einstreu können das Auftreten von Eutergesundheitsstörungen in der Milchviehhaltung wesentlich beeinflussen. Es war daher ein Ziel dieses Projektes, darzustellen, wie sich Gülleseparat als Einstreumaterial auf die Eutergesundheit in einem Milchviehbetrieb auswirkt. Da Mastitiden multifaktorielle Erkrankungen sind, darf der Einfluss des Gülleseparates nicht als isolierter Faktor betrachtet werden. Im untersuchten Betrieb änderte sich nicht nur die Aufstallungsform durch den Umzug von einem alten Stall mit Anbindehaltung und Kurzstand in einen Liegeboxenlaufstall mit Stroh-Kalkmatratzen und Einstreu von separierten Güllefeststoffen, sondern gleichzeitig wurde auch ein AMS implementiert, was eine zusätzliche Herausforderung darstellte.

8.1 Umstellung von konventioneller Melkung auf ein AMS - Einfluss auf die Eutergesundheit

Als eine wichtige Maßnahme wurden entsprechend den Empfehlungen (7) zytobakteriologische Untersuchungen von Viertelgemelksproben aller Kühe durchgeführt und die *S. aureus* positiven Tiere ausgeschieden. Dies ist eine wichtige Maßnahme, da im Roboter jeweils die gesamte Herde mit einem Melkzeug gemolken wird und daher ein höheres Übertragungsrisiko als bei der konventionellen Melkung besteht. Untersuchungen haben zwar ergeben, dass bereits das regelmäßige und konsequente Spülen der Melkbecher mit Wasser zu einer deutlichen Keimreduktion führt (65), jedoch ein Restrisiko für Infektionen bestehen bleibt. Die Melkzeugzwischeninfektion ist eine sehr wirksame Maßnahme, um das Risiko einer Erregerverschleppung über die Melkmaschine niedrig zu halten. In unserer Studie zeigte sich eine Keimreduktion in den Melkbechern von 87 bis 99%, was auch Ergebnissen anderer Studien (66) entspricht. In der Arbeit von (67) wurden 46 Kühe experimentell mit *S. agalactiae* kontaminierten Zitzenbechern gemolken, wobei es zu keinen Infektionen kam. In einer weiteren Arbeit konnten nach der Melkung von *S. aureus* infizierten Kühen und Zwischeninfektion im automatischen Melksystem, Erreger gleich oft nachgewiesen werden wie bei konventioneller Melkung ohne Zwischeninfektion (54). In unserer Studie wurde mittels Tupferproben der Melkbecher gezeigt, dass die Melkzeugzwischeninfektion zu einer signifikanten Keimreduktion führt, die das Risiko für Infektionen wirksam minimiert. Unvollständige Melkungen, vorübergehende Defizite der Melktechnik (z.B. vorübergehender Ausfall der Zitzendesinfektion bzw. Melkzeugzwischeninfektion) oder Kühe mit klinischen

Mastitiden, die hohe Keimzahlen an kontagiösen Erregern ausscheiden und Infektionen mit besonders virulenten Stämmen, können dazu führen, dass sich kontagiöse Mastitiserreger über die Melkung in der Herde etablieren und zu Bestandsproblemen führen.

Anhand der Einzeltierzellzahlen aus der Milchleistungsprüfung ist erkennbar, dass die Zellzahlen unmittelbar nach dem Umzug zwar anstiegen, in den Folgemonaten jedoch wieder auf das physiologische Niveau absanken. Deutlicher als in den Einzeltierzellzahlen zeigt sich der Anstieg im Jänner in der Tankmilchzellzahl, wo ein Zellzahlwert von über 300.000 pro Milliliter gemessen wurde. Zellzahlerhöhungen in der Umstellungsphase auf ein AMS werden auch von vielen anderen Autoren dahingehend beschrieben (68–71), dass sich die Eutergesundheit und Milchleistung in Betrieben nach Übersiedelung von Anbindehaltung in Laufstallhaltung mit AMS verschlechterte und Zellzahlen über ein Jahr konstant hoch blieben. Auffällig ist, dass im Herbst 2022 und drei Monate nach Beendigung der Studie, im Versuchsbetrieb mehrere klinischen Mastitiden durch Coliforme auftraten, die auch zu einem vorübergehenden Anstieg der Tankmilchzellzahl führten. Im Versuchszeitraum selbst waren keine klinischen Euterezündungen aufgetreten. Auch wichtige Kennzahlen für die Melkung mit AMS, wie die Melkfrequenz pro Tier und Tag, die pro Melkung ermolkene Milchmenge und die Anzahl der unvollständigen Melkungen, lagen im Versuchszeitraum im Normbereich und es zeigte sich, dass die Kühe, obwohl aus Anbindehaltung kommend, schnell mit der Melkung im Roboter vertraut waren. Studien (72) beschreiben gerade für Roboterbetriebe mit freiem Tierverkehr einen besonders guten Status an Kuhkomfort, da Kühe sich frei zwischen Liege-, Fress- und Melkbereich bewegen können. Unsere Untersuchungen belegen, dass von Seiten des Melkroboter kein höheres Risiko für die Eutergesundheit bestand, sondern dass sich die konstanten Verhältnisse in Bezug auf die Melkung positiv auf die Eutergesundheit ausgewirkt haben. Damit konnte die zweite Hypothese dieser Arbeit, wonach die Umstellung auf ein AMS zwar zu einem kurzzeitigen Anstieg der Zellzahl führen kann, sich grundsätzlich jedoch positiv auf die Eutergesundheit auswirkt, belegt werden. Voraussetzung ist, dass der Roboter regelmäßig gewartet wird, technisch einwandfrei funktioniert und dass rasch auf Störungen reagiert wird (54).

