

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

Zentrum für Systemtransformation und Nachhaltigkeit in der Veterinärmedizin  
(Leiterin: Univ.-Prof. Dr.sc.agr. Barbara Metzler-Zebeli)

**Mikrobiom-Charakterisierung aus der ersten Kolostralmilch bei  
Fleckviehkühen in Stallhaltung: Zusammenhänge zur somatischen  
Zellzahl, der Parität, der vorherigen Antibiotika-Anwendung und  
Mastitis-Anamnese**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Carolina Kroboth

Wien, im Oktober, 2024

**Betreuerin:**

Univ.-Prof. Dr.sc.agr. Barbara Metzler-Zebeli

Zentrum für Systemtransformation und Nachhaltigkeit in der Veterinärmedizin  
Veterinärmedizinische Universität Wien

**Gutachterin:**

Dr. med. vet. Katharina Lichtmannsperger, ECBHM

Klinisches Zentrum für Wiederkäuer- und Kamelidenmedizin

Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen

Veterinärmedizinische Universität Wien

## INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG .....	4
2. ABSTRACT .....	6
3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	8
4. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
4.1. Mikrobiom.....	1
4.2. Kolostrum .....	3
4.3. Physiologisches Mikrobiom der Milch .....	5
4.4. Milchdrüse des Rindes .....	6
4.5. Mastitis .....	8
4.6. Somatische Zellzahl als Indikator der Eutergesundheit.....	11
4.7. Zusammenhang zwischen Mastitis und Parität.....	13
4.8. Effekt von Antibiotika auf (Milch-) Mikrobiome .....	14
4.9. Ziele und Hypothesen.....	15
5. MATERIAL UND METHODEN.....	17
5.1. Versuchsplan .....	17
5.2. Probenahme.....	18
5.3. Bestimmung des Zellzahlgehaltes .....	19
5.4. DNA-Extraktion und quantitative PCR .....	20
5.5. 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung und Bioinformatik .....	21
5.6. Statistische Analyse .....	22
6. ERGEBNISSE .....	24
6.1. Antibiotika-Behandlungen und Mastitis-Diagnosen der Kühe im Verlauf der aktuellen und vorausgegangenen Laktation .....	24
6.2. Somatische Zellzahlen in Kolostrum und in der Milch vom 14. und 28. Laktationstag	26
6.3. Alpha-Diversität .....	27
6.4. Beta-Diversität.....	30
6.5. Nachgewiesene Gattungen und Korrelationen .....	32
7. DISKUSSION .....	38
8. LITERATURVERZEICHNIS .....	43
9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....	47

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Früher wurde davon ausgegangen, dass Milch vollkommen steril sei. Neuere Forschungen mit verbesserten Technologien ermöglichten die Erkenntnis, dass dem nicht so ist. Nicht nur Milch, sondern sogar das Kolostrum von primiparen und multiparen Kühen enthält ein Mikrobiom, dessen Zusammensetzung Auswirkungen auf unterschiedliche Faktoren, wie zum Beispiel das Wachstum von Kälbern oder die Eutergesundheit, haben könnte. Dieses Projekt untersuchte das Kolostrummikrobiom von Milchkühen, um Erkenntnisse über dessen Zusammensetzung und mögliche Zusammenhänge mit der Eutergesundheit zu gewinnen. Im Fokus stand die Charakterisierung des Kernmikrobioms im Kolostrum. Zusätzlich wurde die somatischen Zellen am Tag 14 und 28 *post partum* untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Diversität des Mikrobioms des ersten Kolostrums mit der Zahl der somatischen Zellen, der Parität, dem Antibiotikaeinsatz in der Vergangenheit sowie der klinischen Anamnese und dem Auftreten von Mastitis erkennen zu können. Hierfür wurden von 16 Fleckviehkühen an Tag 1, 14 und 28 *post partum* sterile Milchproben entnommen. Die somatische Zellzahl (SCC, somatic cell count) wurde noch am selben Tag bestimmt. Die Mikrobiom-Analyse erfolgte nach Abschluss der Probenentnahme mittels 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung (V3-V4 Region). Dafür wurde die DNA aus den vorher tiefgefrorenen Proben extrahiert. Daten zur Parität, Mastitis-Vorgeschichte und Antibiotika-Behandlungen wurden von der VetFarm bereitgestellt. Die Parameter Mastitis, Antibiotika-Behandlung und vorhandene Mikroben wurden in verschiedenen Konstellationen statistisch ausgewertet. Die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften im Kolostrum war zwischen den vier Eutervierteln gleich. Ebenfalls gab es zwischen den Eutervierteln keine Unterschiede in den relativen Abundanzen der bakteriellen Gattungen ( $\geq 0,1\%$  aller Sequenzen). *Delftia* war die am häufigsten vorkommende Gattung in den Kolostrumproben. Bekannte Mastitis-Erreger wie beispielsweise *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* und *Acinetobacter* konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Das Vorhandensein dieser Gattungen könnte auf eine beginnende oder bereits durchgemachte Mastitis hinweisen, eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten von Mastitis in der aktuellen bzw. vorausgegangenen Laktation konnte jedoch nicht festgestellt werden. Jedoch zeigte die Alpha-Diversitätsanalyse des Kolostrums eine höhere mikrobielle Artenvielfalt in den linken Eutervierteln. Die Studie konnte keine Assoziation zwischen einer Antibiotika-Verabreichung und der Zusammensetzung des Kolostrummikrobiom feststellen. Die Untersuchungen der SCC zeigten, dass die somatische Zellzahl am ersten Tag *post partum* am höchsten ist. Die erhöhten Werte sind physiologisch durch die Kolostrumproduktion zu erklären und nicht als Indikator für eine Mastitis zu werten.

Es konnte eine mittlere Korrelation zwischen der SCC am ersten Tag *post partum* und einer Antibiotikabehandlung in der vorangegangenen Laktation festgestellt werden. An Tag 14 und 28 *post partum* konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der SCC und der Antibiotika-Verabreichung in der aktuellen Laktation, sowie früheren Mastitis-Diagnosen nachgewiesen werden. Ebenso wurde festgestellt, dass die linke Euterseite eine größere Neigung zeigt eine Mastitis zu entwickeln, im Vergleich zur rechten Seite. An Tag 14 *post partum* war auch die SCC tendenziell auf der linken Seite höher. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Kühe die linke Körperseite zum Liegen bevorzugen. Aufgrund der großen Variabilität bezüglich Parität konnten keine signifikanten Rückschlüsse auf die Zusammenhänge zwischen Parität, SCC, Mastitis und Antibiotikatherapie gezogen werden. Das Wissen um die Mikroben, die im Kolostrum vorhanden sind, kann langfristig dabei helfen die Eutergesundheit in Milchviehbetrieben zu verbessern.

## 2. ABSTRACT

It was previously assumed that milk was completely sterile. However, recent research using improved technologies has revealed that this is not the case. Not only milk but even the colostrum from both primiparous and multiparous cows contains microbes, the composition of which could impact various factors, such as calf growth or udder health. This project investigated the colostrum microbiome of dairy cows to gain insights into its composition and possible connections to udder health. The focus was on characterizing the core microbiome in colostrum. Additionally, a potential correlation between the diversity of the microbiome in the first colostrum and factors such as the somatic cell count (SCC) in colostrum and days 14 and 28 *post partum*, parity, previous antibiotic use, clinical history, and the occurrence of mastitis was examined. Sterile milk and colostrum samples were taken from 16 Fleckvieh cows (= Simmental cattle) on days 1, 14, and 28 *post partum*. The somatic cell count was determined in fresh colostrum samples on the same day. For the microbiome analysis colostrum samples were frozen. DNA was extracted which was used for 16S amplicon sequencing (V3-V4 region). Data on parity, mastitis history, and antibiotic treatments were provided by the VetFarm. The parameters of mastitis, antibiotic treatment, and the presence of microbes were statistically analyzed in various statistical models. The structure of the bacterial communities in colostrum was similar across all four udder quarters. There were also no differences in the relative abundances of bacterial genera ( $\geq 0.1$  % of all sequences) between the quarters. *Delftia* was the most common genus found in the colostrum samples. Known mastitis pathogens, such as *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, and *Acinetobacter*, were also detected. The presence of these genera could indicate an onset or past case of mastitis, but no significant correlation with the occurrence of mastitis in the current or previous lactation was found. However, alpha-diversity analysis of the colostrum revealed a higher microbial diversity in the left udder quarters. The study found no association between antibiotic administration and the composition of the colostrum microbiome. SCC analysis showed that somatic cell counts were higher on the first day *post partum* compared to days 14 and 28 *post partum*. These higher values can be physiologically explained by colostrum production and should not be considered an indicator of mastitis. A moderate correlation was observed between the SCC on the first day *post partum* and antibiotic treatment in the previous lactation. On days 14 and 28 *post partum*, a correlation between SCC and antibiotic administration in the current lactation, as well as prior mastitis diagnoses, was also observed. Furthermore, the left side of the udder showed a greater tendency to develop mastitis compared to the right side. On day 14 *post partum*, the SCC was also generally higher on the left side. This may be explained by

the fact that cows tend to prefer lying on their left side. Due to the large variability in parity, no significant conclusions could be drawn regarding the relationships between parity, SCC, mastitis, and antibiotic therapy. Knowledge of the microbes present in colostrum can help improve udder health in dairy farms in the long term.

### 3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGR	aufgewertete Grundration
AMA	AgrarMarkt Austria
CMT	California Mastitis Test
DSCC	differential somatic cell count, differenzierte somatische Zellzahl
EGF	epidermal growth factor
Fc-Rezeptor	fragment crystallisable-Rezeptor
GIT	Gastrointestinaltrakt
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG, IgA, IgM	Immunglobulin G, Immunglobulin A, Immunglobulin M
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LKV	Landeskontrollverband
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs, nicht-steroidale Entzündungshemmer
PTH	Parathormon
RID	radiale Immundiffusion
SCC	somatic cell count, somatische Zellzahl
SCFA	short chained fatty acids, kurzkettige Fettsäuren
TGF	transforming growth factor

## 4. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

### 4.1. Mikrobiom

Unter dem Begriff „Mikrobiom“ wird die Ansammlung unterschiedlicher Arten von Pilzen, Bakterien, Protozoen, Archaea und Viren verstanden, die bestimmte Bereiche eines Organismus besiedeln, und dessen Zusammensetzung je nach Wirt und Ansiedlungsort variiert (1,2). Laufend werden neue Erkenntnisse zu unterschiedlichen Bereichen der Mikrobiom-Forschung veröffentlicht, sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin (1,3,4). Ziel dieser Forschung ist es, die variable Zusammensetzung der unterschiedlichen Mikrobiome zu entschlüsseln und Korrelationen zwischen eben diesen Zusammensetzungen und gewissen individuellen Charakteristika des Wirtes (z.B. Anfälligkeiten für bestimmte Krankheiten) zu erkennen (1).

Zusammen bilden die oben genannten Mikroorganismen ein System, das mit dem Wirt eine Symbiose bildet. So stellt der Wirt das Überleben der Mikroorganismen sicher, indem er die nötigen Bedingungen stellt wie Wärme, Nährstoffe, Feuchtigkeit, etc., während die physiologisch vorhandenen Mikroorganismen dem Wirt wichtige Enzyme zur Verfügung stellen können, (5) oder ihn durch kompetitive Hemmung pathologischer Keime vor Krankheit schützen (2).

Ein besonders herausragendes Beispiel für die Symbiose zwischen dem Mikrobiom und dem Wirt stellt das komplexe Verdauungssystem der Wiederkäuer dar. Dieses besteht aus einem System von Vormägen, die jeweils einen wichtigen Teil der Verdauung erfüllen. Nach der Geburt siedelt sich in diesen Vormägen eine mikrobielle Population an. Diese Ansiedelung erfolgt über unterschiedliche Wege. So gelangen Protozoen über den Kontakt mit anderen Tieren in den Gastrointestinaltrakt (GIT), während Bakterien überwiegend an der Oberfläche von Futterpartikeln zu finden sind (5). Im Zusammenhang mit dem Thema „Mikrobiom“ ist besonders der Pansen zu nennen. Dieser fungiert bei Wiederkäuern als eine Art Gärkammer und beinhaltet komplexe Mikrobiota, wovon etwa 95 % Bakterien sind (2). 67 % dieser Bakterien gehören zu den Stämmen *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Fibrobacteres*. Diese Stämme sind bei allen Wiederkäuern im Pansen und GIT zu finden (6). Primär besteht die Aufgabe des Mikrobioms des Pansens darin pflanzliche Bestandteile wie Zellulose und andere Kohlenhydrate, die über das Futter aufgenommen werden, in Energie umzuwandeln und dem Wirt zur Verfügung zu stellen. Ohne die Aufbereitung dieser Partikel durch die Mikroorganismen, wäre dies rein durch die körpereigenen Verdauungsprozesse des Wirtes nicht möglich (5). Außerdem deckt das Mikrobiom der Wiederkäuer etwa 70 % der

Enzyme, die der Wirt täglich braucht (2). Eine geschickte Kontrolle der Zusammensetzung des Mikrobioms könnte in Zukunft die Produktion und Qualität der Produkte, die wir von Rindern erhalten, verbessern. Die Manipulation des Mikrobioms im Verdauungssystem könnte auch eine bessere Aufnahme von Futter ermöglichen, sowie Methanemissionen reduzieren (2,6).

Wie wichtig das ausgewogene Zusammenspiel zwischen Mikrobiom und Wirt ist, lässt sich wahrscheinlich am deutlichsten durch das Beispiel einer Dysbiose, wie im Falle einer Pansenazidose veranschaulichen. Der physiologische pH-Wert des Pansens liegt zwischen 5,5 und 7,0 und wird durch den Speichel, die  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion des Pansenepithels und SCFA-Produktionsrate (short chained fatty acids = kurzkettige Fettsäuren) aufrechterhalten. Besteht ein zu großer Anteil der Futtermittel aus leicht verdaulichen Kohlenhydraten, bauen die Mikroorganismen im Pansen diese schneller ab und es kommt infolgedessen zu einem erheblichen Anstieg an Milchsäure SCFA. Auch das Mikrobiom verändert sich dadurch. In Kombination mit der verminderten Speichelproduktion durch reduzierte Kautätigkeit bei diesen strukturarmen Futtermitteln, kommt es im Pansen zum Absinken des pH-Wertes. Dies führt zu wesentlichen Störungen der Barriere- und Transportfunktion der Vormägen (5). Durch den niedrigen pH-Wert werden die physiologisch vorkommenden Mikrobiota verdrängt. Zudem begünstigt ein saures Milieu das Wachstum von Laktat-Bildnern, woraufhin die Laktatkonzentration gegenüber den normalerweise vorhandenen SCFA überwiegt. Laktatabbauer hingegen werden durch einen niedrigen pH-Wert gehemmt. Da Laktat nur in geringem Maße aus den Vormägen resorbiert wird, kommt es zu einer Änderung des osmotischen Drucks und daraus resultierend zu einem vermehrten Wassereinstrom in die Vormägen. Das führt zu einer weiteren Verschlechterung der Barriere- und Transportfunktion des Epithels, die Vormagenmotilität wird gehemmt und es kommt in weiterer Folge zu einem Entgleisen des Säure-Basen-Haushaltes der Tiere und einer metabolischen Azidose (5).

Moderne DNA-Sequenzierungstechnologien, z.B. die die 16S-rRNA-Amplifikation, leisten einen erheblichen Beitrag zum raschen Fortschreiten der Mikrobiom-Forschung. Dadurch können gezielt mikrobielle DNA-Regionen sequenziert und anschließend mit Referenz-Datenbanken verglichen werden, was auch eine Bestimmung der vorkommenden mikrobiellen Spezies ermöglicht, die nicht kultivierbar sind (1,7). Die Entwicklung dieser Technologien ermöglicht nun auch die Entdeckung von Mikrobiomen in Systemen, die bislang als steril galten (7), wie zum Beispiel dem Respirationstrakt (8) oder Mekonium (9).

