

Aus dem Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality,  
Safety and Innovation, FFoQSI GmbH, Tulln

und dem

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen der Veterinärmedizinischen  
Universität Wien, Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und  
Öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dipl. ECVPH Martin Wagner)

**Rohmilchqualitätsparameter der Tankmilch österreichischer Milchviehbetriebe als  
Indikator für Milchqualität und Eutergesundheit der Herde unter Berücksichtigung  
Mastitis-assoziiertes Pathogene**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Barbara Rinnhofer

Wien, im Mai 2020

**Betreuer:**

Mag. med. vet. Viktoria Neubauer, PhD

FFoQSI GmbH, Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation, Tulln

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches Gesundheitswesen, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Franz-Ferdinand Roch MSc.

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches

Gesundheitswesen, Abteilung für Öffentliches Veterinärwesen und Epidemiologie

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen der Veterinärmedizinischen Universität Wien

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Fragestellung .....	1
2	Literaturübersicht .....	2
2.1	Qualitätsbestimmung von Rohmilch .....	2
2.2	Milchinhaltsstoffe .....	3
2.3	Mastitis und Mastitiserreger .....	6
2.4	Mastitisdiagnostik .....	9
2.5	Milchhygiene .....	11
3	Material und Methoden .....	12
3.1	Betriebsdaten .....	12
3.2	Datenerhebung .....	13
3.3	Probenahme .....	14
3.4	DNA-Extraktion .....	15
3.5	Real-time PCR .....	16
3.6	Statistische Auswertung .....	18
4	Ergebnisse .....	20
4.1	Stichprobenbeschreibung .....	20
4.2	Milchinhaltsstoffe .....	20
4.2.1	Keimzahl .....	23
4.2.2	Zellzahl .....	25
4.2.3	Güstzeit .....	33
4.2.4	Leitkeime .....	34
5	Diskussion .....	40
5.1	Milchinhaltsstoffe .....	40
5.1.1	Keimzahl .....	42
5.1.2	Zellzahl .....	43
5.1.3	Leitkeime .....	46
6	Zusammenfassung .....	49

7	Summary .....	50
8	Förderhinweis.....	51
9	Abkürzungsverzeichnis .....	52
10	Literaturverzeichnis.....	55
11	Abbildungsverzeichnis .....	60
12	Tabellenverzeichnis.....	60

# 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

---

In Österreich gibt es derzeit 25.608 Milchviehbetriebe mit gesamt 524.068 Milchkühen, die 3.139.711 t Rohmilch pro Jahr liefern, zusätzlich werden noch 32.724.396 kg Milch von Direktvermarktern verarbeitet (Stand Dezember 2019). Die Gesamtmenge, der in Österreich produzierten Milch entspricht nur 2% der EU-Produktion, erreicht aber höchste Rohmilch-Qualitäts-Standards. 2019 betrug der Anteil von Rohmilch ohne Qualitätsabzüge 99,22 % und S-Klasse Milch 84,69 %. Die Beurteilung der Rohmilchqualität findet nach den Inhaltsstoffen Milchfett und Milcheiweiß, sowie den Qualitätskriterien Zellgehalt (somatische Zellen), Keimzahl, Gefrierpunkt und Hemmstoffnachweis in der Milch statt (Agrar Markt Austria).

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden wie die hohe Rohmilchqualität in Österreich im Zusammenhang mit der Tiergesundheit und Melkmanagement steht. Für diese Untersuchung standen die Qualitätskriterien der Rohmilch und Leitkeimbestimmungen von einzelnen Kühen und ganzen Beständen im Mittelpunkt der Arbeit. Die Fragestellungen, wie sich der Zusammenhang zwischen hohem Zellgehalt in der (Tank-) Milch und Tagen in Milch, Leistung, Auftreten von Keimen, jahreszeitliche Schwankungen und Länge der Gützeit darstellt, wurden untersucht. Weiters wurde die Frage bearbeitet, ob das Betriebsmanagement (Melksystem, Haltungsform, Betriebsgröße) einen Einfluss auf die Zellzahl hat. Das Auftreten von Euterpathogenen in hohen ( $>200.000$  Zellen/ml) und niedrigen ( $<200.000$  Zellen/ml) Zellzahlgruppen wurde analysiert und Leitkeime für diese Gruppen definiert. Um die Fragestellung zu beantworten, ob die Tankmilch das Geschehen in der Herde widerspiegelt, wurden für alle erhobenen Parameter Herden- und Tankmilchdaten verglichen und korreliert.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

---

### 2.1 QUALITÄTSBESTIMMUNG VON ROHMILCH

Die Qualitätsbestimmung der Rohmilch findet in Österreich von mehreren Seiten statt. Die an die Molkerei angelieferte Rohmilch wird durch eines der acht von der Agrarmarkt Austria (AMA) bestellten Qualitätslabors überprüft. Diese Qualitätsbestimmung findet durchschnittlich etwa dreimal monatlich statt. Die Probennahme erfolgt dabei direkt bei der Milchabholung durch den Milchsammelwagen und soll den gesamten Inhalt des Hoftankes eines Milcherzeugers repräsentieren. Von diesen Proben werden folgende Parameter untersucht: Fettgehalt, Keimgehalt (Keimzahl), Eiweißgehalt, Hemmstoffe, Gehalt an somatischen Zellen (Zellzahl, ZZ) und der Gefrierpunkt. Der Keimgehalt und die ZZ der Milch werden herangezogen, um die österreichischen Milchviehbetriebe den Qualitätsklassen zuordnen zu können. Die Klasse mit höchster Qualität wird als S-Klasse bezeichnet und verlangt einen Keimgehalt von  $\leq 50.000$  Keime/ml und  $\leq 250.000$  Zellen/ml. Von der Milch 1. Stufe (Milch ohne Qualitätsabzüge) werden  $\leq 100.000$  Keime/ml und  $\leq 400.000$  Zellen/ml erwartet. Rohmilch, die diese Kriterien nicht erfüllt wird als 2. Stufe (Milch mit Qualitätsabzüge) klassifiziert und beinhaltet  $> 100.000$  Keime/ml und  $> 400.000$  Zellen/ml. Einzelne Molkereien stellen oft höhere Qualitätsansprüche und vergeben z.B. den S-Klasse Status nur an Betriebe mit einem Zellgehalt  $< 200.000$  Zellen/ml (Agrar Markt Austria). Bei positivem Hemmstoffnachweis, Fremdwasserzusatz (erhöhter Gefrierpunkt), oder wenn im Schnitt von drei Messungen die Klasse 2 erreicht wird, kann eine Einstufung in die Bewertungsstufen S oder Klasse 1 nicht mehr erfolgen und es kommt zur Liefersperre (Bundesministerium für Gesundheit, Sport und Konsumentenschutz 2015). Die Verteilung der gelieferten Milch auf diese Qualitätsklassen, mit 84,69 % S-Klasse, 8,14 % 1. Stufe und 0,45 % 2. Stufe, zeugen von sehr hohem Standard der Milchqualität in Österreich (Stand Dezember 2019). Bei niedriger Rohmilchqualität drohen dem Landwirt, neben möglicher Liefersperren auch Zuschläge zu entfallen, die je gelieferten Liter S-Klasse Milch bis zu 1,2 Cent betragen können (Agrar Markt Austria).