8.2. Einfluss der Einstreu von Gülleseparat auf die Belastung der Zitzenhaut mit potenziell euterpathogenen Keimen

Die Einstreu muss vor allem zwei Kriterien erfüllen: Sie muss einen hohen Tierkomfort gewährleisten und gleichzeitig auch hygienisch so beschaffen sein, dass die Tiergesundheit nicht gefährdet wird. In vielen Ländern mit intensiver Tierhaltung werden Güllefeststoffe bereits seit vielen Jahren in der Milchviehhaltung eingesetzt, während in Österreich kaum Studien dazu vorliegen. In einer Studie von (61), wurde der Keimgehalt verschiedener Einstreumaterialien untersucht und ähnlich wie in unserer Studie die Belastung der Zitzenhaut mit Streptokokken und anderen grampositiven und Katalase-negativen Kokken (Streptococci-Like Organisms, SLO wie Enterokokken, Laktokokken etc.) gemessen. Da sich die beprobten Flächen der Zitzenhaut und die Anzahl der beprobten Zitzen pro Kuh in den Studien unterscheiden, sind direkte Vergleiche schwierig. Während jedoch auf Sandeinstreu bzw. bei Einstreu von recyceltem Sand keine Coliformen auf der Zitzenhaut nachgewiesen wurden, wurden auch in der Studie von (61) bei Einstreu von Gülleseparat im Durchschnitt 245 KBE Coliforme pro Tupferprobe nachgewiesen. In unseren Untersuchungen waren es im Mittel zwischen 14 und 180 KBE pro cm² Zitzenhaut bzw. 140 bis 1.800 KBE in den zwei Tupferpaaren der beprobten Zitzen rechts hinten und links vorne.

Ähnlichkeiten mit der zitierten Studie ergeben sich auch in Bezug auf die Anzahl der Streptokokken und SLO: In unseren Untersuchungen lag die Anzahl der Streptokokken und SLO im Mittel (Median) zwischen 380 und 7.500 KBE/cm² in den zwei Tupferpaaren eines Rindes, während in oben genannter Studie im Durchschnitt 153 KBE pro Zitzenhauttupfer nachgewiesen wurde. Interessanterweise wurden bei Aufstallung auf Sand bzw. auf Gummimatten mit einer dünnen Streuschicht an Güllefeststoffen weder Coliforme noch SLO an der Zitzenhaut nachgewiesen. Bei der Bewertung der SLO muss berücksichtigt werden, dass jene beiden Nährböden die wir verwendet haben (BAA und KAA), nicht alle Streptokokken nachweisen, sondern vorrangig als Spezialnährböden für Enterokokken verwendet werden. Die Differenzierung zufällig ausgewählter Kolonien der Spezialnährböden der Zitzenhaut und der Einstreuproben ist in der Diplomarbeit von Anna Schuler (64) ausgeführt. Es konnten dabei sowohl auf der Zitzenhaut als auch in der Einstreu mit *E. coli*, *Kl. pneumoniae* bzw. *Kl. oxytoca* und *Raultella* spp. sowie mit den SLO *Aerococcus viridans* und verschiedenen Enterokokkenspezies wichtige Mastitiserreger nachgewiesen werden. Daher muss das Einstreumaterial in den Liegeboxen als ein besonders sensibler Kontrollpunkt behandelt werden.

(73) verglichen 26 Betriebe mit Einstreu von Gülleseparat mit 60 Betrieben mit Stroheinstreu. In Betrieben mit Güllefeststoffen wurden in Zusammenhang mit klinischen Mastitiden *Sc. uberis* (16,0 %), *E. coli* (13,8 %), *K. pneumoniae* (13,2 %), *Sc. dysgalactiae* (6,2 %) und *S. aureus* (3,4 %) nachgewiesen. Während in den Vergleichsbetrieben mit Stroheinstreu *S. aureus* (16,6 %) vor *Sc. uberis* (11%) dominierten und *E. coli* (9,1 %), *Sc. dysgalactiae* (8 %) und vor allem *K. pneumoniae* mit 1,1 %, deutlich seltener detektiert wurden. In der Folge traten in Betrieben mit Gülleseparat auch klinische Mastitiden durch *K. pneumoniae* signifikant (7-fach) häufiger auf als in Betrieben mit Stroheinstreu, obwohl die Inzidenz aller klinischen Mastitiden in beiden Betriebsformen annähernd gleich groß war.