#### 4.2. Kolostrum

Kolostrum ist die erste Milch der Säugetiermutter, die sie nach der Geburt ihres/ihrer Jungen produziert (5). Bereits vor der eigentlichen Laktogenese ist eine geringe Menge an Drüsensekret mit einem besonders hohen Gehalt an Immunglobulinen im Euter vorhanden. Einige Immunglobuline, wie zum Beispiel Immunglobulin G (IgG), welches beim Rind den größten Anteil der im Kolostrum befindlichen Immunglobuline ausmacht, gelangen aus dem Blut durch die Fc-Rezeptoren (fragment crystallisable-Rezeptor) in das Drüsensekret der Milchdrüse. Die Immunglobuline A und M werden hingegen in residenten Plasmazellen direkt in der Milchdrüse produziert. Die Kolostragenese erfolgt bis zur Geburt und endet danach. In den nachfolgenden Gemelken nimmt der Gehalt an Immunglobulinen entsprechend immer weiter ab (5).

Bei Tieren, die einen epitheliochorialen Plazentatyp besitzen, wie beispielsweise Pferde oder Wiederkäuer (10), ist die Versorgung des Neugeborenen mit Kolostrum essentiell, da die intrauterine Übertragung maternaler Antikörper nicht ausreichend erfolgt und das Immunsystem der Neonaten ohne sie zu schwach wäre (5,10). Bei der Zuteilung von Kolostralmilch ist darauf zu achten, dass diese von guter Qualität ist und in ausreichender Menge zum richtigen Zeitpunkt aufgenommen wird, um eine passive Immunisierung und adäquate Versorgung des Neonaten zu gewährleisten (11).

Die Qualität von bovinem Kolostrum wird anhand des IgG-Gehalts als Messwert bestimmt. Zur Überprüfung können unterschiedliche Techniken zum Einsatz kommen. Am genauesten ist hierbei die Verwendung eines ELISA (enzyme linked immuno assay) oder RID (radiale Immundiffusion) (11). Da bei diesen Methoden jedoch unter Laborbedingungen gearbeitet werden muss, sind für die Praxis alternative Vorgehensweisen unabdinglich. Hierbei hat sich unter anderem die Verwendung eines Brix-Refraktometers bewährt, welches die Lichtbrechung und somit die relative Dichte des Kolostrums bestimmen kann. Ein Wert  $\geq 22$  % Brix spricht für eine gute Kolostrumqualität, Werte  $\leq 18$  % Brix für einen Mangel. Bei Werten zwischen 18 % und 22 % Brix sollte darüber nachgedacht werden, Kolostrum von höherer Qualität zuzufüttern, um somit mögliche Mängel sicher ausgleichen zu können (11). Ein weiteres Instrument zur Überprüfung der Qualität stellen pH-Wertmessung, makroskopische Beurteilung oder auch Biestmilchspindel dar, die mithilfe der spezifischen Dichte Rückschlüsse auf die IgG-Konzentration und somit auf die Qualität des Kolostrums zulassen (11).

10 bis 12 % seines Körpergewichts an Biestmilch sollte ein neugeborenes Kalb in den ersten Lebensstunden zu sich nehmen. Am besten eignet sich hierbei die Verabreichung des Kolostrums über eine Nippeltränke, da bei dieser Art der Verabreichung die Qualität und die verabreichte Menge kontrolliert werden können (12). Die Resorption von IgG erfolgt im Dünndarm durch Endozytose und Exozytose in den ersten Lebensstunden. Ähnlich wie bei der Bildung des Präkolostrums im Euter ist auch hier der Fc-Rezeptor für die Aufnahme der Immunglobuline verantwortlich. Diese Rezeptoren verschwinden jedoch innerhalb der ersten Lebensstunden, weshalb die rasche Aufnahme von Kolostrum nach der Geburt für die passive Immunisierung des Kalbes so wichtig ist. Außerdem ist sowohl die Konzentration der Magensäure als auch die Aktivität von Verdauungsenzymen in den ersten Lebensstunden gering. So können die Immunglobuline in dieser Zeit noch die Mägen passieren, ohne dabei beschädigt zu werden (5).

Es ist als gesichert anzusehen, dass die ausreichende Aufnahme von Kolostrum essenziell für eine adäquate postnatale Entwicklung des Immunsystems, sowie des Skelettes, der Muskulatur und des Magen-Darm-Traktes ist (5). Diesen Effekt erzielt das Kolostrum unter anderem durch den hohen Gehalt an Immunglobulinen und durch verschiedene darin vorhandene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), EGF (epidermal growth factor) oder TGF (transforming growth factor), die die Proliferation der Darmepithelzellen des Kalbes begünstigen (13,5).

Die Bedeutung von Kolostrum/Milch für die Besiedlung des Darms und die postnatale Entwicklung bei Kälbern ist zweifelsohne signifikant. Eine frühe Besiedelung mit gram-negativen Bakterien im GIT von Milchkälbern kann sich negativ auf Gesundheit und Wachstum der Tiere auswirken (3). Die ausreichende Aufnahme von Kolostrum verhindert die Ansiedelung pathogener Keime im Darm von Kälbern und hat gleichzeitig auch eine entzündungshemmende Wirkung im GIT (3).

Einfluss auf die Besiedelung des Kälberdarms mit Mikroorganismen hat auch die Handhabung des Kolostrums, speziell die Hitzebehandlung. Nicht erhitztes Kolostrum kann neben Mikroorganismen, die sich positiv auf die Entwicklung des Kalbes auswirken, auch jene enthalten, die eine gewisse Pathogenität aufweisen. Die Fütterung von nicht erhitztem Kolostrum stimuliert die Bildung von *Clostridium* Cluster XIVa und *Bifidobacterium*, während eine Vermehrung von *Escherichia coli* im Darm gehemmt wird. Die Fütterung von hitzebehandeltem Kolostrum verstärkt den Effekt der Kolostrumfütterung, indem es das Vorkommen von schleimhautassoziierten *Enterobacteriaceae* und *E. coli* weiter verringert und

ebenfalls das Vorkommen von schleimhautassoziierten *Bifidobacterium* erhöht (14). Da in der Praxis eine ständige Überprüfung der Kontamination des Kolostrums während Sammlung, Lagerung und gegebenenfalls Transport, nicht umsetzbar ist, ist es ratsam eine Hitzebehandlung (60 °C für 60 min) durchzuführen, um das Risiko einer Verabreichung von mit pathogenen Keimen belastetem Kolostrum zu verringern. Diese Maßnahme soll außerdem die Besiedelung von nützlichen Bakterien im Dickdarm fördern und damit auch die Gesundheit der Kälber verbessern (14).

Zum Mikrobiom reifer Milch sind schon einige Studien erschienen, die auch einen Ausblick auf einen möglichen Zusammenhang mit späteren Mastitis-Erkrankungen geben (15,16,17,18). In einer Studie von Lima et al. (2017) wurde das Mikrobiom des Kolostrums von 70 Holsteinrindern mittels rRNA-Sequenzierung charakterisiert und Vergleiche zwischen primiparen und multiparen Kühen angestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass sich gesundes Kolostrummikrobiom aus ca. 20 Taxa zusammensetzt. *Prevotella*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales*, *Clostridiales* und *Pseudomonas* stellen die Haupttaxa dieses Mikrobioms dar. Weiters deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Kolostrum-Mikrobiom von Erstkalbinnen von dem von multiparen Kühen abweicht und eine eigene Diversität und taxonomische Marker für die Gesundheit der Milchdrüsen enthält, die spezifisch nur für primipare Kühe gelten (19). Die Diversität und Zusammensetzung des Mikrobioms der Biestmilch von Fleckviehkühen und der Zusammenhang mit Parität und Mastitis soll im Zuge dieser Arbeit geklärt werden.

### **4.3. Physiologisches Mikrobiom der Milch**

Durch die Etablierung der bereits in Kapitel 4.1 erwähnten DNA-Sequenzierungstechniken gelang es festzustellen, dass auch Milch über ihr eigenes Mikrobiom verfügt (1,7). Ging man früher noch davon aus, dass in Milch vorgefundene Bakterien nur in Zusammenhang mit pathologischen Prozessen wie Mastitis auftreten (20), konnte mittlerweile festgestellt werden, dass auch Milch aus gesunden Eutervierteln über eigene Mikrobiota verfügt (19,21,22). Diese Mikroben werden auch als „kommensales Mikrobiom der Milchdrüse“, im Englischen als „commensal mammary microbiome“ bezeichnet (16). Diese Erkenntnis könnte in Zukunft dabei helfen die Entstehung von Mastitiden besser zu verstehen und die prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen entsprechend anzupassen. Noch ist nicht völlig geklärt, ob eine Störung der Vielfalt der Eutermikrobiota mit einer Anfälligkeit für Mastitis korreliert, (16) wenn auch bereits Unterschiede im Milchmikrobiom gesunder Kühe und Kühen mit subklinischer Mastitis entdeckt werden konnten (18).

Vier Phyla wurden bisher entdeckt, die zum kommensalen Mikrobiom reifer Milch zählen: *Firmicutes* (z.B. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.), *Proteobacteria* (z.B. *Pseudomonas* spp.), *Bacteroidetes* (z.B. *Prevotella*) und *Actinobacteria* (z.B. *Corynebacterium* spp.) (23). Eine nicht unbeträchtliche Anzahl an Bakterien, die in boviner Milch nachgewiesen werden konnten, ist ebenfalls in humaner Milch enthalten, wie zum Beispiel *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium* und *Enterococcus* (16,23,24,25). Dies lässt die Vermutung zu, dass es eine Art „grundlegender Mikrobiota“, im Englischen auch als „Core Milk Microbiota“ bezeichnet, gibt, die über verschiedene Spezies hinweg über die gleichen Bakterien verfügt (7).

Es wird angenommen, dass das Mikrobiom in boviner Milch, sowie auch die bakteriellen Gemeinschaften, die am Ende der Zitze angesiedelt sind, Einfluss auf die Gesundheit des Euters haben. Ebenso ist es wahrscheinlich, dass auch die Umwelt einen signifikanten Einfluss auf diese Gemeinschaften hat. Es konnten bereits gewisse Unterschiede der Zusammensetzung des Mikrobioms in Milch und Zitze in Abhängigkeit des Betriebssystems und der Jahreszeiten festgestellt werden. Saisonale Unterschiede, sowie Unterschiede in der Betriebsführung sind wesentliche Einflussfaktoren für die bakterielle Vielfalt und Zusammensetzung des Mikrobioms in der Milch und am Zitzenende (17).

Wie bereits erwähnt, wurde kürzlich herausgefunden, dass das Milchmikrobiom eutergesunder Kühe erheblich von demjenigen von Kühen mit subklinischer Mastitis abweicht (18). Das Vorhandensein von pathogenen Bakterien in der Milch führte zu einem bedeutenden Rückgang des Anteils an Milchsäurebakterien, die in der Produktionstechnologie von Milchprodukten von großer Bedeutung sind. Bei Milch gesunder Kühe waren zwei Phyla, *Firmicutes* und *Proteobacteria*, gleichermaßen vorherrschend. Im Gegensatz dazu dominierte in der Milch von Kühen mit diagnostizierter subklinischer Mastitis nur ein Phylum, entweder *Firmicutes* oder *Proteobacteria*. Zusätzlich war das Milchmikrobiom bei erkrankten Tieren durch eine geringere Diversität gekennzeichnet als die Milch gesunder Kühe (18). Ergebnisse zum unterschiedlichen Mikrobiom im Kolostrum primiparer Kühe im Vergleich zu multiparen Kühen liefert die bereits in Kapitel 4.2 genannte Studie von Lima et al. (2017) (19).

#### **4.4. Milchdrüse des Rindes**

Die Milchdrüse ist ein Hautorgan, genauer gesagt eine modifizierte Schweißdrüse (26). Allen Säugetieren ist die Entwicklung von Milchdrüsen, sowie die Produktion von Milch zur Ernährung ihrer Nachkommen gemeinsam. Die Bezeichnung der Milchdrüsen und die Anzahl

an Mammakomplexen ist jedoch tierartlich unterschiedlich. Das Rind verfügt pro Euterhälfte über zwei Drüsenkomplexe mit jeweils einer Zitze (5). Die insgesamt vier Mammakomplexe sind voneinander getrennt und werden umgangssprachlich auch als Euterviertel bezeichnet. Sie bestehen aus verschiedenen Bereichen, die jeweils unterschiedliche Funktionen erfüllen (26).

Der Milchdrüsenkomplex besteht aus dem Drüsenkörper (*Corpus mammae*), der das Drüsenparenchym (*Glandula mammaria*) und die Leitungsbahnen im Bindegewebe des Euters (*Interstitium*) für die Milch beinhaltet. Das Ausführungsgangsystem des Euters ist ein Hohlraumsystem, welches Drüsenparenchym und Zitzenöffnung (*Ostium papillare*) miteinander verbindet. Die Milchgänge (*Ductus lactiferi*) bilden hierbei eine Art Transportsystem für die Milch, während die Milchzisterne (*Sinus lactiferi*) als Zwischenspeicherstelle für die Milch zwischen den Melkungen bzw. dem Saugakt des Jungtieres fungiert. Von hier aus gelangt die Milch bei entsprechender Manipulation der Zitze über den Strichkanal (*Ductus papillaris*) zur Zitzenöffnung und somit nach außen (26).

Um aufsteigende bakterielle Infektionen des Euters zu verhindern, verfügt der Strichkanal über einen Schließmuskel als mechanische Barriere. Die Zitze selbst ist außen von einem schützenden, schuppigen Epithel bedeckt, das vor Verletzungen und damit vor dem Eindringen von Bakterien schützen soll. Das Zitzenende ist außerdem in der Lage bakteriostatische und bakterizide Moleküle (z.B. Zytokine, Lysozym, Laktoferrin und verschiedene Immunglobuline wie IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA und IgM) zu produzieren, die ebenfalls das Einwandern von Bakterien hemmen sollen. Gelangen dennoch Bakterien von außen in die Zitzenzisterne, löst dies eine Entzündungsreaktion aus: die Mastitis. Zunächst schreiten phagozytierende Leukozyten und humorale Faktoren des angeborenen Immunsystems ein. Ist der eingedrungene Erreger bereits bekannt, ist eine Reaktion des erworbenen Immunsystems die Folge (27).

Das Drüsenparenchym stellt den Funktionsbereich der Milchdrüse dar, der für die Synthese und Sekretion von Milch zuständig ist (5,26). Die Milchbildung erfolgt in den Alveolen durch Lactozyten (26). Lactozyten bilden das einschichtige Drüsenepithel an der Innenseite der Alveolen, der kleinsten Milchspeichereinheit der Milchdrüse. Sie sind in der Lage Laktose, Lipide und Proteine zu synthetisieren. Durch „tight junctions“ sind die Lactocyten fest verbunden und bilden die Blut-Milch-Schranke (5). Diese Barriere gewährleistet bei normaler Funktion den Ablauf physiologischer Prozesse und lässt bei Störungen der Eutergesundheit schnell sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrprozesse zur Wirkung kommen.

Abwehrzellen gelangen so durch diese Schranke in die Milch und erhöhen bei Mastitis die Zellzahl (27).

Eine gute Durchblutung des Drüsenparenchyms ist nicht nur Voraussetzung, um die Lactozyten mit den nötigen Bausteinen aus dem Blut für die Synthese von Milchbestandteilen zu versorgen, sondern auch für den Transport von Oxytocin (5). Neben einem dichten Kapillarnetz wird die Alveole auch von Myoepithelzellen umgeben (26). Beim Saugakt bzw. Melkvorgang wird das Hormon Oxytocin freigesetzt und stimuliert über die Rezeptoren an den Myoepithelzellen deren Kontraktion und somit die Milchejektion (5).

Während der Trächtigkeit ist die Konzentration an Progesteron im Blut der Kuh hoch (5). Progesteron ist ein trächtigkeitserhaltendes Hormon, welches zugleich die Sezernierung von Milch hemmt, indem es die Bildung des Hormons Prolaktin unterdrückt. Aufgrund des Abfalls von Progesteron um den Zeitpunkt der Geburt, steigt die Konzentration an Prolaktin, welches die Synthese von Milchproteinen und Laktose in Gang setzt. Oft lässt sich eine bevorstehende Geburt daran erkennen, dass einige Milchtropfen an den Zitzen auftreten (5).