Eine weitere Möglichkeit der Milchkontrolle bietet der Leistungskontrollverband (LKV) Österreich, der aus acht Verbänden der Bundesländer (exklusive Wien) besteht und eine

Milchleistungskontrolle und Qualitätssicherung durchführt. Die Mitgliedschaft beim LKV ist für jeden Betrieb freiwillig und steht in keinem Zusammenhang mit den Zuchtverbänden der Länder. Die Kontrolle erfolgt nicht durch eine Qualitätskontrolle der Tankmilch, sondern durch Milchleistungs- und Milchinhaltsprüfung der Einzelkühe. Hierbei besteht für jeden Betrieb, der Mitglied beim LKV ist, eine Kontrollpflicht aller im Herdebuch vermerkten Tiere. Die Milchprüfung wird durch Mitarbeiter des LKV acht- bis elfmal jährlich, wechselnd bei der Morgen- und Abendmelkung durchgeführt. Die Betriebsführer bekommen von der jeweiligen Probemelkung ein Probenehmerprotokoll mit Informationen über Laktationsanzahl, Laktationstag, Milchkilogramm (aktueller Wert und vorangegangene Messung), Milchfett in Prozent, Milcheiweiß in Prozent, ZZ, Fett-Eiweiß-Quotient und Harnstoffgehalt in der Milch der Einzeltiere und des Herdendurchschnitts. Auf Basis dieser Milchinhaltsstoffen werde die Tiere in Leistungsklassen eingeteilt und es können Schlüsse über die Fütterung gezogen werden. Zusätzlich sind im LKV Bericht auch Informationen über Bestandsveränderungen (Daten übernommen aus der AMA-Tierkennzeichnung), Belegungen, Fruchtbarkeit und Krankheiten enthalten (LKV Austria).

## **2.2 MILCHINHALTSSTOFFE**

Die Messung der Milchinhaltsstoffe durch den LKV wird in den regionalen Milchuntersuchungslabors nach standardisierten Methoden durchgeführt. Für die Bestimmung des Milchfettes sind die Methode nach Gerber, Milchfettbestimmung mit dem Milkotester und die Infrarotbestimmungsmethode nach Röse-Gottlieb zulässig, der derzeitige Standard ist die Messung per Infrarotbestimmungsmethode (LKV Austria). Gebildet wird das Milchfett aus kurzkettigen Fettsäuren, die bei der Fermentation von Pflanzenbestandteilen im Pansen entstehen, und langkettigen Fettsäuren die bei der Lipolyse von körpereigenem Depotfett entstehen. Somit kann ein Absinken oder Ansteigen des Milchfettgehaltes auf Fehler in der Fütterung, wie einem Mangel an Rohfaser, oder auf starker Körperfettmobilisation hinweisen (Kruif et al. 2014). Die Rohmilch gesunder Milchkühe hat einen durchschnittlichen Fettgehalt von 3,2–5,0 %, unter anderem Abhängig von Rasse, Fütterung und Laktationsstadium (Krömker und Bruckmaier 2007).

Als weiterer wichtiger Milchinhaltsstoff zählt das Milchprotein, das sich aus Caseine, Molkenproteine, Proteine der Fett-Kügelchen-Membran, Enzyme und Minorproteine zusammensetzt (Krömker und Bruckmaier 2007). Für die Bestimmung des Milcheiweiß im Zuge der LKV Kontrolle sind die Farbstoffbindungsmethode und die Infrarotbestimmungsmethode nach Kjeldahl vorgesehen (LKV Austria). Gebildet wird das Milchprotein zum Großteil vom Mikrobeneiweiß aus dem Pansen, und zu einem kleinen Teil aus pansenstabilem Futtereiweiß. Ein Sinken des Milchproteingehalts kann als Folge einer Störung der Pansenaktivität oder unzureichender Energiezufuhr auftreten. Ein erhöhter Eiweißgehalt dagegen kann Hinweis auf Energieüberschuss oder ein Entzündungsgeschehen im Euter sein, da bei gestörter Blut-Euter-Schranke vermehrt Plasmaproteine ins Euter übertreten können. Der physiologische Proteingehalt liegt bei 3,2–3,8 % (Kruif et al. 2014).

Aus den beiden Werten Milchfett und Milcheiweiß wird im Zuge der LKV Milchleistungsprüfung der sogenannte Fett-Eiweiß-Quotient errechnet. Da Milchfett eine Aussage über die Rohfaserversorgung und Milcheiweiß über die Energieversorgung der Tiere trifft, kann ein Schluss auf die Stoffwechselfversorgung der Einzelkühe gezogen werden (Kruif et al. 2014). Der Idealwert für den Fett-Eiweiß-Quotienten liegt zwischen 1,1 und 1,5 und sollte immer im Zusammenhang mit dem Laktationsstadium beurteilt werden. Vor allem zu Laktationsbeginn kann ein kurzfristig hoher Wert erwartet werden, da es aufgrund von negativer Energiebilanz zu starkem Körperfettabbau und Energiemangel mit Ketose als Folge kommen kann. Ist der Quotient allerdings erniedrigt, besteht aufgrund von strukturarmer Fütterung oder einer kraftfutterreichen Ration die Gefahr einer Pansenazidose (Steinwider 2017).

Der Harnstoffgehalt der Milch entsteht durch den Abbau von Futtereiweiß im Pansen, wobei Ammoniak gebildet wird. Dieser wird zum Teil durch die Pansenmikroben wiederverwertet und zum Teil über die Pansenwand ins Blut aufgenommen, durch die Leber zu Harnstoff umgebaut und anschließend unter anderem mit der Milch ausgeschieden. Daher ist Harnstoff ein Indikator für die Eiweißversorgung der Milchkuh über die Fütterung. Der Harnstoffgehalt sollte immer zusammen mit dem Milcheiweißgehalt beurteilt werden, um die optimale Energie und Eiweißversorgung der Kuh zu analysieren (Kruif et al. 2014). Der

Optimalbereich für den Milchharnstoffgehalt liegt zwischen 15–30 mg/100 ml (Steinwigger 2017).