(58) untersuchten in welchem Einstreumaterial ausgewählte Bakterien die besten Vermehrungsbedingungen vorfinden und beimpften vorher sterilisierte Einstreuproben (Sand, recycelten Sand, recycelte Güllefeststoffe und Sägespäne) mit *K. pneumoniae* und *Ec. faecium*. Recycelte Güllefeststoffe förderten das Wachstum von *K. pneumoniae* am stärksten, gefolgt von recyceltem Sand und Holzspänen, während das Wachstum von *Ec. faecium* in allen 4 Einstreumaterialien generell wenig gefördert wurde. Die Autoren vermuten, dass das Wachstum von *K. pneumoniae* durch den alkalischen pH-Wert und den hohen Kohlenstoffgehalt in Güllefeststoffen bedingt ist.

Bei den bakteriologisch untersuchten Viertelgemelksproben zeigt sich, dass sich das Haupterregerspektrum von kuhassoziierten Erregern in der Anbindehaltung mit konventioneller Melkung, hin zu umweltassoziierten Erregern verschob. Diese Änderung ist maßgeblich damit zu begründen, dass der Erregerdruck des Leitkeims im Altgebäude (*S. aureus*) durch das Ausscheiden aller infizierten Tiere vor dem Umzug in den neuen Stall, massiv gesenkt wurde. Weiters muss beachtet werden, dass der Hauptübertragungsweg dieser Erreger von Kuh zu Kuh beim Melkvorgang durch den kontinuierlich und standardisiert durchgeführten Melkvorgang des Melkroboters unterbunden wird. Hier ist vor allem der Arbeitsschritt der Spülung der Melkbecher mit Wasser und anschließender Zwischendesinfektion mit Peressigsäure zu nennen. Hier konnten Keimreduktionen von 87,05% bis 99,6% erreicht werden. Bei den bakteriologischen Tupferproben der Zitzenhaut und Zitzenspitze konnten teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Probennahmen festgestellt werden. Bei den Zitzenhauttupfern konnten diese Unterschiede vor allem zwischen der ersten und der dritten Probennahme für Coliforme und Streptokokken festgestellt werden. Bei den Proben der Zitzenspitze konnten Unterschiede in Bezug auf Gesamtkeimzahl und Enterokokken zwischen der ersten und dritten Probennahme sowie zwischen zweiter und

dritter Probennahme dargestellt werden. Allerdings müssen diese Daten sehr vorsichtig interpretiert werden, da die Anzahl der Beprobungen gering ist und in Betrieben mit automatischen Melksystemen zudem die Zwischenmelkzeiten der Kühe schwanken. Dies kann zur Folge haben, dass Zitzenhauttupfer nur eingeschränkt aussagekräftig sind, da die Abstände zur letzten Reinigung und damit auch zur letzten Zitzendesinfektion im Melkroboter variieren. Die Zitzen wurden nach jeder Melkung im Sprühverfahren mit einem jodhaltigen Zitzendesinfektionsmittel desinfiziert. Besonders auffallend ist die deutlich höhere Keimzahl an der Strichkanalmündung (Zitzenspitze) im Vergleich zur den Keimgehalten auf der Zitzenhaut.

8.3. Wichtige Kontrollpunkte für die Sicherstellung der Eutergesundheit

Das Liegeboxenmanagement hat damit einen besonders wichtigen Einfluss auf den Liegekomfort und die Hygiene der Tiere. Bei der Erstbefüllung wurde mit einer Stroh-Kalk-Wasser-Mischung begonnen und komplett befüllt. Beim regelmäßigen Nachstreuen wurde darauf geachtet, dass eine Schichtdicke von zehn Zentimetern Separationsmaterial nicht überschritten wird. Auch in der Literatur wird dies so empfohlen (74).

Ein weiterer Kontrollpunkt ist der Trockensubstanzgehalt des Gülleseparates, der mindestens 34% betragen sollte. In unseren Untersuchungen lag der Trockensubstanzgehalt von frisch gepresstem Material über 70%. Auch sollte frisch gepresstes Separatormaterial nicht gelagert, sondern innerhalb von 12 Stunden eingestreut werden.

Abgesehen vom Nachstreuen, ist die tägliche Pflege ein wichtiger Punkt beim Management der Boxen. Um die Liegeflächen trocken und möglichst hygienisch zu halten, ist es wichtig, frischen Kot und Harn aus den Boxen regelmäßig zu entfernen. Geschieht dies nicht, oder wird dies vernachlässigt, kann die Einstreu keine weitere Feuchtigkeit mehr aufnehmen, was die Stabilität der Matratze und folglich auch die Hygiene der Tiere gefährdet. Außerdem ist darauf zu achten, dass die Liegeboxenbügel, unter Beachtung der gesetzlichen Vorgaben, passend auf die im Stall befindlichen Tiere eingestellt sind.

Ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt ist, ob das AMS ordnungsgemäß arbeitet. Um dies zu kontrollieren, sollte man sich nach der meist 2-mal täglich durchzuführenden groben Reinigung (Reinigung der Standfläche und sämtlicher Oberflächen), den Melkvorgang bei einzelnen Tieren ansehen, um Mängel bei der Reinigung der Zitzen, beim Ansetzen oder beim Dippen der Zitzen sowie der anschließenden Melkzeugzwischeninfektion rasch zu erkennen und

zu beseitigen. Zu diesen täglichen Kontrollarbeiten gehört auch die Kontrolle der Füllstände der Verbrauchsmittel des Roboters. Genauso gehört aber auch kontrolliert, ob diese Verbrauchsmittel in der richtigen Konzentration verwendet werden; zum Beispiel die Konzentration der Peressigsäure bei der Zwischendesinfektion an den Melkbechern. Dies kann mit Teststreifen kontrolliert werden. Hinsichtlich der wiederkehrenden Wartung sollten die Vorgaben des Herstellers eingehalten werden. Auch (54) weisen in ihrer Arbeit auf die Bedeutung einer einwandfrei funktionierenden Maschine hin.

9. Schlussfolgerung

Ziel dieser Diplomarbeit war es zu dokumentieren, wie sich die Einstreu von Güllefeststoffen in den Liegeboxen eines Milchviehbetriebes auf die Eutergesundheit auswirkte. Es zeigte sich, dass es durch die Einstreu zu einer Besiedelung der Zitzenhaut mit potenziell euterpathogenen Keimen kommt und dass ein konstant gutes Hygienemanagement notwendig ist, um das Risiko umweltassoziierter Mastitiden niedrig zu halten. Ein einwandfrei funktionierender Melkroboter kann sich positiv auf die Eutergesundheit auswirken, da durch standardisierte Reinigung und Desinfektion die Keimbelastung der Zitzenhaut gesenkt werden kann. Jedoch muss an dieser Stelle noch einmal erwähnt werden, dass es sich bei Mastitis um ein multifaktorielles Geschehen handelt, welches auch von vielen weiteren Managementfaktoren wie zum Beispiel der Fütterung, Genetik, usw. abhängt. Durch eine Vielzahl von Faktoren, die dazu beitragen können, ist es auch trotz der Teilung der Diplomarbeit in 2 Diplomarbeiten, schwer der Thematik umfassend gerecht zu werden. Hinsichtlich dieser weiteren Zusammenhänge ist noch Forschung notwendig.

10. Literatur

1. Deng Z, Koop G, Lam TJGM, van der Lans IA, Vernooij JCM, Hogeveen H. Farm-level risk factors for bovine mastitis in Dutch automatic milking dairy herds. *J Dairy Sci* 2019; 102(5):4522–35. doi: 10.3168/jds.2018-15327.
2. Klaas IC, Zadoks RN. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65 Suppl 1:166–85. doi: 10.1111/tbed.12704.
3. Wente N, Krömker V. *Streptococcus dysgalactiae*-Contagious or Environmental? *Animals (Basel)* 2020; 10(11). doi: 10.3390/ani10112185.
4. Tenhagen B-A, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 2006; 89(7):2542–51. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X.
5. Campos B, Pickering AC, Rocha LS, Aguilar AP, Fabres-Klein MH, Oliveira Mendes TA de et al. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Vet Res* 2022; 18(1):115. doi: 10.1186/s12917-022-03197-5.
6. Barkema H, Schukken Y, Zadoks R. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J Dairy Sci* 2006:1877–95.
7. National Mastitis Council. Recommended Mastitis Control Program 2001.
8. Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR. Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management 1969:696–707.
9. Keefe G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2012; 28(2):203–16. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010.
10. Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci* 2017; 100(12):10381–97. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29153171/>.
11. Wald R, Lichtmannsperger K, Urbantke V, Hess C, Spargser J, Baumgartner M. Nachweis von *Streptococcus agalactiae* Sequenztyp 1 in einem österreichischen Milchviehbetrieb: Ein Fallbericht 2020:147–55.