Die ständige Stimulation der Zitzen durch das Trinken des Jungtieres bzw. durch das Melken sorgt dafür, dass immer weiter Milch produziert wird, wenn auch die Milchmenge mit der Zeit abnimmt. Bei Milchkühen wird dieser Effekt vom Menschen genutzt, um große Milchmengen für den menschlichen Verzehr generieren zu können (5). Die Optimierung der Gesundheit der Milchdrüse ist eine Priorität des Milchsektors, da Krankheiten, die die Milchdrüse betreffen, verheerende Auswirkungen auf die Produktivität, die Produktqualität und das Wohlbefinden der Tiere haben können (23). Um jedoch eine gute Eutergesundheit bei dieser Hochleistung gewährleisten zu können, ist es notwendig den Milchfluss mindestens einmal im Jahr auslaufen zu lassen. Dieser Vorgang wird auch als Trockenstellen bezeichnet und erfolgt im Idealfall in etwa sechs bis acht Wochen vor der Geburt des nächsten Kalbes (28).

#### **4.5. Mastitis**

Mastitis ist eine Entzündung der Milchdrüse (29,30) und ist die am häufigsten vorkommende Erkrankung von Milchkühen (31). Durch die verursachten pathologischen Veränderungen im Eutergewebe und den daraus resultierenden Rückgang der Milchleistung und -qualität (30), ist sie einer der größten Verursacher von wirtschaftlichen Verlusten in der Milchindustrie. (31,29). Trotz der Tatsache, dass Mastitis eine Erkrankung ist, die bereits seit Jahrhunderten

bekannt ist, erschwert die komplexe und multi-faktorielle Ätiologie die Kontrolle dieser Krankheit (32).

Die eindeutige Ätiologie dieser komplexen Erkrankung ist bislang noch nicht geklärt. Laufend werden Erreger und Ursachen entdeckt, die den Blick auf diese Thematik neuerlich verändern (32). Wie bereits in Kapitel 4.4 angeführt, verfügt das Euter über angeborene mechanische Abwehrmechanismen, die verhindern sollen, dass Bakterien aus der Umgebung in die Zitzenzisterne einwandern (27). Bestimmte Bedingungen, wie beispielsweise eine Dilatation des Schließmuskels des Strichkanals durch Hypokalzämie, können dazu führen, dass diese natürliche Barriere keinen ausreichenden Schutz bietet und dennoch Bakterien in das Euter gelangen (16,33). Ein anderer Ansatz, der die Entstehung von Mastitiden erklären soll, ist, dass nicht das Eindringen pathogener Bakterien, sondern eine Dysbiose des Milchmikrobioms das Überwuchern einer bestimmten kommensalen Bakterienart begünstigt und damit die Entzündung auslösen soll. Diese These wird vor allem durch die Tatsache unterstützt, dass bekannte Mastitis-Erreger, wie *Streptococcus uberis* oder *Staphylococcus aureus* auch in Eutervierteln nachgewiesen werden konnten, die keine Anzeichen für Mastitis aufwiesen (34). Eine Studie von Chen et al. (2018) beleuchtet auch die Möglichkeit, dass eine Dysbiose des GIT Auslöser für das Auftreten von Mastitiden sein kann. Es wurde eine Stuhltransplantation von an Mastitis erkrankten Kühen auf Mäuse durchgeführt. Diese Mäuse erkrankten anschließend ebenfalls an Mastitis. Der Einsatz von Probiotika verminderte die Mastitis-Symptomatik. Das spricht ebenfalls dafür, dass die mikrobielle Besiedelung des Darms Einfluss auf die Gesundheit der Milchdrüse hat (35). Unabhängig von der tatsächlichen Ursache scheint das Euter, trotz der teilweise heftigen Entzündungsreaktion des Immunsystems, ideale Bedingungen für diese Bakterien zu stellen, da der Großteil der Mastitis-Erreger dennoch in der Lage ist sich rasant zu teilen und dadurch noch schwerwiegendere Entzündungsreaktionen auszulösen (16,34).

Grob lässt sich Mastitis in zwei Formen einteilen: klinisch und subklinisch (32). Klinische Mastitiden können lokal oder systemisch auftreten. Symptome, die dabei auftreten können, sind unter anderem Rötungen, Schmerzen, Fressunlust, erhöhte Körpertemperatur, Rückgang der Milchleistung und Veränderungen des Aussehens der Milch bzw. Beimengungen von beispielsweise Blut oder Eiter (32,4). Einige Autoren teilen Mastitiden in drei Scores ein: milde, moderate und schwere Mastitis. Die Einteilung in diese Kategorien erfolgt durch die rektale Messung der inneren Körpertemperatur, sowie Hydrationsstatus, Pansenaktivität und Verhalten (36). Das Erscheinungsbild klinischer Mastitiden kann

spezifisch für einen gewissen Erreger sein und je nach vorherrschender Bakteriengruppe variieren (31,32). Subklinische Mastitiden sind von außen nicht zu erkennen, da sie nicht die klassischen Entzündungsanzeichen am Euter aufweisen. Auch die Milch kann makroskopisch unverändert erscheinen. Lediglich die Zellzahl, im Englischen Somatic cell count (SCC), ist bei dieser Form der Mastitis erhöht. Klassische Erreger für subklinische Mastitiden sind Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) (32).

Rötungen und Schwellungen der betroffenen Euterviertel, sowie die makroskopisch veränderte Milch sind pathognomon für eine klinische Mastitis (27). Um die Entzündung schon früher detektieren zu können bzw. auch subklinische Mastitiden zu erkennen, ist es ratsam regelmäßig die Milch zu kontrollieren. Für eine schnelle und kostengünstige Diagnose, die direkt im Stall durchgeführt werden kann, kann ein Schalmtest, im Englischen California Mastitis Test (CMT), verwendet werden (32,37,38). Dieser ist in der Lage über physikalische und biochemische Reaktionen mithilfe einer speziellen Flüssigkeit (Natrium-Alkyl-Aryl-Sulfonat) die Zellen, die sich in der Milch befinden verklumpen zu lassen. Damit wird die Viskosität der Milch erhöht, je mehr Zellen sich in der Probe befinden. Dies ist insofern von Bedeutung, als das eine erhöhte Zellzahl in der Milch für das Vorliegen einer Mastitis spricht. Auch ein veränderter pH-Wert lässt sich anhand der Farbveränderungen der Schalmflüssigkeit erkennen (32,38). Weitere Diagnosemöglichkeiten, die direkt vor Ort durchgeführt werden können sind ein Ultraschall des Euters oder eine Infrarot-Thermographie (37). Auch die Durchflusszytometrie stellt eine indirekte Methode der SCC-Messung dar. Hierbei werden Zellen oder Partikel detektiert, die durch ein elektrisches Feld fließen (32). Da diese Arten von Tests keine Rückschlüsse auf den ursprünglichen Erreger zulassen ist eine spezielle Labordiagnostik für eine sichere Diagnosestellung unabdingbar. Nach aseptischer Milchprobennahme kann in speziellen Labors die Probe auf bestimmte Erreger untersucht werden. Das Kultivieren von Proben ist nach wie vor die gängigste Methode. Da aber einige Erreger nicht kultivierbar sind, bringt die Untersuchung auf molekularer Ebene genauere Ergebnisse mit sich (32).

Im deutschsprachigen Raum werden die Mastitis-Erreger in „kuhassoziiert“ und „umweltassoziiert“ eingeteilt. Dies erlaubt Rückschlüsse über das potenzielle Zustandekommen einer Infektion. „Kuhassoziierte“ Erreger sind jene, die von Kuh zu Kuh beim Melken übertragen werden, beispielsweise durch mangelnde Desinfektion der Melkzeuge (39). Werden in einem Betrieb hauptsächlich diese Art von Erregern festgestellt, ist es auf Bestandesebene sinnvoll bei der Melkhygiene anzusetzen und die dort entstehenden Fehler zu

eliminieren, um die Eutergesundheit im Betrieb zu verbessern. „Umweltassoziierte“ Erreger stammen, wie der Name vermuten lässt, häufig aus der direkten Umwelt (Stall, Weide) der Tiere (39). Einige Bakterien, wie zum Beispiel *Streptococcus uberis*, sind prinzipiell Umweltkeime, können aber in Milchviehherden auch kuhassoziierten Charakter aufweisen. Derartige Keime sind besonders schwer zu bekämpfen (39). Die Mastitis-Erreger mit der höchsten Pathogenität sind *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E.coli*, *Streptococcus dysgalactia*, *Mycoplasma* spp., während koagulase-negative Staphylokokken und *Corynebacterium* spp. nur einen geringen pathogenen Effekt auf das Euter haben (40).

Aufgrund der kritischen Resistenzlage einiger Antibiotika ist der selektive Einsatz dieser heutzutage von besonderer Bedeutung (32). Eine labordiagnostische Untersuchung inklusive Antibiotogramm der Milch von an Mastitis erkrankten Kühen ist unbedingt durchzuführen, um eine entsprechende Therapiewahl treffen zu können (27). Lokal sollten nur betroffene Euterviertel behandelt werden. Systemische Antibiose sollte nur dann eingesetzt werden, wenn es sich um einen Erreger handelt, der zur Generalisierung der Erkrankung neigt oder bereits eine systemische Allgemeinerkrankung vorliegt (31). Neben einer Medikamenten-basierten Behandlung mit NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs = nichtsteroidale Entzündungshemmer) und ggf. Antibiotika, ist auch das Melken des betroffenen Euterviertels ein wichtiger Teil einer erfolgreichen Therapie. In manchen Quellen werden auch Therapieschemata für bestimmte Erreger, sowie auch für die Behandlung auf Herdenebene bereitgestellt (27).

Es gibt einige Präventionsmaßnahmen, die sich bei der Verhinderung der Ausbreitung von Mastitiden bewährt haben. Am wichtigsten zu nennen wäre hierbei eine angemessene Melkhygiene, die unter anderem das ausreichende Reinigen der Euter und Zitzen oder auch das Tragen von Handschuhen während des Melkens beinhaltet (27). Da auch die Trockenstehperiode ein hohes Risiko für das Auftreten von Mastitiden mit sich bringt, stellt das richtige Trockenstellen der Tiere eine wirkungsvolle Maßnahme dar. Es wird empfohlen vor jedem Trockenstellen einen CMT und eine labordiagnostische Untersuchung der Milch durchzuführen, um Mastitiden frühzeitig zu erkennen und angemessen therapieren zu können (27,28).

#### **4.6. Somatische Zellzahl als Indikator der Eutergesundheit**

Bei Vorliegen einer Mastitis kommt es als Folge der Entzündungsreaktion dazu, dass die Blut-Milch-Schranke durchlässiger wird, und somatische Zellen in die Milch gelangen (27). Diese

somatischen Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und beinhalten Lymphozyten, Makrophagen und epitheliale Zellen. Die Anzahl an somatischen Zellen in der Milch ist somit ein geeigneter Indikator, um Rückschlüsse auf die Gesundheit des jeweiligen Euterviertels zu ziehen (41).

Die Ermittlung der somatischen Zellzahl ist ein einfaches Unterfangen, welches jedoch keinerlei Rückschlüsse auf die Ätiologie der Mastitis zulässt (31). Die simpelste, aber auch eine aufwändige Methode zur Bestimmung der Zellzahl, ist das Zählen der Zellen unter dem Mikroskop nach Färben der Probe mit Methylenblau (32). Erste Testsysteme, die marktauglich eingeführt wurden, sind der California Mastitis Test (CMT) und der Wisconsin Mastitis Test. Beide Systeme sind in der Lage mit einfachen und kostengünstigen Mitteln in kürzester Zeit Testergebnisse zu liefern (31). Jedoch weisen diese Methoden keine hohe Sensitivität und Spezifität auf. Eine genaue Bestimmung der Zellzahl ist damit auch nicht möglich (32). Modernere Geräte zur Bestimmung der Zellzahlen beruhen unter anderem auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie oder sind in der Lage Zellen bzw. Zellpartikel, die ein elektrisches Feld passieren, zu zählen (32,27).

Zu Beginn der Entwicklung einiger SCC-Systeme wurde versucht einen Schwellenwert zu ermitteln, ab welchem man von einer klinischen Mastitis sprechen konnte. Die zunächst vorgeschlagenen Schwellenwerte wichen weit voneinander ab. Nachdem einige Studien eine Zellzahl von  $< 100.000$  Zellen/ml in gesunden Eutervierteln feststellen konnten und auch nachgewiesen werden konnte, dass die durchschnittliche Zellzahl auch mit zunehmendem Alter physiologisch ansteigt, einigte man sich auf einen Grenzwert zwischen  $200.000$  und  $250.000$  Zellen/ml (31,41).

Auch der „LKV“ (Landeskontrollverband) führt bei seinen monatlichen Überprüfungen Probemelkungen durch, bei welchen auch die Zellzahl bei jeder Kuh einzeln gemessen wird. Dieser gibt die Zellzahl in der Milch von eutergesunden Tieren mit einem Wert von  $< 100.000$  Zellen/ml an (42). Die Qualität der Tankmilch wird in Österreich von der „AMA“ (AgrarMarkt Austria) neben der Bestimmung der Keimzahl durch die vorhandene Zellzahl bestimmt. Das Ziel bestand darin, durch die Einführung eines Systems mit variablen Anpassungen im Milchpreis die Motivation für Investitionen in qualitätsverbessernde Maßnahmen zu steigern und gleichzeitig einen signifikanten Anstieg der Exportaktivitäten zu bewirken. Seit 1999 zählt Milch mit einer Zellzahl von  $\leq 250.000$  Zellen/ml zur „S-Klasse“ und damit zur höchsten Qualitätsstufe. Die 1. Stufe wird mit  $\leq 400.000$  Zellen/ml, die 2. Stufe mit  $> 400.000$  Zellen/ml

definiert

(43).

Die Ermittlung der SCC kann ebenfalls in der Prävention von Mastitiden eine große Rolle spielen. Das Trockenstellen der Kühe sechs bis acht Wochen vor der Geburt stellt einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung von Mastitiden dar. Aufgrund der Tatsache, dass die Tiere im Zuge dieses Vorganges nicht mehr gemolken werden, werden damit auch die Bakterien, die sich ggf. im Euter befinden, nicht mehr regelmäßig ausgeschwemmt. Dadurch kann es zu einem Überwuchern der Bakterien im Euter und damit zur Bildung einer Mastitis kommen. Die Bestimmung der Zellzahl ist eine einfache Methode, um den Gesundheitsstatus des Euters vor dem Trockenstellen zu ermitteln und bei Bedarf eine Therapie einzuleiten (28).

#### **4.7. Zusammenhang zwischen Mastitis und Parität**

Mit steigender Parität erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Milchkuh an Mastitis zu erkranken (33,44,45,46). Ursächlich dafür könnten die physiologischen Veränderungen des Euters, die dem Alter bzw. der Häufigkeit der Laktation geschuldet sind, auftreten. Tendenziell gewinnt das Euter im Laufe des Lebens einer Milchkuh an Größe zu. Auch die Länge und Form der Zitzen verändert sich (33,44). Dies könnte zu vermehrten traumatischen Verletzungen, wie beispielsweise Quetschverletzungen der Zitzen durch das Drauftreten von anderen Kühen führen, aber auch zum Laufenlassen von Milch oder zu Schwierigkeiten beim maschinellen Melkvorgang (33).

In einer Studie von Yu et al. (2011) wurden neben Milch- auch Blutproben von primiparen und multiparen Kühen miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass mit steigender Parität auch der Anteil an Makrophagen und polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten im Blut anstieg, während der Anteil an Lymphozyten kleiner wurde. Das könnte bedeuten, dass der fortschreitende Anstieg der SCC mit zunehmender Parität mit Immunmechanismen zusammenhängt, die ohne das Vorhandensein einer Infektion wirken, da die Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in der Milchdrüse produziert werden. Die Untersuchung der Veränderung der Verhältnisse von Leukozyten zur SCC könnte eine sinnvolle Methode darstellen, um den Gesundheitsstatus der Milchdrüse bei Kühen genauer nachvollziehen zu können und ein besseres Verständnis für die Entstehung von einer erhöhten SCC bei multiparen Kühen zu erlangen (46).