Die ZZ von Milchkühen entsteht durch die Messung von somatischen Zellen, die über die Milch ausgeschieden werden. Sie setzen sich zusammen aus Makrophagen, Lymphozyten, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und abgestoßenen Epithelzellen des Euters. Ein gesundes Euter sekretiert Milch mit einem Zellgehalt von < 100.000 Zellen/ml. Die Verteilung der Zellen bei eutergesunden Kühen fällt dabei zugunsten der Makrophagen (58 %), gefolgt von Lymphozyten (28 %) und neutrophilen Granulozyten (12 %) aus (Winter 2010). Allerdings ist auch bei eutergesunden Tieren die ZZ nicht immer konstant niedrig. Mit steigender Anzahl der Laktationen kann die ZZ zunehmen, da die lokale Immunabwehr des Euters durch vorangegangene Infektionen sensibilisiert wurde, die eine raschere Mobilisierung von Abwehrzellen zur Folge haben (Flere et al. 2016). Auch mit der fortschreitenden Laktationsdauer (Laktationstage) kommt es zu einem Anstieg der ZZ (Hand et al. 2012). Weitere Einflüsse auf die ZZ stellen die Rasse, Stressfaktoren wie Brunst, Umstellung oder Allgemeinerkrankungen dar (Flere et al. 2016). Bei einer Eutererkrankung steigt die ZZ ebenfalls an und es kommt zu einem Abfall der Milchleistung und zu makroskopischen Veränderungen der Milch. Die ZZ von erkrankten Eutervierteln schwankt je nach Ursache der Infektion und der Abwehrreaktion des Euters auf die Noxe, zwischen 100.000 Zellen/ml bis zu über 10.000.000 Zellen/ml. Die ZZ stellt den wichtigsten Indikator für die Eutergesundheit dar, da durch die Messung des ZZ-Gehaltes auch subklinische Mastitiden detektiert werden können, wo es zu keiner Veränderung des Sekretes oder Allgemeinverhalten des Tieres kommt (Krömker und Bruckmaier 2007). Die ZZ-Messung findet mit Verfahren auf Basis der Durchflusszytometrie statt.

Bei mastitiserkrankten Tieren entstehen wirtschaftliche Einbußen durch entgangene Milchproduktion, Behandlungskosten, Sekundärfolgen wie verringerte Fruchtbarkeit und Abgänge. Der Milchrückgang ist bei klinischen Mastitiden wesentlich höher als bei subklinischen, allerdings sollten Mastitiden verursacht durch niedrig-pathogene Erreger vor allem aufgrund von ihrer Chronizität nicht unterschätzt werden (Heikkilä et al. 2018). Unter Berücksichtigung von direkten (Tierarztkosten, Abgang) und indirekten Kosten (Milchproduktion, Reproduktion) muss bei einer klinischen Mastitis in den ersten 30 Tagen

der Laktation mit einem wirtschaftlichen Verlust von rund € 400 gerechnet werden (Rollin et al. 2015). Bei subklinischen Mastitiden sind die wirtschaftlichen Verluste betriebsindividuell zu beurteilen, denn die Kosten können zwischen € 17 und € 198 pro Kuh und Jahr variieren (Hogeveen et al. 2011). Der Anteil an Abgängen durch Mastitiden (12 %) steht, nach Fruchtbarkeit (17%), an zweiter Stelle der Abgangsursachen (ausgenommen Verkauf zur Zucht) (Seegers et al. 2003).

### **2.3 MASTITIS UND MASTITISERREGER**

Mastitis beschreibt alle entzündlichen Vorgänge, die im Euter aufgrund von infektiösen, traumatischen oder toxischen Ursachen entstehen können. Das Krankheitsbild kann je nach betroffenem Gewebe, Art der Entzündung und Zeitdauer unterschieden und beschrieben werden. Infektiöse Mastitiden sind in den meisten Fällen bakteriell bedingt, es können aber auch Hefe- oder Protothekenmastitiden auftreten. Die Erreger gelangen meist durch den Strichkanal ins Euter. Durch die Erregervermehrung kommt es zu einer Entzündungsreaktion und einem Anstieg der Leukozyten und damit der somatischen Zellen im Euter. Je nach Art der Mastitis kann das Allgemeinbefinden der Kuh stark oder kaum beeinträchtigt sein. Klinische Mastitiden sind gekennzeichnet durch sichtbar verändertes Milchsekret und deutlichen Milchleistungsabfall, erhöhten Zellgehalt und veränderte Viertel, begleitet von gestörtem Allgemeinbefinden. Subklinische Mastitiden dagegen weisen oft nicht mehr als erhöhte ZZ und einen geringen Milchrückgang auf (Kulkarni et al. 2013). Mastitiden sind allerdings Faktorenkrankheiten und so spielen neben Pathogenen, der Einfluss von Melkhygiene, Melktechnik, Melkarbeit, Stallhygiene, Tierhygiene und Fütterung eine große Rolle. Zusätzlich zum Vorhandensein eines potentiellen Mastitiserregers muss immer eine Abwehrdepression durch endogene oder exogene Stressoren auftreten, um eine Neuinfektion zu verursachen (Krömker und Bruckmaier 2007).

Bakterielle Erreger von Mastitiden werden unterteilt in kuhassoziierte und umweltassoziierte Keime. Unter kuhassoziierten oder auch kontagiösen Mastitiserregern versteht man Bakterien, die sich im Euter oder auf der Zitzenhaut von infizierten Tieren befinden. Sie stellen ein Erregerreservoir und eine Infektionsquelle für eutergesunde Tiere dar, da eine Übertragung während der Melkung stattfindet, wenn Zwischendesinfektion und weiterer

Hygienemaßnahmen fehlen. Die hochpathogenen (major pathogens) Vertreter dieser Gruppe sind *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* und Mykoplasmen. Zu den schwachpathogenen (minor pathogen) kuhassoziierten Mastitiserregern gehören Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) und *Corynebacterium bovis*. Wobei KNS auch als Umweltkeime beschrieben wurde. Umweltassoziierte Mastitiserreger befinden sich in der Umgebung des Tieres und kommen ubiquitär im Stall und auf der Weide vor. Die Infektion mit solchen Erregern erfolgt in der Zwischenmelkzeit, vor allem wenn ungenügendes Management von Liegeboxen und Stall vorliegt. Abwehrschwache Tiere und Tiere mit schlechter Zitzenkondition sind besonders gefährdet. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe gehören als major pathogens *Enterococcus* spp., Koliforme Bakterien wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus uberis*. *Trueperella pyogenes*, *Proteus* spp. und Hefen gehören zu den schwachpathogen umweltassoziierten Mastitiserregern (Kulkarni et al. 2013).

Beurteilt man die Euterpathogenen nach ihrem Auftreten im Zusammenhang mit einem Mastitisgeschehen, so sind KNS die am häufigsten vorkommenden Bakterien in Österreich. Sie werden dicht gefolgt von *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Sc. uberis*, *E. coli* und *S. dysgalactiae*. *Corynebacterium*, *Sc. agalactiae*, Enterokokken, Mykoplasmen, Hefen und Prototheken sind seltener anzutreffen (Süntinger 2018).