12. Lundberg Å, Nyman A-K, Aspán A, Börjesson S, Unnerstad HE, Waller KP. Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. *J Dairy Sci* 2016; 99(3):2102–17. doi: 10.3168/jds.2015-9487.
13. Holsteg M. *Mycoplasma bovis* – Klinik, Diagnostik und Bekämpfung. *Veterinärspiegel* 2021:34–9.
14. Pothmann H, Spergser J, Elmer J, Prunner I, Iwersen M, Klein-Jöbstl D et al. Severe *Mycoplasma bovis* outbreak in an Austrian dairy herd. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27(6):777–83. doi: 10.1177/1040638715603088.
15. Barkema H, Schukken Y, Lam T, Beiboer M, Benedictus G, Brand A. Management Practices Associated with the Incidence Rate of Clinical Mastitis. *J Dairy Sci* 1999:1643–54.
16. Lundberg A, Nyman a, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K. Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* 2014:2–11.
17. Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS, Browning GF. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4):1460–6. doi: 10.1128/JCM.39.4.1460-1466.2001.
18. Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Gröhn YT, Schukken YH. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci* 2001; 84(3):590–9. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74512-2.
19. McDougall S, Parkinson TJ, Leyland M, Anniss FM, Fenwick SG. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. *J Dairy Sci* 2004; 87(7):2062–72. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)70024-7.
20. Paduch JH, Krömker V. Besiedlung von Zitzenhaut und Zitzenkanal laktierender Milchrinder durch euterpathogene Mikroorganismen 2011:71–6.
21. Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 2002; 164(2):116–28. doi: 10.1053/tvjl.2002.0724.
22. Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy; 2008. (*Food control*; Bd. 19).

23. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16(4):383–407. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10911-011-9235-z>.
24. Kagkli DM, Vancanneyt M, Vandamme P, Hill C, Cogan TM. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *J Appl Microbiol* 2007; 103(5):1393–405 [Stand: 27.04.2023]. Verfügbar unter: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1365-2672.2007.03338.x?download=true>.
25. Hammerum AM, Lester CH, Heuer OE. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7(10):1137–46. doi: 10.1089/fpd.2010.0552.
26. Burvenich C, van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003; 34(5):521–64. doi: 10.1051/vetres:2003023.
27. Hogan J, Larry Smith K. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003; 34(5):507–19 [Stand: 28.04.2023]. Verfügbar unter: <https://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2003/05/V3503.pdf>.
28. Green MJ, Green LE, Cripps PJ. Comparison of fluid and flunixin meglumine therapy in combination and individually in the treatment of toxic mastitis. *Vet Rec* 1997; 140(6):149–52 [Stand: 28.04.2023]. Verfügbar unter: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1136/vr.140.6.149?download=true>.
29. Erskine RJ, Wagner S, DeGraves FJ. Mastitis therapy and pharmacology; 2003. (Bd. 19). Verfügbar unter: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0749072002000671?token=7DCFE462649747A1FC499C3BFC8D8D2806E2F487B6BE1769117BCF4E246C4B332C29ED2BAEEF0EACF74BF5B947F4BD89&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230428095552>.
30. Krömker V, Zinke C, Paduch J-H, Klocke D, Reimann A, Eller G. Evaluation of increased milking frequency as an additional treatment for cows with clinical mastitis. *J Dairy Res* 2010; 77(1):90–4. Verfügbar unter: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of->

dairy-research/article/evaluation-of-increased-milking-frequency-as-an-additional-treatment-for-cows-with-clinical-mastitis/3096011C7AA01A77A8FC5DEC9E08BE1E.

31. Hohmann M-F, Wente N, Zhang Y, Krömker V. Bacterial Load of the Teat Apex Skin and Associated Factors at Herd Level. *Animals (Basel)* 2020; 10(9). doi: 10.3390/ani10091647.
32. Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F et al. The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *Serratia*, and more. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 2012; 28(2):239–56. Verfügbar unter: https://www.researchgate.net/publication/225184400_The_Other_Gram-Negative_Bacteria_in_Mastitis.
33. Kamarudin MI, Fox LK, Gaskins CT, Gay JM. Environmental reservoirs for *Serratia marcescens* intramammary infections in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208(4):555–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8603907/>.
34. Friman MJ, Eklund MH, Pitkälä AH, Rajala-Schultz PJ, Rantala MHJ. Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Vet Scand* 2019; 61(1):54. doi: 10.1186/s13028-019-0488-7.
35. Barnum D, Thackeray E, Fish N. An Outbreak Of Mastitis Caused By *Serratia Marcescens*. *Can J Comp Med Vet Sci* 1958; 22(11):392–5.
36. Zadoks RN, Griffiths HM, Munoz MA, Ahlstrom C, Bennett GJ, Thomas E et al. Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J Dairy Sci* 2011; 94(2):1045–51. doi: 10.3168/jds.2010-3603.
37. Gröhn YT, Wilson DJ, González RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87(10):3358–74. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73472-4.
38. Roberson JR, Warnick LD, Moore G. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. *J Dairy Sci* 2004; 87(3):583–92. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73200-2.
39. Gillespie BE, Headrick SI, Boonyayatra S, Oliver SP. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet Microbiol*