Auch die Entstehung verschiedener metabolischer Dysbalancen steht in engem Zusammenhang mit der Parität (33,47). Ketose entsteht häufiger bei multiparen Kühen, da die

Milchleistung dieser im Vergleich zu primiparen Kühen deutlich höher ist. Außerdem können auch vorangegangene Erkrankungen, wie beispielsweise Metritis, das Risiko für eine klinische Ketose erhöhen. Da diese Erkrankungen meistens mit Geburten assoziiert sind, ist es demnach auch naheliegend, dass multipare Kühe mit höherer Wahrscheinlichkeit daran erkranken (33). Kühe höheren Alters weisen häufiger eine Hypokalzämie auf. Grund für die höhere Anfälligkeit für Hypokalzämie ist unter anderem der bei älteren Tieren beeinträchtigte Vitamin-D-Metabolismus, der eine große Rolle für den Transport von Kalzium spielt. Auch die Ausschüttung von Serotonin, welches die Ausschüttung von PTH (Parathormon) in der Milchdrüse stimuliert, ist bei multiparen Kühen geringer als bei primiparen. Multipare Kühe produzieren außerdem Kalzium-reicheres Kolostrum und Kalzium-reichere Milch als primipare Kühe, was wiederum den Kalziumplasmaspiegel senkt. Hypokalzämie verursacht eine Schwächung des Immunsystems, sowie auch eine verminderte Kontraktibilität der Muskulatur, welche auch die Muskulatur des Strichkanals beinhaltet. Diese Tatsache bietet eine mögliche Erklärung für das häufigere Aufkommen von Mastitiden (33).

Die weitere Erforschung von gewissen Krankheiten in Zusammenhang mit Parität und anderen Faktoren könnte in Zukunft Tierärzt\*innen und Tierhalter\*innen dabei unterstützen möglichst präventiv Maßnahmen zu treffen, um das Auftreten bestimmter Krankheiten zu verhindern. Das Wissen, um die Wahrscheinlichkeit, dass bestimmte Krankheiten in gewissen Lebenslagen der Kuh gehäuft auftreten, könnte dabei helfen sie schneller zu erkennen und dementsprechend rascher einschreiten zu können.

#### **4.8. Effekt von Antibiotika auf (Milch-) Mikrobiome**

Der Einsatz von Antibiotika zur Behandlung bakteriell-bedingter Erkrankungen ist entscheidend für die Bekämpfung von Infektionen. Schon kurz nachdem sie ihren Weg in die Medizin fanden, galten sie als eines der effektivsten Medikamente und verminderten die allgemeine Morbidität und Mortalität deutlich (48). Wiederholte antibiotische Behandlungen oder auch das Aufnehmen von antibiotischen Rückständen mit der Nahrung trägt neben der Schwächung des körpereigenen Mikrobioms auch zur Bildung von Antibiotikaresistenzen bei (48). Diese Resistenzen bilden eine weltweite Bedrohung für die moderne Medizin und damit auch ein hohes Risiko für die allgemeine Gesundheit der Bevölkerung (49).

Die antibakteriellen Wirkstoffe greifen nicht nur pathogene Keime an, sondern auch die natürlich vorhandenen Bakterien im Körper. Das hat zur Folge, dass die Symbiose von Wirt und physiologischem Mikrobiom gestört ist und es zur Dysbiose kommt. Die negative

Auswirkung auf beispielsweise das Darmmikrobiom und damit verbunden auf die Immunität des Wirtes sind von großer Bedeutung (48). Diese Tatsache wird auch anhand des in Kapitel 4.1 genannten Beispiels für Dysbiosen des GIT verdeutlicht. Der therapeutische oder prophylaktische Einsatz von Antibiotika reduziert oder eliminiert das kommensale Mikrobiom des Wirtes. Diese Entwicklung erlaubt es anderen mikrobiellen Spezies sich weiter zu verbreiten. Die dabei zustande kommende Dysbiose kann Einfluss auf die Regulation des Immunsystems nehmen (48).

Häufig wird zu Beginn der Trockenstehperiode das Euter intramammär mit Antibiotika behandelt (7). Das soll die Entstehung von Mastitis während der Trockenstehzeit prophylaktisch verhindern. Die Anwendung von Antibiotika kann sich jedoch auch negativ auf die Zusammensetzung des Milch-Mikrobioms auswirken, was wiederum großen Einfluss auf die Eutergesundheit haben kann (7,15). Ähnlich wie bei anderen Mikrobiomen eines Organismus ist auch hier davon auszugehen, dass die mögliche Verkleinerung der mikrobiellen Vielfalt bzw. entstehende Dysbiose durch den Einsatz von Antibiotika das Risiko für die Entstehung von Mastitiden erhöht (15). Die intramammäre Anwendung von Antibiotika auf gesunde Euterviertel könnte außerdem den Pool an antimikrobiell resistenten Genen weiter vergrößern (7). Aufgrund dieser negativen Auswirkungen der großzügigen Antibiotika-Anwendung versuchen immer mehr Länder das Prinzip des selektiven Trockenstellens in Betrieben zu etablieren (7,31).

#### **4.9. Ziele und Hypothesen**

Ziel dieses Projektes ist die Bestimmung der bakteriellen Abundanz, Zusammensetzung und Diversität der ersten Kolostralmilch (< 12 Stunden *post partum*) in der frühen Laktation bei Fleckviehkühen in Stallhaltung. Außerdem stellt auch die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Abundanz von Bakterien-Populationen in der ersten Kolostralmilch mit der Zellzahl, der Parität sowie der Anamnese von Mastitis und Antibiotika-Anwendung in der frühen Laktation eines der Ziele dieses Projektes dar. Ebenso sollen auch die enthaltenen Bakterien identifiziert werden und das Diversitäts-Level abgeschätzt werden. Diese sollen als Marker für das Auftreten von erhöhten Zellzahlen und Mastitis in der frühen Laktation verwendet werden können.

Folgende Hypothesen wurden vorab für dieses Projekt aufgestellt:

H1: Eine höhere Mikrobiom-Diversität in der ersten Kolostralmilch geht mit einer geringeren Zellzahl der Milch in der frühen Laktation einher (erste 2 Monate).

H2: Das Mikrobiom der Kolostralmilch von Kühen höherer Parität ist weniger divers als das von primiparen Kühen.

H3: Mastitis ist mit einer geringeren Mikrobiom-Diversität der ersten Kolostralmilch assoziiert.

H4: Das Vorkommen von Mastitis in der Früh-laktation ist durch eine geringere Anzahl an Milchsäurebakterien im Kolostrum gekennzeichnet.

## 5. MATERIAL UND METHODEN

### 5.1. Versuchsplan

Für die Durchführung dieses Projektes wurden insgesamt 16 Fleckviehkühe, die zur „VetFarm“ der Veterinärmedizinischen Universität Wien gehören, nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Es wurde also bei der Auswahl der Versuchstiere nicht auf spezielle Eigenschaften des Tieres geachtet, sondern es wurden jene Kühe ausgewählt, die zeitlich am nächsten abgekalbt haben. Die besagten Tiere wurden unter den dort herrschenden Standardbedingungen im Stall untergebracht, welche im Folgenden kurz beschrieben werden. Die Studie zu den Fleckviehkühen gehört dem Projekt "Entwicklung des Verdauungssystems, Gesundheit, Leistung und Hitzestress bei Kälbern", das von der Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien geprüft und befürwortet sowie vom Bundesminister für Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMBWF) gem. §§ 26ff. Tierversuchsgesetz 2012 genehmigt wurde (GZ: 2023-0.300.442).

Die Rinderherde am Betrieb „Kremesberg“ besteht aus ca. 80 Milchkühen. Die Rinder sind in einem Laufstall mit Tiefstreu-Liegeboxen und einem Spaltenboden untergebracht. Außerdem stehen den Tieren auch umzäunte Außenflächen, ebenfalls auf Spaltenboden, und im Sommer Weiden zur Verfügung. Die Tiere werden mit einer AGR (Aufgewertete Grundration) gefüttert, die Kraftfutterzuteilung erfolgt je nach Laktationsstadium mittels Transponder. Zwei Mal täglich werden die Kühe vom Stallpersonal im Melkstand gemolken. Es handelt sich hierbei um einen Tandem-Melkstand, welchen die Tiere freiwillig nach Vorlage einer kleinen Menge Kraftfutter betreten. Die eigentliche Melkung erfolgt mittels maschinellem Melkzeug nach feuchter, sowie trockener Reinigung der Zitzen. Nach dem Melken werden die Zitzen mit einer Jod-Lösung gedippt.

Im Zuge dieses Projektes wurden von den Versuchstieren an drei Zeitpunkten (Tagen) aseptische Milchproben entnommen. Bis auf die erste Kolostralmilch wurden diese Proben zu den regulären Melkzeiten im Melkstand genommen, um zusätzlichen Stress für die Tiere zu vermeiden. Als Proben wurden die erste Kolostralmilch (Tag 1 = Tag der Geburt), und Milchproben (an Tag 14 und Tag 28 *post partum*) von jedem Viertel genommen. Bei den Proben der ersten Kolostralmilch wurde das Mikrobiom untersucht. Die Bestimmung der Zellzahl wurde in allen drei Proben durchgeführt.

Um Daten bezüglich Parität, früherem Antibiotikaeinsatz und zur Mastitisgeschichte der letzten und aktuellen Laktation zu erhalten, wurde auf das Veterinärregister des Rinderbetriebs der „VetFarm“ zurückgegriffen. Hierbei ist der Begriff „Antibiotikaeinsatz“ so zu verstehen, dass

jede Verabreichung von antibiotischen Wirkstoffen gezählt wird. „Mastitisgeschichte“ beinhaltet alle Aufzeichnungen von klinischen Mastitiden, die im Veterinärregister dokumentiert sind.

## **5.2. Probenahme**

Die Milchproben wurden zwischen Juni und Dezember 2023 genommen. Im Vorfeld wurde jedes Versuchstier mit einer Nummer versehen, sodass eine einfachere Unterscheidbarkeit zwischen den Tieren möglich wurde. Für jede Kuh wurden Probenröhrchen beschriftet, auf denen die Nummer der Kuh, das beprobte Euterviertel, sowie auch der Tag der Probennahme (Tag 1, 14 oder 28) zu lesen waren. Das erste Kolostrum wurde innerhalb von drei Stunden nach der Geburt genommen. Die Rohmilchproben wurden zu den für die „VetFarm“ üblichen Melkzeiten genommen. Pro Zeitpunkt der Probennahme wurden jeweils vier sterile Cryoröhrchen für jedes Euterviertel mit einem Fassungsvermögen von 1,8 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vorbereitet. Ebenfalls wurden verschließbare 13 mL-Probengefäße aus Polypropylen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit den Ziffern 1–4 beschriftet, um auch Proben für die somatische Zellzahlbestimmung gewinnen zu können. Die für das Probennehmen zuständige Person trug während der Ausübung dieser Tätigkeit zum Zeitpunkt der Probennahme stets Nitril-Handschuhe und die Probennahmen wurden steril durchgeführt. Die Probenröhrchen wurden in einem Test-Tube-Rack der Reihe nach sortiert platziert.

Wie bereits im Punkt 4.1. „Versuchsplan“ erwähnt, wurden die Proben zu den üblichen Melkzeiten im Melkstand genommen. Die Kühe betreten freiwillig nach Vorlage von Krafffutter den Melkstand und werden durch automatisch schließende Türen in diesem fixiert.

Das Euter wurde zunächst von grobem Schmutz befreit. Im Anschluss daran wurden die Zitzen zuerst mit angefeuchteten Papiertüchern, anschließend mit einem trockenen Papiertuch gereinigt. Hierbei wurde für jede Zitze jeweils eigene Tücher verwendet. Da aus den Kolostrumproben DNA für die Sequenzierung extrahiert werden soll, wurden zusätzliche Maßnahmen ergriffen, um sicherzustellen, dass keine kontaminierten Kolostrumproben mit der konventionellen Handmelk-Technik gemäß Lima et al. (2017), Dahlberg et al. (2020) und Vasquez et al. (2022) gesammelt werden. Im nächsten Schritt wurden die Zitzen, insbesondere der Strichkanal, mit Gaze-Kompressen, die in 70%iger Ethanollösung getränkt wurden, gründlich desinfiziert. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis kein sichtbarer Schmutz mehr auf dem Zitzenende und der Gaze vorhanden waren. Hierbei wurde eine stricke Reihenfolge eingehalten, um eine erneute Kontamination der Zitzen durch Berührung

zu verhindern. Wird die Kuh von der rechten Seite gemolken, wäre dies folgende Reihenfolge: links hinten, links vorne, rechts hinten, rechts vorne. Bei einer Probennahme von links geschieht dies in umgekehrter Reihenfolge (50).

Die Proben wurden aseptisch auf der Ebene des Milchviertels mit der konventionellen Handmelk-Technik genommen (19,51,52). Nach ausreichender Reinigung und Desinfektion des Euters, der Zitzen und der Strichkanäle, wurden von jedem Viertel drei handgemolkene Spritzer Milch verworfen. Danach wechselte die für die Probennahme zuständige Person die Handschuhe und desinfizierte diese mit einer 70%igen Ethanolösung. Die Proben wurden von Hand aus dem Euter gemolken. Um sicherzustellen, dass bei der Probennahme keine Verwechslungen zwischen den Eutervierteln stattfinden konnten, wurde auch hier eine strenge Reihenfolge beachtet. Begonnen wurde immer mit dem linken kranialen Viertel des Euters, dann wurde die Reihenfolge im Uhrzeigersinn fortgesetzt (linkes kraniales Viertel = 1/4, rechtes kraniales Viertel = 2/4, rechtes kaudales Viertel = 3/4, linkes kaudales Viertel = 4/4).

Zunächst wurden für jedes Viertel jeweils vier 1,8-mL-Kryoröhrchen befüllt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass aus jedem Viertel etwa die gleiche Menge entnommen wurde. Zuletzt wurden von jedem Euterviertel Proben für die Bestimmung des Zellgehalts genommen. Dafür wurden jeweils etwa 10 mL Milch aus jedem Viertel entnommen. Die Proben zur Zellzahlbestimmung wurden bis zur Analyse auf Eis bei +4 °C für weniger als 30 Minuten gelagert. Die Milchproben wurden 15–25 Mal durch langsames Schwenken der Probenröhrchen gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erhalten.

Alle Proben, mit Ausnahme der Proben für die Zellzahlbestimmung, wurden unmittelbar nach der Probennahme in Eis gelagert und schnellstmöglich zur -80 °C-kalten Gefriertruhe zur Lagerung gebracht. Der Transfer der Proben an den Campus für die Analysen erfolgte auf Trockeneis, wo die Proben wiederum bei -80 °C gelagert wurden.

### **5.3. Bestimmung des Zellzahlgehaltes**

Zur Bestimmung des Zellgehaltes der Milchproben wurde ein elektrisches Zellmessgerät verwendet (DeLaval CellCounter (DCC), DeLaval®, Schweden). Dieses Instrument erfasst die Zellkerne, die mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs "Propidiumjodid" in einer Kammer gefärbt werden (27). Dieses Verfahren wurde unmittelbar nach der Probennahme durchgeführt. Die Milchproben wurden 15–25 Mal durch langsames Schwenken der Probenröhrchen gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erhalten.

Nach Inbetriebnahme des Gerätes, wurden die beschrifteten Röhren der Reihe nach geöffnet. Mittels der zum DCC gehörenden Kassetten wurden daraus Proben für die Zellzahlbestimmung entnommen. Anschließend wurden die Kassetten in das dafür vorgesehene Fach gesteckt und der Zählvorgang gestartet. Dieser Vorgang dauerte eine Minute. Das Resultat wurde anschließend in einer Liste eingetragen.