Nachstehend werden die Mastitiserreger im Detail beschrieben, die in der vorliegenden Studie untersucht und diskutiert werden.

#### *Corynebacterium bovis*

*C. bovis* ist als häufiger Besiedler von Euter und Zitzenhaut, sowie der Schleimhaut des Strichkanals der Kuh bekannt. Bei einer, selten vorkommenden, Infektion entsteht eine subklinische Mastitis mit ZZ-Erhöhung und geringem Milchrückgang, wobei häufig Spontanheilungen beobachtet werden (Winter 2009).

#### *Enterococcus* spp.

*E. faecalis* und *E. faecium* kommen in der Normalflora des Darms der Tiere vor (Selbitz et al. 2015). Durch Enterokokken entstehen subklinische Mastitiden mit Zellzahlerhöhung, aber auch sporadisch akute Infektionen. *Enterococcus* spp. können eine lange Überlebensdauer in

der Milchdrüse haben. Bei mangelnder Hygiene können Enterokokken ein Herdenproblem darstellen, das oft eine hartnäckige und langwierige Bekämpfung bedarf (Winter 2009).

#### *Escherichia coli*

Als physiologischer Darmbewohner wird *E. coli* über den Kot ausgeschieden und kommt in der Umgebung der Milchkühe ubiquitär vor. Eine Infektion mit *E. coli* hat meist eine perakute oder akute Mastitis mit schwerer Störung des Allgemeinbefindens durch Endotoxinfreisetzung zur Folge. Chronische Fälle mit milden Verlaufsformen sind dagegen selten. Besonders anfällig sind Kühe im Zeitraum um die Geburt, in der Frühlaktation und Kühe mit besonders hoher Milchleistung. Dies ist auf eine herabgesetzte Immunantwort während dieser Zeit zurückzuführen (Burvenich et al. 2003).

#### Koagulase-negative Staphylokokken

Koagulase-negative Staphylokokken umfassen mehrere mastitisrelevante Arten, dazu gehören unter anderem *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. xylosus* und *S. haemolyticus*. Eine Infektion mit KNS tritt meistens in der Frühlaktation auf, oft in Zusammenhang mit einer metabolischen Erkrankung des Gesamtorganismus, wie Ketose oder Azidose, und äußert sich als subklinischen Mastitis, die nur eine Erhöhung der ZZ erkennen lässt (Winter 2009).

#### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* zählt als der bedeutendste Vertreter der kuhassoziierten Mastitiserreger. Milchkühe infizieren sich hauptsächlich während des Melkvorganges, kurz nach dem Abkalben oder in der Trockenstehzeit. *S. aureus* stellt ein Bestandsproblem dar und kann nur durch konsequentes Management und Therapie zum Trockenstellen bekämpft werden (Winter 2009). Denn nicht nur die hohe Kontagiösität, sondern auch die Eigenschaft in Abwehrzellen des Euters zu persistieren und eine intermittierend Ausscheidung, machen eine Diagnose und Bekämpfung schwierig. Neben dem typischen subklinischen Verlauf mit Abfall der Milchleistung und Anstieg der Zellzahl, können auch akute granulomatöse Mastitiden mit bindegewebiger Abkapselung und nekrotisierende Mastitiden mit letalem Ausgang auftreten (Selbitz et al. 2015).

### *Streptococcus dysgalactiae*

Eine Infektion mit *Sc. dysgalactiae* ist meist subklinisch, kann sich aber auch als akute Mastitis mit Sekretveränderungen ohne Störung des Allgemeinbefindens äußern. Oft tritt eine Infektion nach einer Zitzen- oder Euterverletzung auf. Selbst nach Abklingen der Symptome kann der Erreger mehrere Monate bis Jahre in der Milchdrüse überleben (Winter 2009).

### *Streptococcus uberis*

Als Erreger von klinischen und subklinischen Mastitiden ist *Sc. uberis* vor allem in Betrieben mit hohem Infektionsdruck und bei Tieren mit schwachem Immunsystem (Geburt, Früh-laktation) und schlechter Zitzenkondition von Bedeutung. Akute Mastitiden bringen eine Sekretveränderung und Veränderungen des Allgemeinbefindens inklusive Fieber mit sich. Nach ausgeheilter Infektion besteht ein erhebliches Risiko einer Reinfektion, auch chronische und subklinische Mastitiden haben keine guten Heilungschancen (Krömker et al. 2014).

### *Trueperella pyogenes*

Infektionen mit *T. pyogenes* treten vor allem bei Kalbinnen und in der Trockenstehzeit auf, sie werden auch als Sommermastitiden bezeichnet, da der Erreger auch durch Fliegen übertragen werden kann. Oft erfolgt eine Infektion auch nach vorangegangener Euter- oder Zitzenverletzung (Winter 2009). Typisch für *T. pyogenes* Mastitiden ist ein eitrig-abszedierendes Entzündungsgeschehen, das perakut, akut nach Verletzungen, oder chronisch auftreten kann. Es besteht die Gefahr, dass betroffenen Euterviertel in Folge einer *T. pyogenes* Infektion irreparabel geschädigt sind. (Selbitz et al. 2015).

## **2.4 MASTITISDIAGNOSTIK**

Akute Mastitiden werden in der Regel sehr früh erkannt da dem Melker ein verändertes Milchsekret, ein schmerzhaftes und gerötetes Euterviertel und ein verändertes Allgemeinbefinden auffallen. Bei subklinischen Mastitiden ist die Erkennung allerdings schwieriger und erst eine ZZ-Messung durch die Molkerei oder den LKV detektiert eine Erkrankung. Um die ZZ bereits im Stall einschätzen zu können, kann ein California-Mastitis-Test (CMT) durchgeführt. Der CMT ist ein semiquantitativer Test, bei dem mit Hilfe von Alkyl-Aryl-Sulfonat die DNA der in der Milch enthaltenen Zellen aufgelöst wird und es zu einer Viskositätsänderung kommt. Je höher die ZZ, desto dickflüssiger das Milch-

Testflüssigkeits-Gemisch. Die Beurteilung erfolgt dann in ein, zwei oder drei Plus (+):  
+ = 200.000–700.000 Zellen/ml, ++ = 500.000–1.000.000 Zellen/ml, +++ > 1.000.000  
Zellen/ml (Winter 2009).