- 2009; 134(1-2):65–72. Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508003659>.
40. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol* 2006; 115(1-3):199–207. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.02.001.
41. Sampimon OC, Barkema HW, Berends IMGA, Sol J, Lam TJGM. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds; 2009. (Bd. 134). Verfügbar unter:
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0378113508003623?token=0F7FC5C2D2037CE57096A330674EFEB8588C63793DE1BDD203CAD942A39D0A235FAC86AB7A4003D58A0D626B5E1E6122&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230504063644>.
42. Thorberg B-M, Kühn I, Aarestrup FM, Brändström B, Jonsson P, Danielsson-Tham M-L. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol* 2006; 115(1-3):163–72. Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506000290>.
43. Trinidad P, Nickerson SC, Alley TK. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J Dairy Sci* 1990; 73(1):107–14. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78652-3.
44. Matthews KR, Harmon RJ, Langlois BE. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J Dairy Sci* 1992; 75(7):1835–9. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77942-9.
45. Taponen S, Björkroth J, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal of Dairy Research* 2008; 75(4):422–9. Verfügbar unter:
<https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/coagulasenegative-staphylococci-isolated-from-bovine-extramammary-sites-and-intramammary-infections-in-a-single-dairy-herd/F927EF707267C30A294A58539D1402C1>.
46. Vliegheer S de, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, Leroy JLM, Barkema HW et al. Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Vet Microbiol* 2003; 92(3):245–

52. Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502003632>.
47. Matos JS, White DG, Harmon RJ, Langlois BE. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science* 1991; 74(5):1544–9. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(91)78315-x.
48. Waage S, Mørk T, Røros A, Aasland D, Hunshamar A, Odegaard SA. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 1999; 82(4):712–9. Verfügbar unter:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030299752884>.
49. Thorberg B-M, Danielsson-Tham M-L, Emanuelson U, Persson Waller K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci* 2009; 92(10):4962–70. doi: 10.3168/jds.2009-2184.
50. Rajala-Schultz PJ, Torres AH, Degraives FJ, Gebreyes WA, Patchanee P. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Vet Microbiol* 2009; 134(1-2):55–64. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18950963/>.
51. Schukken YH, González RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban CG, Welcome FL et al. CNS mastitis: nothing to worry about? *Vet Microbiol* 2009; 134(1-2):9–14. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.014.
52. Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Gröhn YT et al. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 2001; 84(12):2649–63. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(01)74719-4.
53. Krömker V. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. 1. Auflage. Stuttgart: Parey; 2007.
54. Hovinen M, Pyörälä S. Invited review: udder health of dairy cows in automatic milking. *J Dairy Sci* 2011; 94(2):547–62. doi: 10.3168/jds.2010-3556.
55. Fuchs JC, Achilles W, Röstel M, Kuwan K, Hartmann W. Automatische Melksysteme: Verfahren, Kosten, Bewertung. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft; 2013.

56. Pöllinger A. Bautagung Raumberg-Gumpenstein, gemäß Fortbildungsplan des Bundes: Zukunftsorientierte Rinder- und Schweinehaltung : 21 Mai 2015. Irnding-Donnersbachtal: Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein; 2015. (Bericht / Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein) [Stand: 24.02.2024]. Verfügbar unter: https://raumberg-gumpenstein.at/jdownloads/Tagungen/Bautagung/Bautagung_2015/3b_2015_poellinger.pdf.
57. Frondelius L, Lindeberg H, Pastell M. Recycled manure solids as a bedding material: Udder health, cleanliness and integument alterations of dairy cows in mattress stalls. *AFSci* 2020; 29(5):420–31. doi: 10.23986/afsci.95603.
58. Godden S, Bey R, Lorch K, Farnsworth R, Rapnicki P. Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria. *J Dairy Sci* 2008; 91(1):151–9. doi: 10.3168/jds.2007-0415.
59. Bradley AJ, Leach KA, Green MJ, Gibbons J, Ohnstad IC, Black DH et al. The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk - A cross sectional study of UK farms. *International journal of food microbiology* 2018; 269:36–45. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29421356/>.
60. Rowbotham RF, Ruegg PL. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2016; 99(6):4707–17. doi: 10.3168/jds.2015-10675.
61. Rowbotham RF, Ruegg PL. Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls. *J Dairy Sci* 2016; 99(8):6594–608. doi: 10.3168/jds.2015-10674.
62. Horn M, Pöllinger-Zierler A, Howorka B. Gülleseparierung Güllefeststoffe als Einstreu. ÖAG Broschüre 2021.
63. Baumgartner W. Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. 8., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke; 2014.
64. Schuler A. Pilotstudie zur mikrobiellen Belastung von Gülleseparat als Einstreumaterial und zu den Auswirkungen auf die Besiedlung der Zitzenhaut mit potentiell euterpathogenen Bakterien [Diplomarbeit]; 2024.