#### **5.4. DNA-Extraktion und quantitative PCR**

Für die DNA-Extraktion wurden die Kolostrumproben vier Minuten bei 4.000 x g zentrifugiert, um die Fettschicht von der restlichen Probe zu trennen. Die Fettschicht wurde entfernt. Das entfettete Kolostrum wurde für die DNA-Extraktion verwendet. Die gesamte DNA wurde aus 350 mg der entfetteten Kolostrumprobe unter Verwendung des DNeasy PowerSoil Pro Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit einigen Modifikationen des Protokolls des Herstellers extrahiert. Zu den Modifikationen gehörte ein zusätzlicher Heizschritt für zehn Minuten bei 70 °C und die Homogenisierung der Proben unter Verwendung des SpeedMill Plus Systems (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland). Das SpeedMill-Protokoll umfasste drei Zyklen von jeweils einer Minute mit einer ein-minütigen Pause zwischen den Zyklen. Die DNA-Konzentration in jedem Eluat wurde mit dem Qubit DNA HS Assay Kit auf dem Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) quantifiziert. Die absolute Quantifizierung der Gesamtbakterien wurde auf einem qTOWER Real-Time PCR-System (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) unter Verwendung eines zuvor publizierten Primersets und Amplifikationsbedingungen (Tabelle 2; Metzler-Zebeli et al. 2023) durchgeführt. Das Gesamtreaktionsvolumen von 10 µL bestand aus 0,5 ng DNA, 2,5 µL innuMIX qPCR DSGreen Standard (Analytik Jena GmbH), 300 nM jedes der Forward- und Reverse-Primer und DEPC-behandeltem Wasser (G-Biosciences, St. Louis, MO, USA) in einer 96-Well-Platte. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C für zwei Minuten wurden 40 Zyklen von 95 °C für 30 Sekunden und Primer-Annealing und -Elongation bei 60 °C für 60 Sekunden durchgeführt. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit einer Erhöhung um 0,1 °C/s von 55–95 °C durchgeführt, wobei die Fluoreszenzmessung in 0,1 °C-Intervallen erfolgte. Standardkurven wurden durch serielle Verdünnungen ( $10^{10}$  bis  $10^3$  Moleküle/µl) der gereinigten und quantifizierten PCR-Produkte erstellt, die mit gepoolter DNA aus den Kolostrumproben erzeugt wurden. Standards wurden in dreifacher Ausführung auf derselben Platte durchgeführt, während Proben und negative Kontrollen ohne Template-DNA in doppelter Ausführung eingeschlossen wurden. Die endgültigen Genkopienzahlen der Gesamtbakterien pro Gramm Kolostrumprobe wurden mit der folgenden Gleichung berechnet:

$(QM \times C \times DV)/(S \times V)$ , wobei QM das quantitative Mittel der Kopienzahl, C die DNA-Konzentration jeder Probe, DV das Verdünnungsvolumen der extrahierten DNA, S die zur Analyse verwendete DNA-Menge (ng) und V das Gewicht der zur DNA-Extraktion verwendeten Probe (g) war.

### **5.5. 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung und Bioinformatik**

Die bakterielle taxonomische Zusammensetzung wurde in allen Kolostrumproben untersucht. Zu diesem Zweck wurden die V3-V4-Hypervariablen Regionen des bakteriellen 16S-rRNA-Gens unter Verwendung eines Paar-End-Protokolls (Novogene, Cambridge, Vereinigtes Königreich) amplifiziert. Die gezielte 16S-rRNA-(V3-V4-Hypervariable Region)-Sequenzierung wurde in einem externen Labor (Novogene, Cambridge, UK) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Aliquots der DNA-Extrakte für die Bibliotheksvorbereitung (NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit, Illumina, San Diego, CA, USA) gesendet. Das 16S-rRNA-Amplikon wurde unter Verwendung der Primer 341F-ill (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') und 802R-ill (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') amplifiziert. Equimolare Pools von Proben wurden sequenziert, um 250 bp Paar-End-Rohdaten auf der Novaseq 6000-Plattform (Illumina) zu erzeugen. Die Demultiplexierung und das Trimmen der Rohsequenzen wurde von Novogene durchgeführt. Die bioinformatische Analyse wurde gemäß dem in Metzler-Zebeli et al. (2023) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Kurz gefasst wurden Rohsequenzdaten (Fastq-Dateien) unabhängig verarbeitet, ausgerichtet und kategorisiert unter Anwendung des Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2; Version 1.26.0) (52), welches in RStudio (Version 1.4.1106) durchgeführt wurde. Zunächst wurden die Qualitätsprofile der Forward- und Reverse-Sequenzen bewertet. Anschließend wurde die Gesamtlänge der Sequenzen auf 220 (Forward-Sequenzen) und 210 Nukleotide (Reverse-Sequenzen) mit einer maximalen Fehlerrate von 5 für beide, Forward- und Reverse-Sequenzen, geschnitten, um die Degradation des Qualitätswerts der verbleibenden Nukleotide zu berücksichtigen, mittels der Funktion filterAndTrim. Zweideutige Sequenzen und Sequenzen, die den geschätzten Fehler von fünf Nukleotiden überschreiten, wurden aus dem Amplikon-Set entfernt. Nach der Dereplikation der gefilterten Daten und der Schätzung der Fehlerraten wurden Amplikon-Sequenzvarianten abgeleitet (53). Anschließend wurden die abgeleiteten Forward- und Reverse-Sequenzen zusammengeführt, paarige Sequenzen, die nicht perfekt übereinstimmen, wurden entfernt, um gegen verbleibende Fehler zu kontrollieren, und die Sequenztabelle wurde erstellt. Dann wurden die Sequenzlesungen gefiltert und Chimären wurden mit dem Befehl removeBimeraDenovo eliminiert. Anschließend wurde die Taxonomie

unter Verwendung der SILVA 138.1 ribosomalen RNA (rRNA) Datenbank für Bakterien (54) mit einem 3 %-Dissimilaritätsschwellenwert zugeordnet. Die Alpha-Diversität (Shannon, Simpson, Beobachtete Amplikon-Sequenzvarianten (ASV)) wurde unter Verwendung von phyloseq (Version 1.42.0) bestimmt. Die Beta-Diversitätsanalyse wurde durch statistische Auswertung der Dissimilaritätsmatrizen (Bray-Curtis) mit der Funktion adonis2 im R-Paket vegan (Version 2.6.4) (55) durchgeführt. Auf Gattungsebene wurden die Sequenzen der verschiedenen bakteriellen Taxa aufsummiert und als Proportion der Gesamtsequenzen pro Probe dargestellt.

## 5.6. Statistische Analyse

Bei den Bakterien wurden die Gattungen mit einer relativen Häufigkeit von  $> 0,1\%$  aller Sequenzen statistisch analysiert. Die relativen Häufigkeiten wurden in SAS analysiert. Die SCC, die Genkopienzahlen der Gesamtbakterien und die Alpha-Diversitätsindizes wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung der PROC MIXED von SAS (Statistical Analysis System 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, NC, Vereinigte Staaten) analysiert. Die Residuen der Daten wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft. Das erste Modell umfasste den festen Effekt des Viertels und der Parität. Das zweite Modell umfasste den festen Effekt der linken/rechten Seite und der Parität. Der Zufallseffekt war die Parität. Die Option der Wahrscheinlichkeitsdifferenz wurde verwendet, um nachträgliche paarweise Vergleiche zwischen den kleinsten Quadratenmittelwerten durchzuführen. Die Bonferroni-Korrektur wurde angewendet, um die rohen P-Werte für die relativen Häufigkeiten der bakteriellen Gattungen anzupassen (adjustierte P-Werte). Die Daten wurden als Mittelwerte der kleinsten Quadrate  $\pm$  Standardfehler ausgedrückt und Signifikanz wurde bei  $P \leq 0,05$  definiert. Trends wurden bei  $P < 0,1$  definiert. Korrelationen mit  $r < 0,49$  wurden als „schwach“ gewertet. Lag  $r$  zwischen 0,5 und 0,69 wird von einer „mittleren“ Korrelation gesprochen. Mit Werten von  $r > 0,7$  wurde eine starke Korrelation beschrieben. Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (NMDS), sowie die permutative multivariate Varianzanalyse (PERMANOVA), beide basierend auf der Bray-Curtis-Distanz, wurden verwendet, um die Beta-Diversität im veganen R-Paket (Version 2.6.4) (55) zu bewerten. Speziell wurden die zweidimensionalen NMDS-Ordinationsdiagramme basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilaritätsmatrix (`metaMDS`-Funktion) verwendet, um das Clustering des Mikrobioms nach Kolostrumproben zu untersuchen und wurden unter Verwendung des `ggplot2`-Pakets visualisiert (56). Die statistische Signifikanz wurde nach 999 zufälligen Permutationen berechnet. Pearson-Korrelationsanalysen wurden zwischen den am häufigsten vorkommenden bakteriellen

Gattungen im Kolostrum, SCC, dem Auftreten von Mastitis und Antibiotikabehandlungen im Leben, der letzten Laktation und der aktuellen Laktation, falls vorhanden, unter Verwendung von PROC CORR in SAS durchgeführt. Die deskriptive Statistik wurde mittels der PROC MEANS Prozedur in SAS erstellt.

## 6. ERGEBNISSE

Für dieses Projekt wurden die Parameter SCC, Antibiotika-Verabreichung im Laufe des Lebens und während der letzten und aktuellen Laktation, sowie Mastitis-Diagnosen im Laufe des Lebens und während der letzten und aktuellen Laktation untersucht. Ebenfalls wurden mittels 16S-RNA-Sequenzierung die vorkommenden Mikroben in der Milch ermittelt.

### 6.1. Antibiotika-Behandlungen und Mastitis-Diagnosen der Kühe im Verlauf der aktuellen und vorausgegangenen Laktation

Tabelle 1: Erhobene Daten aus den Krankheitsgeschichten der Versuchstiere

Kuhnummer	Parität	AB-Leben	AB-letzte Laktation	AB-aktuelle Laktation	Mastitis-Leben	Mastitis-letzte Laktation	Mastitis-aktuelle Laktation
LB1	1	0	0	0	0	0	0
LB2	2	3	0	2	2	0	2
LB3	1	0	0	0	0	0	0
LB4	3	3	0	0	0	0	0
LB5	4	5	1	0	0	0	0
LB6	3	1	0	0	0	0	0
LB7	5	4	2	0	0	0	0
LB8	1	0	0	0	0	0	0
LB9	8	8	1	1	2	0	0
LB10	2	2	0	1	1	0	1
LB11	8	8	1	1	2	1	0
LB12	1	0	0	0	0	0	0
LB13	2	3	2	0	1	1	0
LB14	3	5	1	0	1	0	0
LB15	4	5	1	0	3	1	0
LB16	2	0	0	0	0	0	0

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Versuchstiere dieses Projektes und die Anzahl der Paritäten, der Antibiotika-Anwendung im Leben, in der letzten und in der aktuellen Laktation, sowie Mastitis im Leben, in der letzten und in der aktuellen Laktation (siehe Tabelle 1). Die deskriptive Statistik in Bezug auf die von uns untersuchten Parameter ist Tabelle 2 zu entnehmen. Da es für ein Tier keine Daten für einige Parameter gab, gilt für die SCC-Daten n=63, für die übrigen Daten n=64 (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Deskriptive Statistik der Daten für somatische Zellzahlen, Antibiotikabehandlungen und Mastitiden

Variable	n	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Summe	Minimum	Maximum
<b>SCC Tag1</b>	63	624,80	954,50	664,53	39365	3	3114
<b>SCC Tag14</b>	63	119,60	136,50	307,94	7535	1	1869
<b>SCC Tag28</b>	63	47,60	92,50	109,22	3002	1	775
<b>AB-Leben</b>	64	2,90	4	2,68	188	0	8
<b>AB-letzte Laktation</b>	64	0,56	0,50	0,71	36	0	2
<b>AB-aktuelle Laktation</b>	64	0,31	0,50	0,59	20	0	2
<b>Mastitis-Leben</b>	64	0,30	0,50	0,55	19	0	2
<b>Mastitis-letzte Laktation</b>	64	0,08	0	0,27	5	0	1
<b>Mastitis-aktuelle Laktation</b>	64	0,08	0	0,32	5	0	2

Quelle: eigene Darstellung

In Bezug auf Mastitis konnte festgestellt werden, dass die Häufigkeit, mit welcher ein Euterviertel im Laufe des Lebens einer Milchkuh an Mastitis erkrankt, sich signifikant unterscheidet. Die uns vorliegenden Daten wiesen darauf hin, dass das linke kaudale Euterviertel am häufigsten von Mastitis betroffen war, dicht gefolgt vom linken kranialen Viertel. Genauer beschrieben unterschied sich die Anzahl der Mastitis-Erkrankungen zwischen dem linken kranialen und kaudalen Viertel signifikant von der Anzahl der rechten kranialen und kaudalen Viertel. Bei den Mastitiden in der aktuellen und in der letzten Laktation konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vierteln festgestellt werden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Mittelwerte der Anzahl der Mastitis-Diagnosen pro Euterviertel

	Viertel				SEM	P-Wert
	1	2	3	4		
<b>Mastitis-Diagnosen Leben (Anzahl)</b>	0,44a	0,06b	0,13b	0,56a	0,131	<0,001
<b>Mastitis-Diagnosen letzte Laktation (Anzahl)</b>	0,06	0,06	0,06	0,13	0,069	0,402
<b>Mastitis-Diagnosen aktuelle Laktation (Anzahl)</b>	0,19	0	0	0,13	0,080	0,143

Der SEM (Standardfehler des Mittelwerts, Standard Error of the Mean) gibt an, wie stark der Mittelwert der Stichprobe von dem wahren Mittelwert der Grundgesamtheit abweichen könnte. Er wird berechnet, indem die Standardabweichung durch die Wurzel der Stichprobengröße dividiert wird.  
Quelle: eigene Darstellung

## 6.2. Somatische Zellzahlen in Kolostrum und in der Milch vom 14. und 28. Laktationstag

Die statistische Auswertung der SCC zu jedem Zeitpunkt der Probennahme (Tag 1, 14 und 28) und auch vergleichend zwischen den vier Vierteln ergab, dass kein signifikanter Unterschied der Zellzahl zwischen den Vierteln festgestellt werden konnte (siehe Tabelle 4). Die Auswertung der Zellzahl-Daten ergab, dass die SCC auf der linken Euterseite tendenziell höher zu sein schien als auf der rechten Seite. Eine direkte signifikante Korrelation konnte jedoch nicht festgestellt werden (siehe Tabelle 5). Jedoch konnte an Tag 14 ein Trend festgestellt werden, da die Zellzahl in Viertel 1 (links kranial) und Viertel 4 (links kaudal) eine deutlich höhere Zellzahl aufwies als die übrigen Viertel (siehe Tabelle 4). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die somatische Zellzahl von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt sank. So lag beispielsweise der Median an Tag 1 bei 954,50, an Tag 14 bei 136,50 und an Tag 28 bei 92,50 (siehe Tabelle 2). Es konnte eine signifikante mittlere Korrelation zwischen der SCC und der Verabreichung von Antibiotika in der letzten Laktation an Tag 1 festgestellt werden, sowie eine schwache Korrelation zwischen SCC und Antibiotika-Anwendung im gesamten Leben. Die Messungen an Tag 14 konnten signifikant mit einer Antibiotika-Anwendung in der aktuellen Laktation, sowie mit Mastitis-Diagnosen im Laufe des ganzen Lebens und im Laufe der aktuellen Laktation in Zusammenhang gebracht werden. Auch zum dritten Zeitpunkt der Probennahme, Tag 28, ließen sich die Zusammenhänge in Bezug auf Antibiotika-Verabreichung in der aktuellen Laktation und Mastitis in der aktuellen Laktation feststellen, jedoch nicht in Bezug auf alle Mastitis-Diagnosen im Leben der Kühe (siehe Tabelle 6).