Für die mikrobiologische Untersuchung von Mastitiserreger wird aus jedem Euterviertel eine Milchprobe aseptisch entnommen. Die bakteriologische Milchuntersuchung mit Ausstrich auf einem nicht selektivem Nährmedium wie beispielsweise Columbia Agar mit 5% Schafblutzusatz ist derzeit der Gold-Standard. Dafür werden 0,01 ml Milch pro Viertel auf der Agarplatte, die in vier Viertel eingeteilt wird, ausgestrichen. Die Untersuchung der bebrüteten Platten erfolgt nach 18–24h und nach 48h. Je nach Fragestellung können auch Selektivnährböden verwendet werden, um die Begleitflora zu unterdrücken und selektiv nur auf eine begrenzte Zahl an verschiedenen Bakterien zu untersuchen, Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von MacConkey Agar für *E. coli* Bestimmung. Sind Kolonien angewachsen, kann anschließend ein Antibiogramm zur Prüfung der Keimempfindlichkeit des Erregers angefertigt werden (Winter 2009).

Die Anzucht von Bakterien zur Differenzierung ist ein zeitintensiver Prozess. Dies kann sich negativ auf die Prognose für das Tier auswirken und höhere Kosten verursachen, wenn eine falsche Wahl der Therapie getroffen wird. In den letzten Jahren hat sich die Mastitisiendiagnose mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) immer mehr etabliert (Koskinen et al. 2010). Die PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem die zuvor extrahierte DNA denaturiert wird, um DNA-Einzelstränge zu erhalten. Mit erregerspezifischen Primern, DNA-Polymerase und Nukleotiden werden die DNA-Einzelsträngen wieder zu Doppelstränge verlängert. Durchschnittlich wird die Reaktion in 25–45 Zyklen wiederholt. Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird zusätzlich ein inaktiver Fluoreszenzfarbstoff gebunden, der bei der Verlängerung der DNA-Stränge aktiv wird. Dadurch kann nicht nur auf das Vorhandensein der Erreger-DNA geschlossen werden, sondern auch die Menge der enthaltenen DNA bestimmt werden. Wird eine Multiplex-qPCR durchgeführt, können mehrere Erreger zugleich in einer Reaktion detektiert werden (Selbitz et al. 2015). Die Mastitisiendiagnostik mittels PCR bietet die Vorteile, dass schneller Ergebnisse vorliegen, eine objektive und automatisierte Interpretation der Ergebnisse möglich ist und eine höhere Sensitivität (89 %) bei der Erregererkennung im Vergleich zur bakteriologischen Milchuntersuchung (77 % Sensitivität)

herrscht. Nachteil der PCR ist, dass auch nichtlebende Mikroorganismen und nur die für die es Primer gibt, detektiert werden, da lediglich das Vorhandensein von DNA nachgewiesen wird. Weiters kann nach dem Erregernachweis kein Antibiotogramm angefertigt werden (Koskinen et al. 2010).

## **2.5 MILCHHYGIENE**

Um qualitativ hochwertige Milch produzieren zu können, ist nicht nur die Eutergesundheit ausschlaggebend, sondern auch der Ablauf des Melkvorganges und das Einhalten von milchhygienischen Maßnahmen (Krömker und Bruckmaier 2007). Als Parameter für die Milchhygiene wird der Keimgehalt in der Tankmilch herangezogen. Der Grenzwert von 100.000 koloniebildende Einheiten (KbE) pro ml darf nicht überschritten werden, um Rohmilch in Verkehr bringen zu dürfen (Bundesministerium für Gesundheit, Sport und Konsumentenschutz). Die Erfassung der Keimzahl in der Tankmilch findet in Österreich mindestens zweimal im Monat statt. Nach Aufbereiten der mit Ethidiumbromid versetzten Milch, erfolgt die Messung der Keime mittels Durchflusszytometrie. Anschließend werden die gemessenen Impulse in eine Bactoscan-Keimzahl/ml umgerechnet, welche dem EU-Standard entspricht (Agrar Markt Austria). Die Keimzahl ergibt sich durch die bakterielle Kontamination des Euters, Oberflächen der Melkanlage, Milchtank und auch Milchbearbeitungsgeräten. Beeinflusst wird der Keimgehalt durch die Hygiene der Umgebung, Sauberkeit der Kuh, die Umgebung in der gemolken wird, die Vorreinigung des Euters, die Reinigung und Desinfektion der Gerätschaften und Kühlung der Milch im Tank. Bei erhöhtem Keimgehalt sollte immer das Melkmanagement, die Reinigung und Desinfektion der Melkanlage, sowie der Zustand der Melkanlage (Zitzengummis, Milchschräuche, Sammelstück usw.) überprüft werden. Auch Probleme bei der Milchkühlung, wie dass z.B. die Zieltemperatur nicht oder nicht schnell genug erreicht wird, könnten ein Grund für erhöhte Keimgehalte sein (Deutz und Obritzhauser 2003).

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

---

Als Grundlage der Arbeit dienten zum einen die LKV Daten von 22 österreichischen Milchviehbetrieben, deren zugehörige Tankmilchdaten und Liefermengen der Molkereien. Zum anderen wurden Milchproben von acht der 22 Betrieben gesammelt, dabei handelte es sich um je 16 Sammelgemelksproben einzelner Kühe und Tankmilchproben, die anschließend mittels PathoProof Complete 16 Kit untersucht und ausgewertet wurden.

#### **3.1 BETRIEBSDATEN**

Die Datensammlung und Probenahmen fand in der Zeitspanne von 1. April 2018 bis 2. April 2019 statt. Im Zuge der Datensammlung waren mehrere praktizierende Tierärzte bereit für eine Zusammenarbeit und somit konnten die Betriebe anhand von Betriebsgröße (Kühe in Milch) und der durchschnittlichen Tankmilch-ZZ vom Vorjahr (Durchschnitt 2017) ausgewählt werden. Die durchschnittliche Tierzahl lag bei 30 Kühe, wovon durchschnittlich 26 Kühe in Milch waren, der kleinste Betrieb hatte im Durchschnitt 13 Kühe, davon 11 Tiere in Milch und der größte Betrieb durchschnittlich 76 Kühe, davon 68 Tiere in Milch. Acht der 22 Betriebe wurden in Anbindehaltung mit Rohrmelkanlage geführt, die restlichen Betriebe waren Laufstallbetriebe mit unterschiedlichen Melksystemen.

Die Betriebe wurden nach ihrer durchschnittlichen Tankmilch-ZZ im Jahr 2017 in zwei ZZ-Klassen eingeteilt, Klasse 1 bis 200.000 Zellen und Klasse 2 ab 200.000 Zellen in der Tankmilch. In Tabelle 1. ist eine Aufstellung der Betriebe mit Haltungsform, Hauptrasse, Melkanlage, Vermarktung, ZZ-Klasse und Anzahl der Kühe in Milch.