65. Skarbye AP, Thomsen PT, Krogh MA, Svennesen L, Østergaard S. Effect of automatic cluster flushing on the concentration of *Staphylococcus aureus* in teat cup liners. *J Dairy Sci* 2020; 103(6):5431–9. Verfügbar unter: [https://www-journalofdairyscience-org.translate.goog/article/S0022-0302\(20\)30233-2/fulltext?_x_tr_sl=de&_x_tr_tl=en&_x_tr_hl=de&_x_tr_pto=wapp](https://www-journalofdairyscience-org.translate.goog/article/S0022-0302(20)30233-2/fulltext?_x_tr_sl=de&_x_tr_tl=en&_x_tr_hl=de&_x_tr_pto=wapp).
66. Smith TW, Eberhart RJ, Spencer SB, Kesler EM, Hargrove GL, Wilson RW et al. Effect of Automatic Backflushing on Number of New Intramammary Infections, Bacteria on Teatcup Liners, and Milk Iodine. *J Dairy Sci* 1985; 68(2):424–32. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030285808407>.
67. Schuiling HJ, Neijenhuis F. Effectiveness of optimized teat cup cleaning in the prevention of mastitis pathogens transfer 2004.
68. Rasmussen DM, Blom YJ, Hjort Nielsen AL, Justesen P. Udder health of cows milked automatically. *Livestock Production Science* 2001; 72(1-2):147–56. doi: 10.1016/S0301-6226(01)00275-5.
69. Kruip TAM, Morice H, Robert M, Ouweltjes W. Robotic milking and its effect on fertility and cell counts. *J Dairy Sci* 2002; 85(10):2576–81. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74341-5.
70. Mulder HA, Groen AF, Jong G de, Bijma P. Genotype x environment interaction for yield and somatic cell score with automatic and conventional milking systems. *J Dairy Sci* 2004; 87(5):1487–95. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030204733007>.
71. Hovinen M, Rasmussen MD, Pyörälä S. Udder health of cows changing from tie stalls or free stalls with conventional milking to free stalls with either conventional or automatic milking. *J Dairy Sci* 2009; 92(8):3696–703. doi: 10.3168/jds.2008-1962.
72. Rodenburg J. Robotic milking: Technology, farm design, and effects on work flow. *J Dairy Sci* 2017; 100(9):7729–38. doi: 10.3168/jds.2016-11715.
73. Fréchette A, Fecteau G, Côté C, Dufour S. Clinical Mastitis Incidence in Dairy Cows Housed on Recycled Manure Solids Bedding: A Canadian Cohort Study. *Front Vet Sci* 2021; 8. doi: 10.3389/fvets.2021.742868.
74. Spohr M. Feststoffestreu: Mit Gülle und Gärsubstraten einstreuen? 2016:1–5.

11. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Vorgangsweise bei der Entnahme der Zitzenhauttupfer (links) bzw. der Tupferproben der Zitzenspitze (rechts). Feucht- und Trockentupfer des Zitzenpaares rv und lh wurden jeweils in einem sterilen Röhrchen mit 2 ml Ringerlösung aufgenommen (Mitte). 21**
- Abb. 2: Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung (BU) von Viertelgemelksproben vor, während und nach der Umstellung. Dargestellt ist die prozentuelle Verteilung von BU-negativen Kühen und den nachgewiesenen Mastitis-Pathogenen. 28**
- Abb. 3: Prozentuelle Verteilung von BU-negativen und BU-positiven Viertelgemelksproben inklusive der nachgewiesenen Mastitispathogene an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. 29**
- Abb. 4: Verlauf der Coliformen Keime pro cm^2 Zitzenhaut an den drei Untersuchungszeitpunkten in der Umstellungsphase (Jänner) bzw. nach der Umstellung auf Feststoffeinstreu. Die Keimzahlen auf dem MacConkey Agar sind im dekadischen Logarithmus angegeben ($\log_{10}\text{MAC}$). 32**
- Abb. 5: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Tupferproben der Zitzenhaut (KBE/cm^2) nach Ausstrich auf KKA-Agar mit signifikanten Unterschieden zwischen Zeitpunkt 1 und 3. (Zeitpunkt 1: Jänner, Zeitpunkt 2: April, Zeitpunkt 3: Juni). Die Keimzahlen auf dem KAA-Agar sind im dekadischen Logarithmus angegeben ($\log_{10}\text{KAA}$). 33**
- Abb. 6: Verlauf der Gesamtkeimzahl GKZ auf der Zitzenspitze an den drei Untersuchungszeitpunkten in der Umstellungsphase (Zeitpunkt 1, Jänner) bzw. nach der Umstellung auf Feststoffeinstreu im April (2) bzw. im Juni (3). Dargestellt ist wiederum der dekadische Logarithmus der Gesamtkeimzahl ($\log_{10}\text{GKZ}$). 34**
- Abb. 7: Boxplotdarstellung des Zellzahlverlaufes vor der Umstellung (bis Messung am 01. 12. 2021), in der Umstellungsphase (13. 12. 2021 und 11. 01. 2022) und nach der Umstellung bis Oktober 2022. Alle Zellzahlmesswerte sind logarithmiert. Ein Log_{10} von 5,0 entspricht einer Zellzahl von 100.000 Zellen/ml. 36**
- Abb. 8: Punktdiagramm zum Verlauf der Tankmilchzellzahlen von Oktober 2021 bis September 2022. An jedem Untersuchungszeitpunkt sind die 5 Messungen der Tankmilchzellzahl im jeweiligen Monat logarithmiert dargestellt. Die grüne Linie schneidet die Y-Achse bei einem**