Tabelle 4: Mittelwerte der SCC pro Euterviertel

Zeitpunkt	Viertel				SEM	P-Wert
	1	2	3	4		
Tag 1/Geburt (Kolostrum)	690	456	687	785	196,9	0,190
Tag 14	274a	45b	32b	127ab	78,8	0,058
Tag 28	42	32	17	86	28,1	0,330

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, Standard Error of the Mean

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 5: Vergleich SCC der linken und rechten Euterseite

	Linke Seite	Rechte Seite	SEM	P-Wert
SCC	736	572	181,6	0,141

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, Standard Error of the Mean

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 6: Korrelationen zwischen SCC in Kolostrum und Milch und AB-Gebrauch bzw. Mastitis

n=63		AB-Leben	AB-letzte Laktation	AB-aktuelle Laktation	Mastitis-Leben	Mastitis-letzte Laktation	Mastitis-aktuelle Laktation
SCC Tag1	r	0,35	0,52		0,12	0,17	
	P-Wert	0,01	<0,001		0,34	0,18	
SCC Tag14	r	0,26	-0,01	0,42	0,41	-0,07	0,46
	P-Wert	0,04	0,97	0,00	0,00	0,59	0
SCC Tag28	r	0,13	-0,06	0,41	0,21	-0,06	0,30
	P-Wert	0,30	0,63	0,00	0,10	0,63	0,02

Quelle: eigene Darstellung

### 6.3. Alpha-Diversität

Die Untersuchung der Alpha-Diversität ergab, dass die Anzahl der vorkommenden Mikroorganismen in den unterschiedlichen Vierteln nicht signifikant voneinander abweicht. Auch wenn man das Euter in eine linke und eine rechte Hälfte unterteilt, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hälften feststellbar (siehe Tabelle 7). Ebenso konnte keine signifikante Korrelation zwischen der SCC und der Artenvielfalt festgestellt werden (siehe Tabelle 8). Außerdem lässt sich hierbei eine große Schwankungsbreite erkennen (siehe Tabelle 9). Die Verabreichung von Antibiotika im gesamten Leben, sowie in der letzten Laktation hatten ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf die Alpha-Diversität. Auch die

Mastitiden im gesamten Leben und in der letzten Laktation hatten keine signifikante Auswirkung auf die Artenvielfalt in der untersuchten Milch (siehe Tabelle 10). Auch hier ist eine große Schwankungsbreite erkennbar (siehe Tabelle 11).

Tabelle 7: Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen den Eutervierteln und der Euterseite

Viertel						
Diversitätsestimator	1	2	3	4	SEM	P-Wert
<b>Beobachtete Amplikonsequenzvarianten (ASV)</b>	79	52	55	118	1,3	0,098
<b>Shannon</b>	1,18	1,11	1,17	1,26	0,3	0,862
<b>Simpson</b>	0,35	0,31	0,33	0,34	0,0	0,972
Diversitätsestimator	Linke Seite	Rechte Seite	SEM	P-Wert		
<b>Beobachtete ASV</b>	96	54	1,3	0,024		
<b>Shannon</b>	1,22	1,14	0,2	0,798		
<b>Simpson</b>	0,34	0,32	0,04	0,675		

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 8: Korrelation zwischen SCC und Alpha-Diversität im Kolostrum

	n=63	Beobachtete ASV	Shannon	Simpson
<b>SCC</b>	<b>r</b>	-0,048	-0,11	-0,13
	<b>P-Wert</b>	0,71	0,39	0,32

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, Standard Error of the Mean

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 9: deskriptive Statistik zur Korrelation zwischen Alpha-Diversität und SCC

Variable	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Summe	Minimum	Maximum
SCC	63	624,84	664,50	39365	3	3114
Beobachtete ASV	63	129	216	8167	11	1188
Shannon	63	0,95	1,33	59,63	0,27	5,92
Simpson	63	0,30	0,23	18,85	0,13	0,99

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 10: Korrelationen zwischen Antibiotikaverabreichung und Alpha-Diversität und Mastitiden und Alpha-Diversität

		AB-Leben	AB-letzte Laktation	Mastitis-Leben	Mastitis-letzte Laktation
Beobachtete ASV	r	0,021	0,15	0,04	-0,08
	P-Wert	0,868	0,246	0,732	0,549
Shannon	r	-0,03	0,15	-0,04	-0,11
	P-Wert	0,821	0,242	0,774	0,384
Simpson	r	-0,06	0,10	-0,05	-0,14
	P-Wert	0,658	0,455	0,723	0,282

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 11: deskriptive Statistik zur Korrelation zwischen Alpha-Diversität und Mastitis

Variable	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Summe	Minimum	Maximum
Beobachtete ASV	63	129	216	8167	11	1188
Shannon	63	0,95	1,30	59,63	0,27	5,92
Simpson	63	0,30	0,20	18,85	0,13	0,99
AB-Leben	63	2,98	2,70	188	0	8
AB-letzte Laktation	63	0,57	0,70	36	0	2
Mastitis-Leben	63	0,30	0,60	19	0	2
Mastitis-letzte Laktation	63	0,08	0,30	5	0	1

Quelle: eigene Darstellung

#### 6.4. Beta-Diversität

Die Untersuchung der Beta-Diversität ergab, dass die einzelnen Viertel nur geringe Unterschiede in den vorkommenden Gattungen aufweisen. Auch hier war wieder eine starke Streuung ersichtlich (siehe Tabelle 12 und Abbildung 1). Bei Unterteilung des Euters in eine rechte und eine linke Seite, konnte festgestellt werden, dass die linke Seite eine höhere Artenvielfalt aufwies, wenn auch keine signifikanten Unterschiede in den relativen Abundanz der am meisten vorkommenden Gattungen feststellbar waren (siehe Abbildung 2). Tabelle 13 zeigt, dass der Faktor "Seite" nur einen sehr kleinen Anteil der Gesamtvariabilität erklärt und dieser Effekt statistisch nicht signifikant ist (p-Wert = 0.89).

Tabelle 12: Ergebnisse der PERMANOVA (Permutations-Varianzanalyse) - einzelne Viertel

Quelle	Df (Freiheitsgrade)	Quadratsumme	R <sup>2</sup>	F-Wert	p-Wert (Pr(<F))
Quartal	3	0,34	0,04	0,79	0,62
Residual	59	8,45	0,96		
Gesamt	62	8,79	1		
Stress	0,07				

Df: Freiheitsgrade; F: F-Wert durch Permutation. Die Analyse basiert auf der paarweisen Distanz eines multivariaten Datensatzes und die Werte wurden mithilfe von Summen der Quadrate vom Typ III mit 999 Permutationen der Residuen erhalten, wobei ein signifikanter Unterschied bei  $P \leq 0,05$  berücksichtigt wurde. Quelle: eigene Darstellung

Abbildung 1: Beta-Diversität der Bakteriengemeinschaften in den Eutervierteln (Q1-Q4). Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS), berechnet mit der Bray-Curtis-Distanz.

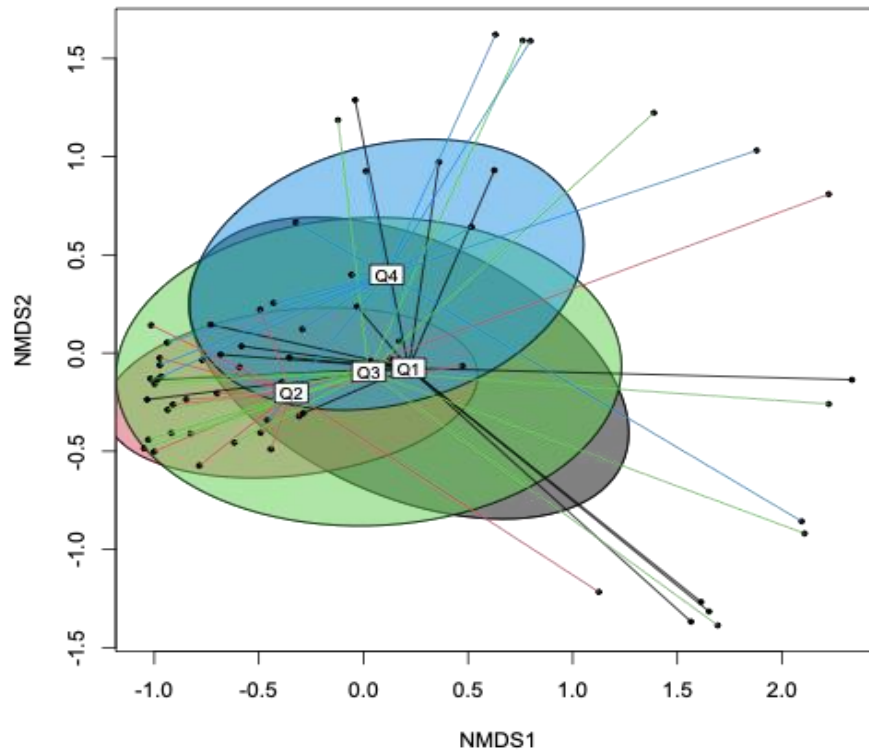


Abbildung 2: Beta-Diversität der Bakteriengemeinschaften in der linken und rechten Euterhälfte (L und R). Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS), berechnet mit der Bray-Curtis-Distanz.

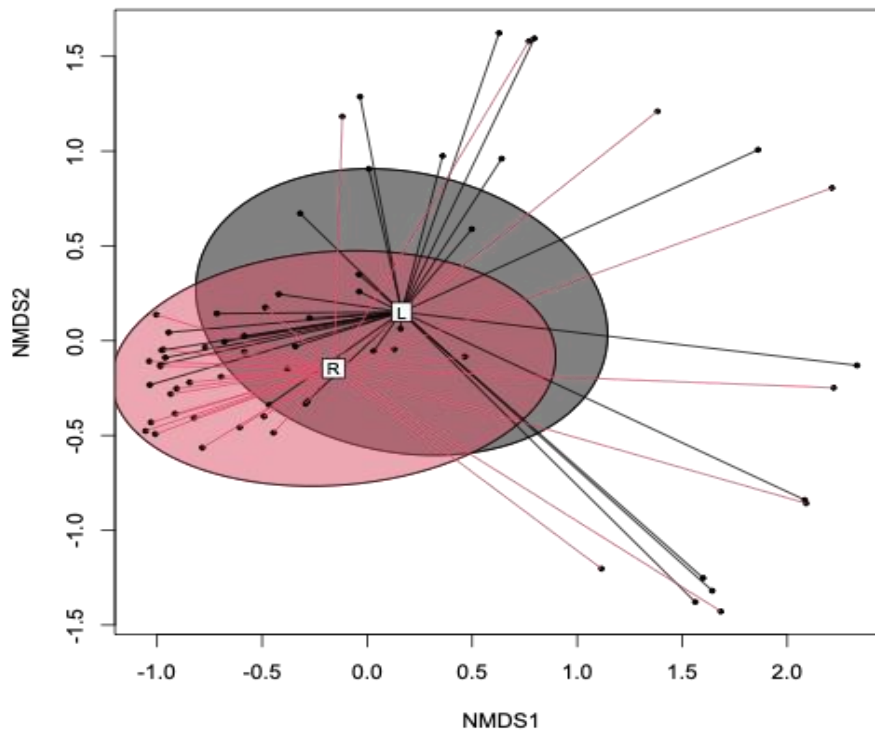


Tabelle 13: Ergebnisse der PERMANOVA (Permutations-Varianzanalyse) - Euterseiten

Quelle	Df (Freiheitsgrade)	Quadratsumme	R <sup>2</sup>	F-Wert	p-Wert (Pr(<F))
Seite	1	0,05	0,01	0,34	0,89
Residual	61	8,74	0,99		
Gesamt	62	8,79	1		

Df: Freiheitsgrade; F: F-Wert durch Permutation. Die Analyse basiert auf der paarweisen Distanz eines multivariaten Datensatzes und die Werte wurden mithilfe von Summen der Quadrate vom Typ III mit 999 Permutationen der Residuen erhalten, wobei ein signifikanter Unterschied bei  $P \leq 0,05$  berücksichtigt wurde. Quelle: eigene Darstellung

### 6.5. Nachgewiesene Gattungen und Korrelationen

Vier verschiedene Phyla und 15 Gattungen machten jeweils  $\geq 0,1\%$  aller Sequenzen aus (siehe Tabelle 14). Durch die Analyse der Abundanz konnte festgestellt werden, dass die Gattung *Delftia* am häufigsten vertreten war, gefolgt von *Stenotrophomonas* und *Methylobacterium Methylobacterium*. Zwischen den vier Eutervierteln konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der vorkommenden Gattungen festgestellt werden. Auch bei Unterteilung des Euters in eine rechte und eine linke Seite, konnten zwischen den Seiten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die genauen Daten der relativen Abundanz sind in Tabelle 15 und 16 ersichtlich.

Tabelle 14: Auflistung der nachgewiesenen Bakterien im Kolostrum

Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Methylobacterium</i> <i>Methylorubrum</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Staphylococcales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Planococcaceae</i>	<i>Solibacillus</i>
<i>Actinobacteriota</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospirales</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>UCG-005</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Actinobacteriota</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Cutibacterium</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Rikenellaceae-RC9-gut-group</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenellales</i>	<i>Christensenellaceae</i>	<i>Christensenellaceae-R-7-group</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcales-Tissierellales</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Romboutsia</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium</i>

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 15: relative Abundanz der nachgewiesenen bakteriellen Gattungen ( $\geq 0,1\%$  Abundanz aller Sequenzen) im Kolostrum pro Viertel

Gattung	Viertel				SEM	P-Wert
	1	2	3	4		
<i>Delftia</i>	69,49	81,13	75,03	85,06	8,8	0,523
<i>Stenotrophomonas</i>	7,45	8,69	8,09	9,42	1	0,397
<i>Methylobacterium_Methylorubrum</i>	8,09	6,02	1,37	0,92	4,1	0,512
<i>Staphylococcus</i>	0	0	9,42	0	3,6	0,122
<i>Streptococcus</i>	5,51	0	0	0	3,2	0,437
<i>Acinetobacter</i>	1,68	0	1,50	1,37	1,4	0,794
<i>Solibacillus</i>	0,39	0,03	0,40	0,90	0,5	0,688
<i>Corynebacterium</i>	0,37	0,13	0,12	0,47	0,3	0,784
<i>UCG-005</i>	0,15	0,28	0,011	0,01	0,2	0,670
<i>Sphingomonas</i>	0,41	0	0,45	0,08	0,3	0,506
<i>Cutibacterium</i>	0,21	0,17	0,04	0,01	0,1	0,593
<i>Rikenellaceae-RC9-gut-group</i>	0,11	0	0,33	0,01	0,2	0,588
<i>Christensenellaceae-R-7-group</i>	0,20	0,04	0,15	0,08	0,1	0,753
<i>Romboutsia</i>	0,19	0,05	0,13	0	0,1	0,751
<i>Sphingobacterium</i>	0,17	0	0,03	0,26	0,2	0,597

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, Standard Error of the Mean

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 16: relative Abundanz der nachgewiesenen bakteriellen Gattungen ( $\geq 0,1\%$  Abundanz aller Sequenzen) im Kolostrum pro Euterseite

Gattung	Linke Seite	Rechte Seite	SEM	P-Wert
<i>Delftia</i>	77	78,10	6,8	0,887
<i>Stenotrophomonas</i>	8,40	8,40	0,8	0,995
<i>Methylobacterium_Methylorubrum</i>	4,61	3,67	3	0,816
<i>Staphylococcus</i>	0	4,37	2,7	0,188
<i>Streptococcus</i>	2,72	0	2,4	0,307
<i>Acinetobacter</i>	1,53	0,73	1	0,552
<i>Solibacillus</i>	0,64	0,21	0,4	0,396
<i>Corynebacterium</i>	0,42	0,13	0,2	0,311
<i>UCG_005</i>	0,25	0,22	0,2	0,907
<i>Sphingomonas</i>	0,08	0,14	0,1	0,720
<i>Cutibacterium</i>	0,11	0,10	0,1	0,928
<i>Rikenellaceae_RC9_gut_group</i>	0,06	0,16	0,1	0,585
<i>Christensenellaceae_R_7_group</i>	0,14	0,10	0,1	0,692
<i>Romboutsia</i>	0,09	0,09	0,1	0,972
<i>Sphingobacterium</i>	0,21	0,02	0,1	0,194

SEM: Standardfehler des Mittelwerts, Standard Error of the Mean

Quelle: eigene Darstellung

Für dieses Projekt wurde ebenfalls untersucht, ob das Vorkommen der Gattungen mit der SCC korreliert. Außerdem wurde auch eine mögliche Korrelation zwischen den Gattungen und dem Vorkommen von Mastitis im gesamten Leben einer Kuh und dem Vorkommen von Mastitis während der letzten und der aktuellen Laktation untersucht. Ebenso wurde untersucht, ob ein Einsatz von Antibiotika im gesamten Leben einer Kuh und während der letzten Laktation Einfluss auf das Vorhandensein der vorkommenden Gattungen hat. Hierbei konnten nur sehr schwache Korrelationen entdeckt werden, deren Aussagekraft zu gering ist, um daraus signifikante Schlüsse ziehen zu können (siehe Tabelle 17). In Tabelle 18 ist die deskriptive Statistik für die Gattungen, den Antibiotikaeinsatz und die Mastitiden ersichtlich.

Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung der Korrelationen zwischen den bakteriellen Gattungen und den verschiedenen Parametern

Gattungen		AB-Leben	AB-letzte Laktation	Mastitis-Leben	Mastitis-letzte Laktation	Mastitis-aktuelle Laktation	SCC
<i>Delftia</i>	r	0,16	0,10	0,01	-0,19	0,11	0,01
	P-Wert	0,211	0,416	0,968	0,143	0,405	0,955
<i>Stenotrophomonas</i>	r	0,17	0,15	-0,09	-0,26	0,10	-0,01
	P-Wert	0,175	0,239	0,497	0,036	0,440	0,963
<i>Methylobacterium_Methylorubrum</i>	r	0,00	0,01	0,06	0,29	-0,07	-0,05
	P-Wert	0,997	0,934	0,649	0,019	0,602	0,697
<i>Staphylococcus</i>	r	-0,19	-0,14	-0,08	-0,04	-0,05	-0,08
	P-Wert	0,134	0,271	0,529	0,763	0,714	0,524
<i>Streptococcus</i>	r	-0,15	-0,10	-0,07	-0,04	-0,03	0,15
	P-Wert	0,255	0,414	0,578	0,765	0,802	0,228
<i>Acinetobacter</i>	r	0,02	0,02	0,12	0,19	-0,06	0,05
	P-Wert	0,880	0,859	0,332	0,135	0,654	0,718
<i>Solibacillus</i>	r	0,07	0,06	0,28	0,34	-0,05	0,04
	P-Wert	0,612	0,662	0,024	0,006	0,694	0,772
<i>Corynebacterium</i>	r	-0,04	-0,02	0,24	0,32	-0,06	-0,03
	P-Wert	0,771	0,852	0,057	0,010	0,648	0,808
UCG-005	r	0,07	0,06	-0,03	0,03	-0,06	0,11
	P-Wert	0,612	0,659	0,805	0,830	0,661	0,412
<i>Saccharopolyspora</i>	r	-0,16	-0,11	-0,06	-0,02	-0,04	-0,09
	P-Wert	0,214	0,377	0,650	0,879	0,780	0,485
<i>Sphingomonas</i>	r	-0,20	-0,15	-0,10	-0,05	-0,05	-0,13
	P-Wert	0,116	0,255	0,414	0,688	0,693	0,296
<i>Comamonas</i>	r	0,07	0,06	0,21	0,27	-0,06	0,06
	P-Wert	0,589	0,634	0,107	0,030	0,644	0,643
<i>Cutibacterium</i>	r	-0,26	-0,22	-0,13	-0,07	-0,04	-0,18
	P-Wert	0,041	0,088	0,316	0,604	0,772	0,167
<i>Rikenellaceae-RC9-gut-group</i>	r	0,04	0,04	-0,06	-0,02	-0,04	0,10
	P-Wert	0,744	0,773	0,626	0,886	0,741	0,438
<i>Christensenellaceae-R-7-group</i>	r	0,07	0,07	0,07	0,19	-0,07	0,08
	P-Wert	0,561	0,613	0,590	0,145	0,611	0,527
<i>Romboutsia</i>	r	-0,10	-0,06	-0,11	-0,05	-0,04	-0,02
	P-Wert	0,473	0,634	0,490	0,679	0,737	0,896

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 18: deskriptive Statistik zu den bakteriellen Gattungen, dem Antibiotikaeinsatz und den Mastitiden

Variable	n	Mittelwert	Standard- abweichung	Summe	Minimum	Maximum
<i>Delftia</i>	63	75,40	33,04	4750,00	0	94,41
<i>Stenotrophomonas</i>	63	8,11	3,80	510,65	0	13,55
<i>Methylobacterium_Methylorubrum</i>	63	4,28	15,74	269,95	0	86,16
<i>Staphylococcus</i>	63	2,75	14,46	173,50	0	94,12
<i>Streptococcus</i>	63	1,58	12,18	99,84	0	96,69
<i>Acinetobacter</i>	63	1,21	5,20	76,30	0	25,25
<i>Solibacillus</i>	63	0,40	1,96	25,30	0	13,42
<i>Corynebacterium</i>	63	0,28	1,11	17,77	0	7,03
<i>UCG-005</i>	63	0,27	1,11	16,86	0	7,35
<i>Saccharopolyspora</i>	63	0,20	1,34	12,84	0	10,59
<i>Sphingomonas</i>	63	0,15	0,71	9,47	0	5,00
<i>Comamonas</i>	63	0,15	0,61	9,27	0	3,56
<i>Cutibacterium</i>	63	0,15	0,47	9,19	0	2,84
<i>Rikenellaceae-RC9-gut-group</i>	63	0,14	0,74	8,51	0	5,57
<i>Christensenellaceae-R-7-group</i>	63	0,13	0,46	8,02	0	2,54
<i>Romboutsia</i>	63	0,12	0,55	7,40	0	3,42
<i>Sphingobacterium</i>	63	0,11	0,59	6,99	0	3,94

Quelle: eigene Darstellung

## 7. DISKUSSION

Die SCC wurde im Laufe dieses Projektes zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Tag 1, Tag 14 und Tag 28). Die gemessenen Werte an Tag 1 waren deutlich höher als an Tag 14 und 28 und lagen zudem deutlich über dem Cut-Off-Wert von 200.000 – 250.000 Zellen/mL für Mastitis in reifer Milch (siehe Kapitel 4.6. „Somatische Zellzahl als Indikator für Eutergesundheit“). In den meisten Fällen sind diese hohen Zellzahlen jedoch nicht auf eine Erkrankung des Euters zurückzuführen, sondern auf physiologische Vorgänge während der Kolostrumproduktion (57). Damit die im Kolostrum vorhandenen Immunglobuline vom Blut ins Kolostrum gelangen, ist es notwendig, dass die Blut-Euter-Schranke durchlässiger wird (siehe Kapitel 4.2. „Kolostrum“). Es wird angenommen, dass die erhöhte SCC mit dem Durchtritt von Immunzellen durch durchlässige Tight-junctions zwischen den Euterepithelzellen zusammenhängt (58). Einige Studien befassen sich mit einem Zusammenhang der SCC und der Kolostrumqualität (59,60,19). Demnach weist Kolostrum mit einer SCC von unter 400.000 Zellen/mL und einem hohen Immunglobulin-Gehalt ( $> 50\text{g/L}$ ) auch eine höhere Konzentration an Molkenproteinen und Fettsäuren auf (59). Die Berücksichtigung der somatischen Zellzahl bei der Untersuchung der Kolostrumqualität könnte die qualitätsbezogene Auswahl von verfütterbarem Kolostrum optimieren. Unsere Untersuchungen ergaben ebenfalls, dass eine mittlere Korrelation zwischen einer erhöhten SCC und einer Verabreichung von Antibiotika in der letzten Laktation zum ersten Messzeitpunkt bestand ( $r = 0,35$ ). Wird hier wieder die SCC als Indikator für die Eutergesundheit herangezogen, könnte dieses Ergebnis mit einer Antibiotika-Verabreichung aufgrund einer möglichen Mastitis in der vorangegangenen Laktation in Zusammenhang stehen. Da der genaue Grund für den Antibiotika-Einsatz uns nicht genannt wurde, kann darüber nur spekuliert werden. Zudem wäre es möglich, dass der Einsatz von Antibiotika, unabhängig davon aufgrund welcher Erkrankung diese eingesetzt wurden, dem physiologischen Mikrobiom im Euter schadet und somit das Risiko für eine Euterentzündung steigt. Dass eine Anwendung von Antibiotika in der letzten Laktation tatsächlich Einfluss auf das Mikrobiom im Kolostrum hat, konnte in unserer Studie nicht gezeigt werden. An Tag 14 konnte ebenso eine Korrelation zwischen der SCC und Antibiotika-Anwendung in der aktuellen Laktation ( $r = 0,42$ ), sowie auch mit Mastitis-Diagnosen im Laufe des Lebens ( $r = 0,41$ ) und im Laufe der aktuellen Laktation ( $r = 0,46$ ) festgestellt werden. Auch an Tag 28 konnte die Korrelation zwischen der SCC und Antibiotika-Anwendung in der aktuellen Laktation ( $r = 0,41$ ), sowie auch mit Mastitis-Diagnosen in der aktuellen Laktation festgestellt werden, wenn hier auch nur eine schwache Korrelation vorlag ( $r = 0,3$ ). Diese

Daten deuten darauf hin, dass das Vorliegen einer erhöhten SCC während der frühen Phase der Laktation bereits ein Indikator für eine auftretende Mastitis sein kann, die wiederum eine Behandlung mit Antibiotika zu Folge hat. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die linke Euterseite eine größere Neigung dazu hat eine Mastitis zu entwickeln im Vergleich zur rechten Euterhälfte. Die statistischen Untersuchungen diesbezüglich wiesen sowohl eine häufigere Mastitis-Erkrankung im linken kranialen und kaudalen Viertel auf im Vergleich zu den rechten Vierteln, als auch eine tendenziell höhere SCC an Tag 14. Zudem wiesen die Daten der Alpha-Diversitätsanalyse darauf hin, dass die linke Euterseite eine höhere Artenvielfalt in der Kolostralmilch im Vergleich zur rechten Seite aufweist, wenn auch keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz der am meisten vorkommenden Arten feststellbar waren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Kühe die linke Seite zum Liegen präferieren (61,62). Dadurch wäre die linke Euterseite häufiger in Kontakt mit dem Boden, was wiederum dazu führen könnte, dass Mikroben aus der Umgebung leichter über die linken Zitzen ins Euter gelangen und so eine Mastitis auslösen könnten. Die Proben, die an Tag 14 genommen wurden, liefern die meisten signifikanten statistisch-unterschiedlichen Ergebnisse, wodurch es möglich sein kann, dass besonders die Bestimmung der SCC in den ersten 14 Tagen *post partum* ein Indikator zur Früherkennung von Mastitiden sein könnte. Besonders interessant könnte hierbei das Miteinbeziehen der DSCC (Differential Somatic Cell Count, differenzierte somatische Zellzahl) sein, welche nicht nur die Anzahl der gefundenen Zellen, sondern auch die Proportionen von polymorphkernigen Leukozyten und Lymphozyten betrachtet. Das erlaubt genauere Rückschlüsse über die Eutergesundheit (63).

Aufgrund des hohen Anteils von Kühen mit nur einer oder zwei Paritäten, konnten keine signifikanten Rückschlüsse auf statistische Zusammenhänge zwischen Parität und SCC/Mastitis/Antibiotika-Therapie gezogen werden.

Die Ergebnisse den Antibiotika-Einsatz betreffend wiesen ebenso keine signifikante Relevanz in Zusammenhang mit Mastitiden auf. Allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Antibiotika in der vorangegangenen Laktation mit einer erhöhten SCC gefunden werden. Da die SCC einen wichtigen Indikator für die Eutergesundheit darstellt (siehe Kapitel 4.6. „Somatische Zellzahl als Indikator der Eutergesundheit“), könnte diese Tatsache damit erklärt werden, dass eine Mastitis in der letzten Laktation einen Einsatz von Antibiotika notwendig machte, wodurch die Zellzahl nach wie vor erhöht ist. Der Grund für eine Antibiotika-Behandlung in der vorherigen Laktation wurde jedoch bei diesem Projekt nicht berücksichtigt, weshalb es nicht möglich ist diesen Schluss sicher zu ziehen. Die uns vorliegenden Datensätze ließen ebenso keinen Rückschluss darauf zu, welche Wirkstoffe bei der

Behandlung mit Antibiotika zum Einsatz gekommen sind. Eine Unterteilung in Wirkstoffklassen könnte aufschlussreichere Ergebnisse im Zusammenhang mit SCC und Mastitiden liefern.

*Delftia* ist die am häufigsten vorkommende Gattung in den von uns genommenen Biestmilchproben. Dieses Ergebnis entspricht nicht den Ergebnissen anderer Studien, die sich ebenfalls mit dem Thema Mikrobiom im Kolostrum auseinandergesetzt haben (19,23,64). Einige Subspezies der Gattung *Delftia*, wie beispielsweise *Delftia tsuruhatensis*, sind opportunistische humane Pathogene, die zum Teil auch eine Multiresistenz gegenüber Antibiotika aufweisen (65). *Delftia* konnte in neueren Studien auch in roher Kuhmilch nachgewiesen werden (65,66). Das Auftreten von *Delftia* in Kuhmilch scheint demnach keine Seltenheit zu sein. Jedoch ist unklar, ob das Vorhandensein dieser Gattung Einfluss auf die Eutergesundheit hat. Zurzeit gibt es keine Hinweise auf *Delftia* als möglichen Mastitiserreger. Die ebenso vorkommenden Taxa *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* und *Acinetobacter* sind Gattungen, deren Subspezies bekannt dafür sind Mastitiden zu verursachen (67). Die Detektion dieser Gattungen könnte bereits auf eine Mastitiserkrankung hinweisen, bevor diese noch klinisch wird. Die gewählte Methode des „Handstripings“ könnte die Ergebnisse der Mikrobiomanalyse beeinflusst haben. Trotz gründlicher Reinigung und Desinfektion des Euters und der Zitze und sterilem Arbeiten der probennehmenden Person, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Umweltkeime in die Proben gelangt sind und dadurch die Zusammensetzung verändert haben. Die Verwendung von Milchkathetern könnte eine sterilere Art der Probennahme darstellen, jedoch besteht hier die Gefahr des Einbringens von Bakterien in das Euter über den Katheter selbst. In einer Studie untersuchten Lima et al. (2017) das Mikrobiom im Kolostrum von Holstein-Kühen eines großen Milchviehbetriebs in Upstate New York, USA. Auch hier wurde der Einfluss von vorherigen Antibiotikabehandlungen auf das Mikrobiom des Kolostrums untersucht. Laut Lima et al. (2017) konnte kein signifikanter Einfluss der Antibiotika auf die Zusammensetzung des Kolostrummikrobioms festgestellt werden, jedoch wurde im Gegensatz zu unserer Studie nicht der Zusammenhang zwischen Antibiotika-Verabreichung und SCC untersucht. Die Kolostrumproben wurden zunächst aufbereitet, bevor die DNA-Extraktion durchgeführt wurde. Die Kolostrumproben wurden zentrifugiert, um die somatischen Zellen zu pelletieren, und der Überstand, der hauptsächlich Fett und Serum enthält, verworfen. Das somatische Zellpellet wurde dann verwendet, um die bakterielle DNA zu extrahieren (19). Das Verwerfen des Überstandes bringt jedoch den Fehler mit sich, dass Bakterien, die sich darin befinden, später nicht detektiert werden können. Außerdem konzentriert sich das Pelletieren auf zellgebundene