**Tab. 1:** Betriebsaufstellung; FV = Fleckvieh, BV = Braunvieh, HF = Holstein-Friesian, ZZ-Klassen = Zellzahlklassen, AB = Anbindehaltung, LF = Laufstallhaltung

Lfd Nr. Betrieb	Haltungsform	Haupttrasse	Melkanlage	Vermarktung	ZZ-Klasse	Kühe in Milch
1	AB	FV	Rohrmelkanlage	Biowiesenmilch	1	15
2	AB	BV	Rohrmelkanlage	Gentechnikfrei	2	16
3	LF	HF	Melkroboter	Bio	2	68
4	AB	BV	Rohrmelkanlage	Gentechnikfrei	2	18
5	LF	FV	Tandemmelkstand	Bio	2	36
6	AB	FV	Rohrmelkanlage	Gentechnikfrei	1	11
7	LF	HF	Roboter	Gentechnikfrei	1	48
8	LF	FV	Fischgrätmelkstand	Gentechnikfrei	1	17
9	LF	FV	Tandemmelkstand	Gentechnikfrei	1	24
10	LF	HF	Fischgrätmelkstand	Gentechnikfrei	2	25
11	AB	BV	Rohrmelkanlage	Gentechnikfrei	1	13
12	AB	FV	Rohrmelkanlage	Gentechnikfrei	1	15
13	LF	BV	Fischgrätmelkstand	Gentechnikfrei	2	41
14	LF	FV	Rohrmelkanlage	Biowiesenmilch	1	23
15	LF	HF	Side by Side	Gentechnikfrei	2	27
16	LF	FV	Fischgrätmelkstand	Gentechnikfrei	1	11
17	LF	HF	Fischgrätmelkstand	Gentechnikfrei	2	20
18	AB	FV	Rohrmelkanlage	Gentechnikfrei	1	24
19	LF	BV; HF	Fischgrätmelkstand	Gentechnikfrei	2	48
20	LF	BV	Tandemmelkstand	Gentechnikfrei	1	34
21	LF	FV	Melkstand	Biowiesenmilch	1	24
22	AB	FV	Rohrmelkanlage	Gentechnikfrei	2	18

### 3.2 DATENERHEBUNG

Von den 22 Betrieben wurden die LKV Monatsberichte zur Verfügung gestellt, die in den 12 Monaten der Datensammlung durchschnittlich 10-mal vom LKV der Bundesländer erstellt wurden. Dabei wurden folgende tierbezogenen Daten pro Monat zur weiteren Analyse herangezogen: Anzahl der Kühe, Kühe in Milch, Laktationszahl der Kühe, Tage in Milch,

Anzahl der belegten Tiere, Belegdatum, Abkalbedatum, gesamte Milchkilogramm des Betriebes, Milchkilogramm pro Kuh, sowie die Milchinhaltsstoffe Fett in Prozent, Eiweiß in Prozent, ZZ/ml, Fett-Eiweiß-Quotient und Harnstoff in mg/dl. Mit dem Datum der letzten Abkalbung und dem Datum der erfolgreichen Belegung wurde auch die Günstzeit der Kühe errechnet. Aus den gewonnenen Daten der Einzelkühe wurde ein monatlicher Durchschnitt des jeweiligen Betriebes erstellt, um einen Jahresüberblick zu bekommen und eine Vergleichsbasis mit den anderen Betrieben zu erhalten.

Neben den LKV Monatsberichten wurden für diese Studie die Tankmilchberichte der 22 Betriebe von den belieferten Molkereien zur Verfügung gestellt. Diese bestanden aus der Liefermenge pro Abholung, und den folgenden Milchinhaltsstoffen der Tankmilch: Fett in Prozent, Eiweiß in Prozent, KbE/ml, ZZ/ml, Gefrierzahl in °C, fettfreie Trockenmasse, Laktose in Prozent und Harnstoff in mg/dl. Die Inhaltsstoffe der Tankmilch wurden pro Monat durchschnittlich viermal erstellt. Es wurden die durchschnittliche Liefermenge pro Tag sowie Gesamtliefermenge und Inhaltsstoffe pro Monat ausgerechnet und verglichen. Die nächstgelegenen tatsächlichen Tankmilchmengen und -ZZ wurden mit der theoretischen Herdenleistung und Tankmilch-ZZ, erhoben aus den LKV Monatskontrolle, verglichen.

### **3.3 PROBENAHE**

Auf acht der 22 Betriebe (vier ZZ-Klasse 1, vier ZZ-Klasse 2) wurden dreimal in der Zeitspanne der Datensammlung (Sommer, Winter, Frühjahr) Milchproben gezogen. Dabei wurden von 16 Kühen pro Betrieb Sammelgemelksproben aller vier Viertel während einer Melkzeit genommen. Die Zitzenhaut wurde vorgereinigt, wie es auf den jeweiligen Betrieb üblich ist, danach erfolgte eine aseptische Milchprobenentnahme. Zuerst erfolgte die Reinigung der Strickkanalöffnung mit in Alkohol (70%) getränkter Watte, beginnend bei den beiden Zitzen, die fern des Probenehmers sind und fortführen in Z-förmiger Reihenfolge in Richtung des Probenehmers. Die Probennahme erfolgte in umgekehrter Reihenfolge (Baumgartner 2018). Für die Untersuchung der Sammelgemelksproben wurden 15 ml Milch in sterile 50 ml Falcon Röhrchen gemolken. Neben den Sammelgemelksproben wurden auch Proben von der Tankmilch genommen, zu jeweils 3 x 50 ml pro Betrieb, ebenfalls in 50 ml Falcon Röhrchen.

Die gewonnenen Proben wurden anschließend mit dem PathoProof Complete 16-Kit (ThermoFisher Scientific, Austria) untersucht. Dieser Kit beinhaltet die Reagenzien für die DNA-Extraktion und DNA-Isolierung sowie Reagenzien für eine multiplex qPCR.