Zellzahlwert von 100.000 Zellen/ml (dekadischer Logarithmus), die rote Linie bei einem Zellzahlwert von 250.000 Zellen/ml was der S-Klasse entspricht. 37

Abb. 9: Entwicklung der Melkfrequenz pro Tier und Tag. 38

Abb. 10: Boxplotdarstellung der unvollständigen Melkungen pro Woche. 39

12. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Ergebnisse der bakteriologisch untersuchten Viertelgemelksproben (BU-Ergebnis) vor der Umstellung (November und Dezember 2021), in der Umstellungsphase (Jänner 2022) und nach der Umstellung (April und Juni 2022).** 27
- Tab. 2: Auflistung der Keimzahlen (Gesamtkeimzahl, GKZ), der Anzahl der Coliformen (auf MAC Agar), der Staphylokokken (BPA) und der Enterokokken (BAA), bzw. Äskulinpositiven Kokken, KAA) pro cm² Zitzenhaut.** 30
- Tab. 3: Auflistung der Gesamtkeimzahl (GKZ), sowie der Keimzahlen auf McConkey Agar, auf Baird Parker Agar, auf BAA und KAA in den Tupferproben der Zitzenspitze.** 31
- Tab. 4: Ergebnisse der GKZ der Melkbecher vor und nach der Melkbecherdesinfektion mit Peressigsäure (Des. PES).** 35

Danksagung

Ein Projekt wie dieses wäre ohne Unterstützung nicht möglich gewesen, deswegen möchte ich allen beteiligten Personen, welche mich bei der Anfertigung meiner Diplomarbeit unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Dr.med.vet. Martina Baumgartner für die großartige fachliche Begleitung der Arbeit. Für die vielen Ratschläge und netten Gespräche von der Ideenfindung bis zur Finalisierung der Arbeit bei jeder noch so komplexen Fragestellung und für die vielen Stunden die wir in die Arbeit investiert haben. Auch bedanken möchte ich mich beim Team des Milchlabors an der Klinik für Wiederkäuer DI Verena Urbantke, Bettina Löffler und Lihui Han König für die Gastfreundschaft und die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek, Dipl.ECBHM für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Arbeit an der Wiederkäuerklinik schreiben durfte und für die Unterstützung in fachlichen und formalen Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Priv.-Doz. Dr.med.vet. Michael Iwersen für die hilfreichen und konstruktiven Anmerkungen und für die rasche Durchsicht der Arbeit.

Für die Förderung dieses Projektes möchte ich mich bei der Österreichischen Buiatrischen Gesellschaft (Univ.Prof. Dr. Dr. h.c. Walter Baumgartner), dem Tiergesundheitsdienst Oberösterreich (HR Dr. Gottfried Schoder) sowie dem LKV OÖ (DI Markus Koblmüller, Thomas Oskar M.Sc.) bedanken.

Bei der HUESKER Synthetic GmbH (Alexander Penzinger), DeLaval (Martin Huber) sowie der Perwolf Gülletechnik GmbH (Johannes Zechner), für die Bereitstellung von Gerätschaften.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Kommilitonen Anna Freytag, Anna Schoder, Anna Schuler, Anna Riepl, Benjamin Arnold, Günther Rasser, Katja Rosenstingl, Lisa Hajek, Martin Thaler, Manuel Paratscha und Mariella Zimmermann für die tatkräftige Unterstützung bei der Probennahme. Besonders bedanken möchte ich mich bei Anna Schuler, für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Diplomarbeit. Bei meinen Kommilitonen möchte ich mich nicht nur für die tatkräftige Unterstützung im Zuge der Diplomarbeit bedanken, sondern auch für eine großartige Studienzeit und viel schöne Momente, welche in Erinnerung bleiben werden.

Abschließend möchte ich meinen größten Dank aussprechen; dieser gilt meiner Familie. Meinen Eltern, Christine und Gerhard Heneckl, die in mir die Leidenschaft für die Tiere geweckt haben, mich mein ganzes Leben lang unterstützt haben und mir ermöglicht haben diesen Weg gehen zu können und Tierarzt zu werden. Meinen Geschwistern Michael Heneckl, B. Eng., und Nicole Heneckl, für die großartige Unterstützung im Rahmen meiner Abschlussarbeit, aber auch für die vielen aufmunternden Worte und guten Zusprüche während des ganzen Studiums.

Danke Mama, Papa, Michi und Nicki!