Bakterien oder solche, die eng an Zelltrümmer oder Fettpartikel gebunden sind. Dadurch könnte das Verfahren eine Verzerrung erzeugen, die bestimmte Bakteriengruppen überrepräsentiert und andere unterrepräsentiert, was die Analyse des Mikrobioms beeinflussen könnte. Die am häufigsten vorkommenden Phyla waren *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* und *Tenericutes* (19). *Proteobacteria* und *Firmicutes* waren in unserer Studie die dominantesten Phyla. In unseren Proben konnten ebenfalls *Actinobacteria* und *Bacteroidetes* detektiert werden, andere Phyla waren nur marginal unter den am häufigsten vorkommenden Phyla vertreten. Die dominantesten Taxa bei Lima et al. (2017) sind *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales*, *Clostridiales* und *Pseudomonas* (19). Lediglich *Staphylococcus*, *Bacteroidales* und *Clostridiales* sind im Vergleich auch Taxa, die in unseren Proben detektiert werden konnten. Damit scheint die Artenvielfalt in der Studie von Lima et al. (2017) größer gewesen zu sein als in unserer. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass die verwendeten Proben in der vorliegenden Studie vor der Sequenzierung zentrifugiert wurden, um zu verhindern, dass die Lipide (Sahne) in der DNA-Extraktion interferierend wirken. Es ist daher möglich, dass einige Mikroben, die sich in der Sahne befunden haben, verloren gegangen sind und dementsprechend nicht detektiert werden konnten. Zudem wurden in anderen Studien zum Kolostrummikrobiom Holstein-Rinder als Versuchstiere verwendet (19), während für unser Projekt Fleckvieh-Kühe beprobt wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass rassespezifische Unterschiede zwischen den Tieren Einfluss auf das Milch- bzw. insbesondere auf das Kolostrummikrobiom haben können. In unserer Studie wurde zudem festgestellt, dass die Kühe individuell sehr unterschiedliche Mikroben im Kolostrum aufwiesen, wie die deskriptive Statistik zeigt. Diese Unterschiede könnten durch eine Vielzahl von Faktoren wie das Liegeverhalten, das Fressverhalten, die individuellen Hygienebedingungen, die spezifische Immunantwort jeder Kuh sowie unterschiedliche Umweltbedingungen, zum Beispiel unterschiedliche Abkalbebuchten, beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen die Komplexität der Faktoren, die die Eutergesundheit beeinflussen, insbesondere im Hinblick auf die Unterschiede zwischen der linken und rechten Euterseite. Obwohl diese Studie wichtige Einblicke in das Kolostrummikrobiom und die Eutergesundheit von Fleckvieh-Kühen geliefert hat, gibt es einige methodische Einschränkungen, die berücksichtigt werden sollten. Kolostrum bzw. Milch sind eine komplexe Matrix, um daraus DNA zu isolieren. Um die interferierende Wirkung der Lipidfraktion auf die DNA-Extraktion zu verringern, wird häufig, wie auch bei unserer Studie,

vorab die Sahne abzentrifugiert und aus der homogenisierten Magermilch die DNA extrahiert. Wie bereits oben erwähnt, kann dies dazu geführt haben, dass einige Mikroben, die mit der Sahneschicht assoziiert waren, nicht in die Analyse einbezogen wurden. Eine andere Möglichkeit ist, ein Pellet aus dem Kolostrum abzuzentrifugieren. Dafür werden jedoch größere Mengen an Rohmilch benötigt und es werden vor allem die Mikroben in den SCC bestimmt, wie in der Studie von Lima et al., was auch wieder mit Verlusten einhergehen kann. Es sollte in künftigen Studien verglichen werden, wie sich die Mikrobiomzusammensetzung unterscheidet, wenn Kolostrum als Ganzes, nach Abzentrifugation der Sahneschicht und Abzentrifugation des Pellets verwendet wird. Darüber hinaus könnte die relativ kleine Stichprobengröße von 16 Kühen mit einer großen Schwankungsbreite bezüglich Parität die allgemeine Bedeutung der Ergebnisse einschränken. Eine größere Stichprobe könnte helfen Aussagen zu treffen, die generalisierbarer sind. Zudem wäre der Erhalt detaillierter Informationen bezüglich der Antibiotika-Verwendung, einschließlich spezifischer Wirkstoffklassen und dem medizinischen Grund für die Anwendung, wünschenswert, um präzisere Zusammenhänge zwischen Antibiotikagabe und Veränderungen im Mikrobiom und SCC zu detektieren. Die beobachteten individuellen Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung des Kolostrums könnten auf eine Vielzahl von Faktoren zurückzuführen sein. Zukünftig könnten Vergleiche zwischen den Haltungsformen Aufschluss darüber geben, welche Faktoren direkte Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Kolostrummikrobioms haben. Zusätzlich wäre auch eine Studie sinnvoll, die die hier durchgeführten Untersuchungen über mehrere Laktationen hinweg durchführt, um die langfristigen Auswirkungen von Antibiotika-Verabreichung, Mastitis und SCC auf das Mikrobiom des Kolostrums zu untersuchen.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass eine differenzierte Betrachtung sowohl mikrobieller als gegebenenfalls auch verhaltensbedingter Faktoren entscheidend ist, um die Eutergesundheit zu verstehen und zu verbessern. Zukünftige Forschung könnte diese Ansätze weiter vertiefen und durch neue Technologien und Methoden Systeme entwickeln, die es möglich machen Mastitiden frühzeitig zu detektieren und präventiv zu behandeln. Außerdem könnte damit auch die Kälbergesundheit und das -wachstum verbessert werden. Insgesamt könnten weitere Forschungen dazu beitragen sowohl wirtschaftliche Aspekte als auch das Tierwohl in der Milchviehhaltung zu verbessern.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Barko, P. C. et al. The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of veterinary internal medicine*. 2018.
2. Cholewińska P., et al. The microbiome of the digestive system of ruminants – a review. *Animal Health Research Reviews*. 2020.
3. Arshad, M.A. et al. Gut microbiome colonization and development in neonatal ruminants: Strategies, prospects, and opportunities. *Animal Nutrition*. 2021;(7).
4. Khalil, A.; et al. Healthy Cattle Microbiome and Dysbiosis in Diseased Phenotypes. *Ruminants*. 2022;: 134-156.
5. von Engelhardt, W.; et al. *Physiologie der Haustiere*. 5th ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2015.
6. Khafipour, E.; et al. Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle. *Anim. Front*. 2016; 6: 13-19.
7. Oikonomou G., et al. Milk microbiota: what are we exactly talking about? *Frontiers in microbiology*. 2020.
8. Zeineldin, M.; et al. Relationship between nasopharyngeal and bronchoalveolar microbial communities in clinically healthy feedlot cattle. *BMC Microbiology*. 2017 Juni;(17).
9. Borghi E.; et al. Antenatal Microbial Colonization of Mammalian Gut. *Reproductive Sciences*. 2018 Oktober;(26).
10. Kressin, M.; et al. *Embryologie der Haustiere*. 7th ed. Kressin M, Brehm R, editors. Stuttgart: Thieme; 2019.
11. Schneider F, Wehrend A. Qualitätsbeurteilung von bovinen und equinen Kolostrum - Eine Übersicht. *Schweiz. Arch. Tierheilkd*. 2019.
12. Godden SM,LJE,&WAR. Colostrum Management for Dairy Calves. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2019; 35(3): 535-556.
13. Ganz S., et al. Inhaltsstoffe des bovinen Kolostrums - eine Übersicht. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*. 2018.
14. Song et al. Colostrum feeding shapes the hindgut microbiota of dairy calves during the first 12 h of life. *FEMS Microbiol Ecol*. 2019.
15. Bonsaglia, E.; et al. Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. *Scientific Reports*. 2017.

16. Derakhshani, H. et al. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*. 2018 Dezember;(101).
17. Fehr KB. Influence of environmental factors on bovine mammary bacterial communities and mammary inflammation. University of Manitoba, Animal Science; 2017.
18. Kaczorowski, Ł., et al. The influence of bacteria causing subclinical mastitis on the structure of the cow's milk microbiome. *Molecules*. 2022.
19. Lima et al. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 2017 April;(100).
20. Tolle A. The microflora of the udder. p 4. In factors influencing the bacteriological. *Int. Dairy Federation Bulletin*. 1980.
21. Oikonomou, G. et al. Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. *Plos One*. 2014 Januar.
22. Kuehn, J.S., et al. Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culturenegative. *Plos One*. 2013 April.
23. Ruegg PL. The bovine milk microbiome - an evolving science. *Domestic Animal Endocrinology*. 2022 April;(79).
24. Murphy, K., et al. The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. *Scientific Reports*. 2017 Januar.
25. Urbaniak C., et al. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*. 2016 Januar.
26. König et al. *Anatomie der Haustiere*. 7th ed. König HE, Liebich HG, editors. Stuttgart: Thieme; 2019.
27. Winter, P., Burvenich Ch., et al. *Praktischer Leitfaden Mastitis* Winter P, editor. Stuttgart: Parey; 2009.
28. Nitz J. Trockenstellen bei Milchkühen - Fakten und Tipps rund um den Transit. *Veterinärspiegel*. 2022 Februar.
29. Puerto, M.A.; et al. The hidden cost of disease: I. Impact of the first incidence of mastitis on production and economic indicators of primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2021 Juli;(104).
30. Kahn, M.Z.; Xiao, J.; et al. Overview of Research Development on the Role of NF-κB Signaling in Mastitis. *Animals*. 2020.
31. Ruegg L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*. 2017 Dezember;(100).

32. Ashraf A, Imran M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Review*. 2020 Februar.
33. Lean, I.J.; et al. Associations of parity with health disorders and blood metabolite concentrations in Holstein cows in different production systems. *Journal of Dairy Science*. 2022 Oktober;(106).
34. Rainard P. Mammary microbiota of dairy ruminants: Fact or fiction? *Veterinary Research*. 2017.
35. Chen, M.; et al. Cow-to-mouse fecal transplantations suggest intestinal microbiome as one cause of mastitis. *Microbiome*. 2018 November;(6).
36. WENZ JR,BGM,GFB,DRP. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *J Am Vet Med Assoc*. 2001 Februar; 15;218(4): 567-72.
37. Tommasoni, C.; et al. Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals*. 2023.
38. Schalm OW. Experiments and Observations Leading to Development of the California Mastitis Test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1957.
39. Wente N. Anwendung molekularbiologischer Stammvergleichstechniken in der klinischen Mastitisepidemiologie. Doktorarbeit. Rostock: Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät; 2021.
40. Dalenzi, F.; et al. Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2020: p. 3648-3655.
41. Schukken, Y.; et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*. 2003.
42. LKV Niederösterreich. lkv-service.at. [Online]. [cited 2024 Oktober 14. Available from: [http://www.lkv-service.at/MEDIA/Zellzahl\\_0413.pdf](http://www.lkv-service.at/MEDIA/Zellzahl_0413.pdf).
43. Masanz M. AMA - Agrar Markt Austria. [Online].; 2019 [cited 2024 März 02. Available from: <https://www.ama.at/marktinformationen/milch-und-milchprodukte/aktuelle-informationen/2019/aenderung-der-rohmilch-bewertung>.
44. Sinha, R.; et al. Effect of season, stage of lactation, parity and level of milk production on incidence of clinical mastitis in Karan Fries and Sahiwal cows. *Biological Rhythm Research*. 2019 November.
45. Wilson, D.J.; et al. Effect of Clinical Mastitis on the Lactation Curve: A Mixed Model Estimation Using Daily Milk Weights. *Journal of Dairy Science*. 2004 Juli;(87).

46. Yu, A.B.; et al. Relationship between parity and cellular composition of somatic cells in milk of Chinese Holstein cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011.
47. Reinhardt, T.A.; et al. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*. 2011 April;(188): 122-124.
48. Konstantinidis, T.; et al. Effects of Antibiotics upon the Gut Microbiome: A Review of the Literature. *Biomedicines*. 2020 September.
49. Smith, R.A.; et al. Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health Communication*. 2014 August;(30): 309-314.
50. Baumgartner W, Wittek T. *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*. 9th ed. Baumgartner W, Wittek T, editors.: Enke; 2018.
51. Dahlberg, J. et al. Microbiota of bovine milk, teat skin, and teat canal: Similarity and variation due to sampling technique and milk fraction. *Journal of dairy science*. 2020.
52. Vasquez, A.; et al. Characterization and comparison of the microbiomes and resistomes of colostrum from selectively treated cows. *Journal of Dairy Science*. 2022.
53. Callahan, B.J., et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 2016; 13(7): 581-583.
54. Quast, C., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41(D1): D590-D596.
55. Oksanen, J., et al. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-4. 2022.
56. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. 2016.
57. McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L., & Kelly, A. L. Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science & Technology*. 2016;(96): 133-158.
58. Nguyen DD, Neville MC. Tight junction regulation in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 1998;(3): 233-246.
59. Puppel, K., Gołębiewski, M., Grodkowski, G., Solarczyk, P., Kostusiak, P., Klopčič, M., & Sakowski, T.. Use of somatic cell count as an indicator of colostrum quality. *Plos one*. 2020; 15(8).
60. Puppel, K., Gołębiewski, M., Slószarz, J., Grodkowski, G., Solarczyk, P., Kostusiak, P., & Sakowski, T.. Interaction between the level of immunoglobulins and number of somatic cells as a factor shaping the immunomodulating properties of colostrum. *Scientific Reports*. 2021; 11(1).

61. Forsberg, A. M., Pettersson, G., Ljungberg, T., & Svennersten-Sjaunja, K.. A brief note about cow lying behaviour - Do cows choose left and right lying side equally? *Applied animal behaviour science*. 2008;(114 (1-2)): 32-36.
62. Arave, C. W., & Walters, J. L.. Factors affecting lying behavior and stall utilization of dairy cattle. *Applied Animal Ehtology*. 1980; 6(4): 369-376.
63. Damm, M., et al. Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(6): 4926-4940.
64. Yasir, M., Al-Zahrani, I. A., Khan, R., Soliman, S. A., Turkistani, S. A., Alawi, M., & Azhar, E. I. Microbiological risk assessment and resistome analysis from shotgun metagenomics of bovine colostrum microbiome. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2024;(31(4)).
65. Andriyanov, P. A., Kashina, D. D., & Menshikova, A. N. Genomic analysis of multidrug-resistant *Delftia tsuruhatensis* isolated from raw bovine milk. *Frontiers in Microbiology*. 2024;(14).
66. Huang, J., Yao, Q. B., Feng, L. K., Peng, X. X., Fei, Y. T., & Huang, Y. Y. The assessment of bacterial diversity in CO<sub>2</sub> treated and untreated raw milk during cold storage using high-throughput sequencing technology. *International Journal of Food Science & Technology*. 2024;(59): 1911-1926.
67. Zadoks, R. N., & Fitzpatrick, J. L. Changing trends in mastitis. *Irish veterinary journal*. 2009;(62): 1-12.

## 9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Erhobene Daten aus den Krankheitsgeschichten der Versuchstiere.....	24
Tabelle 2: Deskriptive Statistik der Daten für somatische Zellzahlen, Antibiotikabehandlungen und Mastitiden .....	25
Tabelle 3: Mittelwerte der Anzahl der Mastitis-Diagnosen pro Euterviertel .....	26
Tabelle 4: Mittelwerte der SCC pro Euterviertel .....	27
Tabelle 5: Vergleich SCC der linken und rechten Euterseite .....	27
Tabelle 6: Korrelationen zwischen SCC in Kolostrum und Milch und AB-Gebrauch bzw. Mastitis .....	27

Tabelle 7: Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen den Eutervierteln und der Euterseite .....	28
Tabelle 8: Korrelation zwischen SCC und Alpha-Diversität im Kolostrum.....	28
Tabelle 9: deskriptive Statistik zur Korrelation zwischen Alpha-Diversität und SCC .....	29
Tabelle 10: Korrelationen zwischen Antibiotikaverabreichung und Alpha-Diversität und Mastitiden und Alpha-Diversität .....	29
Tabelle 11: deskriptive Statistik zur Korrelation zwischen Alpha-Diversität und Mastitis.....	29
Tabelle 12: Ergebnisse der PERMANOVA (Permutations-Varianzanalyse) - einzelne Viertel .....	30
Tabelle 13: Ergebnisse der PERMANOVA (Permutations-Varianzanalyse) - Euterseiten ....	32
Tabelle 14: Auflistung der nachgewiesenen Bakterien im Kolostrum .....	33
Tabelle 15: relative Abundanz der nachgewiesenen bakteriellen Gattungen ( $\geq 0,1\%$ Abundanz aller Sequenzen) im Kolostrum pro Viertel .....	34
Tabelle 16: relative Abundanz der nachgewiesenen bakteriellen Gattungen ( $\geq 0,1\%$ Abundanz aller Sequenzen) im Kolostrum pro Euterseite .....	35
Tabelle 17: Ergebnisse der Untersuchung der Korrelationen zwischen den bakteriellen Gattungen und den verschiedenen Parametern.....	36
Tabelle 18: deskriptive Statistik zu den bakteriellen Gattungen, dem Antibiotikaeinsatz und den Mastitiden .....	37
Abbildung 1: Beta-Diversität der Bakteriengemeinschaften in den Eutervierteln (Q1-Q4). Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS), berechnet mit der Bray-Curtis-Distanz.....	31
Abbildung 2: Beta-Diversität der Bakteriengemeinschaften in der linken und rechten Euterhälfte (L und R). Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS), berechnet mit der Bray-Curtis-Distanz.....	31