### **3.4 DNA-EXTRAKTION**

Die DNA-Extraktion und DNA-Isolierung der Milchproben befolgte das Protokoll des PathoProof Complete Kits mit einem zusätzlichen Erhitzungsschritt, Enzymverdau mit Lysozym und Proteinase-K Inkubation über Nacht (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Als erster Schritt wurden die je 15 ml Sammelgemelksproben bzw. 50 ml Tankmilchproben in den Falcon-Röhrchen für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (3.180 g, 18,7 cm Radius, 3.900 rpm; Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Danach wurde der flüssige Überstand und einen Teil der Fettphase mit einem Pipetboy und einer 15 ml serologischen Pipette entfernt, etwa 2 ml des Milchüberstandes und der Teil der Fettphase verblieben im Röhrchen. Am Boden der Falcon-Röhrchen war nun das abgesetzte Pellet mit der DNA, die beim Abpipettieren des Überstandes nicht berührt wurden. Die Pellets der Proben wurde mitsamt restlicher Milch und Fettphase je in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt und für 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert (Tischzentrifuge 5424, Eppendorf). Anschließend wurden die überstehende Milch und die Fettphase mit der Pipette entfernt. Als nächster Schritt wurde eine Mischung aus 7 µl Proteinase-K (bei -20 °C gelagert) und 350 µl Lysis-Solution-1 hergestellt und 350 µl davon zu jeder Probe gegeben, wobei die Pellets mit der Pipettenspitze aufgelöst und die Proben danach gevortext wurde bis Milch, Fett und Lösung vollständig vermischt waren. Darauf folgte ein Inkubationsschritt bei 55 °C für 5 Minuten und anschließend Zentrifugation bei 5.000 g für 5 min. Als nächster Schritt wurde wiederum das flüssige Fett und der flüssige Überstand mit einer Pipette entfernt. Zum verbliebenen Pellet wurden 100 µl Lysis-Solution-2 (bei -20 °C gelagert) zugefügt und es folgte ein mechanisches Auflösen der Pellets mit der Pipettenspitze. Anschließend wurden 20 µl Lysozym (20 mg/ml, bei -20 °C gelagert) zu jeder Probe zugefügt. Danach folgte wieder Vortexen bis die Probe sich homogen darstellte und ein Inkubationsschritt bei 37 °C für 1 Stunde mit Schütteln bei 125 rpm. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe einer Mischung aus 20 µl Proteinase-K und 200 µl Puffer AL zu jeder Probe und 15 Sekunden Vortexen. Der Proteinverdau mit Proteinase-K

wurde über Nacht bei 55 °C unter Schütteln bei 300 rpm durchgeführt. Nach dieser Inkubation wurde der Inkubator für 10 Minuten auf 70 °C ohne schütteln gestellt. Zu jeder Probe erfolgte anschließend eine Zugabe von 200 µl Ethanol (96–100 %), 30 Sekunden Vortexen und Zentrifugieren bei 5.000 g für 30 Sekunden. Eine noch übrig gebliebene Fettphase wurde entfernt und der Überstand mit Pellet für mindestens 30 Sekunden gevortext. Der Überstand wurde auf die QIAmp Mini Spin-Säulen aufgetragen und bei 20.000 g für 1 Minute zentrifugiert, anschließend wurden die Spin-Säulen in neue Sammelröhrchen geben. Auf die Spin-Säulen kamen 500 µl Puffer AW1 und anschließend wurde bei 20.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen wieder in die Sammelröhrchen einsetzt. Darauf wurden 500 µl Puffer AW2 dazugegeben, bei 20.000 g für 3 Minuten zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Die Zentrifugation wurde noch einmal bei 20.000 g wiederholt. Die Spin-Säulen wurden anschließend in einen 1,5 ml Eppendorf Gefäß übersetzt und 50 µl DEPC-Wasser, erhitzt auf 70 °C, in die Mitte der Spin-Säulen pipettiert anschließend bei 20.000 g für 3 Minuten zentrifugiert, um die DNA zu eluieren. Es folgte ein zweiter Elutionsschritt mit 50 µl 70 °C heißem DEPC-Wasser. Anschließend wurden die Spin-Säulen verworfen und die extrahierte DNA in frische Eppendorf Röhrchen pipettiert und bei -20 °C gelagert (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 3.5 REAL-TIME PCR

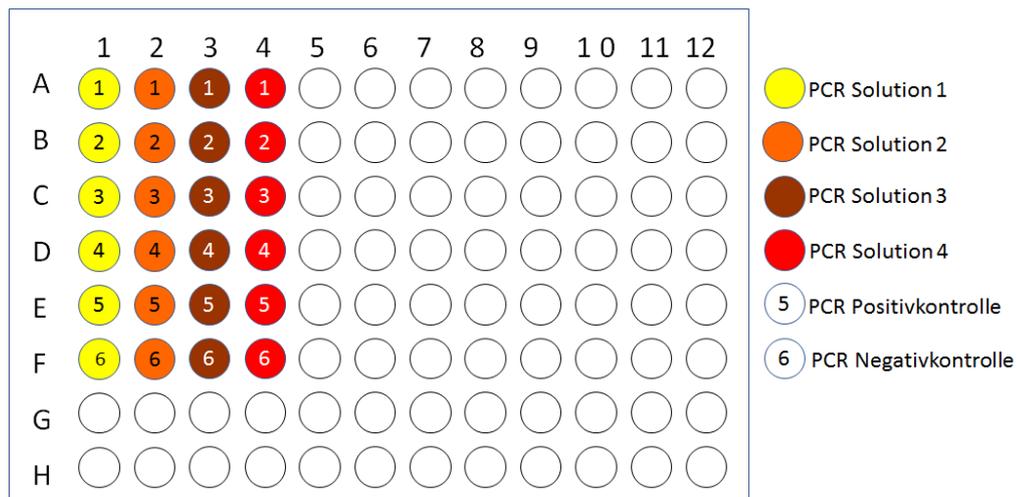
Die zuvor extrahierte DNA wurde mittels quantitativer PCR des PathoProof Complete Kits weiter untersucht. Durch diesen Kit wurden die Proben auf folgende Pathogene untersucht: *C. bovis*, *Enterococcus* spp. (*E. faecalis* und *E. faecium*), *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *S. aureus*, *Staphylococcal*  $\beta$ -Laktamase-Gen, *Staphylococcus* spp., *Sc. agalactiae*, *Sc. dysgalactiae*, *Sc. uberis* und *T. pyogenes*. Weiters könnten durch diesen Kit auch *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma* spp., *Prototheca* spp. und Hefen nachgewiesen werden, diese Untersuchung wurde allerdings nicht durchgeführt.

Bei jedem qPCR Ansatz wurde zusätzlich je eine Template-Negativprobe (nur Master Mix) und Positivprobe (Universal Amplifikation Standard, inkludierte alle Targets) zur Kontrolle der Reaktion mitlaufen lassen.

Aus den aufgetauten PathoProof Master Mix und PathoProof Primer Mixes 1-4 aus dem Kit wurden vier verschiedene PCR-Solutions hergestellt. Verwendet wurden je 11 µl Master Mix und 5,5 µl des jeweiligen Primer Mixes pro Probe. Diese PCR-Solutions detektierten je drei Pathogene und enthielten jeweils eine Interne-Amplifikations-Kontrolle (IAC),

- Solution 1: *C. bovis*, *Enterococcus* spp. und *S. aureus*
- Solution 2: *E. coli*, *Sc. dysgalactiae* und *Staphylococcal* β-Laktamase-Gen
- Solution 3: *Sc. agalactiae*, *Sc. uberis*, *Staphylococcus* spp.
- Solution 4: *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* und *T. pyogenes*

Von jeder PCR-Solution wurden nach dem Schema von Abbildung 1 je 15 µl in eine Vertiefung einer Deepwell 96 well plate pipettiert.



**Abb.: 1:** Schematische Darstellung für fünf verschiedene Proben und eine Negativkontrolle der PCR, Negativkontrollen sind immer in der letzten Vertiefung (hier Reihe F) (Thermo Fisher Scientific Inc.).

In alle Reaktionsgefäße kamen 5 µl extrahierte Template-DNA, wobei pro Probe für jeden PCR-Mix eine Reaktion ablief. Die letzte Reihe der Wells war immer der PCR-Negativprobe vorbehalten, die vorletzte der PCR-Positivkontrolle (Abbildung 1). Die befüllte PCR-Gefäße wurde mit einem optisch klaren Deckel verschlossen und bei 1.500 g für 5 Sekunden auf einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Die Einstellung des Thermocyclers, (Mx3000P, Thermofisher Scientific, Austria), erfolgte nach dem PathoProof Complet Kit Protokoll. Der erste DNA-Denaturierungsschritt fand für

10 Minuten bei 95 °C statt. Die anschließenden Zyklen bestanden aus Erhitzen auf 95 °C für 5 Sekunden und Abkühlen auf 60 °C für 60 Sekunden, mit 40 Zyklen Wiederholung.

Der verwendete Farbstoffe FAM detektierte *Staphylococcus* spp., *Staphylococcal*  $\beta$ -Laktamase-Gen, *Klebsiella pneumoniae* und *S. aureus*, CY5 detektierte *Sc. uberis*, *C. bovis*, *Sc. dysgalactiae*, *T. pyogenes* und *Peptoniphilus indolicus*, JOE detektierte *Serratia marcescens*, *Enterococcus* spp., *E. coli* und *Sc. agalactiae*. Der Farbstoff ROX wurde für den IAC (Internal Amplification Control) verwendet. Da es für den Farbstoff ATTA bei diesem Thermocycler Modell keinen Eingang gab, wurden die zugeordneten Pathogene (Hefen, Prototheken und Mykoplasmen) in dieser Arbeit nicht behandelt.

Die Ergebnisse der qPCR wurden als Excel Datei exportiert. Negativ Kontrollen und PCR Positiv Kontrollen waren ausschließlich negativ, bzw. positiv. Ergebnisse mit einem Cycle threshold (Ct) > 37 wurden als negativ eingestuft. Die Ct-Werte der jeweiligen Bakterien wurden mittels einer von Thermofisher zur Verfügung gestellter Formel in bakterielle DNA-Kopienzahl/ml Milch umgerechnet. Die zwei Pathogene mit der höchsten Kopienzahl in einer Probe wurden als Leitkeime dieser Probe definiert und für die statistische Auswertung herangezogen.

### 3.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Datensammlung und Vorbereitung erfolgten im Microsoft Excel, die anschließende statistische Analyse wurde mit RStudio (Version 1.2.5033) durchgeführt.

Für die deskriptive Statistik wurden diverse Lage- und Streuungsmaße tabellarisch angegeben, wobei auf Grund der Datenverteilung der Median als Lagemaß vorzuziehen war. Sowohl für den Mittelwert als auch für den Median wurden mittels eines Bias korrigierten und angepassten Bootstrap Methode (BCa) obere und untere 95 % Konfidenzintervalle ermittelt.

Für die vergleichende Statistik wurden die Daten mittels Shapiro Wilk Tests, Q-Q Plots und Histogrammen auf Normalverteilung getestet. ZZ und Keimzahl wurde für die vergleichende Statistik log<sub>10</sub>-, die restlichen Parameter Wurzeltransformiert, um eine Normalverteilung der Daten zu erhalten. Es erfolgte eine erneute Überprüfung der Normalverteilung nach der

Transformation. Die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Levene Test überprüft. Normalverteilte Daten mit homogenen Varianzen wurden in Abhängigkeit der Anzahl der Gruppen mittels t-Test (2 Gruppen) oder One-way-ANOVA (>2 Gruppen) analysiert. Die Post hoc Testung erfolgte mittels Tukey HSD Test. Bei Varianzheterogenität, aber vorliegender Normalverteilung der Daten, wurde mittels Welch's t-Test (2 Gruppen) oder Welch's ANOVA (>2 Gruppen) für nicht homogene Varianzen analysiert. Die Post hoc Testung erfolgte mittels Games Howell Test. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels Mann-Whitney U Test (2 Gruppen) bzw. Kruskal Wallis Test (>2 Gruppen) analysiert. Die Post hoc Testung erfolgte mittels Dunn Test. Für die Korrelationen wurde das Spearman Korrelationsmaß verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

---

### 4.1 STICHPROBENBESCHREIBUNG

Der Median der Betriebsgröße der Stichprobe war 34 Rinder pro Betrieb. Bezogen auf die Rasse ergab sich dabei ein Anteil der Hauptrasse Fleckvieh von 70 % in den kleinen, und 40 % in großen Betrieben. Bei den Einzeltieruntersuchungen wurden für die Kalkulationen insgesamt Daten von 882 verschiedenen Rindern berücksichtigt. Davon stammen 194 (22,0 %) aus Braunviehbetrieben, 330 (37,4 %) aus Fleckviehbetrieben, 285 (32,3 %) aus Holstein Friesian Betrieben und 73 (8,3 %) aus Betrieben mit gleichen Anteilen Braunvieh und Holstein Friesian.

Bei den Betrieben mit Anbindehaltung (36,4 % der Gesamtstichprobe) waren 87,5 % kleine Betriebe, hatten als Hauptrassen Fleckvieh (62,5 %) und Braunvieh (37,5 %), und 87,5 % vermarkteten ihre Milch als gentechnikfrei und 12,5 % als Biowiesenmilch. Bei den Laufstallbetrieben hingegen waren 71,4 % große Betriebe, 71,4 % davon vermarkteten ihre Milch als Gentechnik frei und die Hauptrassen waren Fleckvieh (42,9 %) und Holstein Friesian (34,7 %).

### 4.2 MILCHINHALTSSTOFFE

Die deskriptive Beschreibung der Milchhaltsstoffe Milchfett, Milcheiweiß und Harnstoff sind in Tabelle 2 zusammengefasst, wobei auch die Werte für jahreszeitliche Schwankungen, Haltungsform, und ZZ-Klasse getrennt aufgelistet sind. Ergebnisse der paarweisen Vergleiche und Korrelationsanalysen von Fett, Eiweiß und Harnstoff der jahreszeitlichen Änderungen, Haltungsform und ZZ-Klassen für Einzeltierdaten und Tankmilch sind in Tabelle 3 angeführt. Dabei zeigen sich im Sommer signifikant niedrigere Milchfettgehalte und Milcheiweißgehalte, sowohl in der Tankmilch als auch bei den Einzeltieren, bei Milcheiweiß sind zusätzlich noch signifikant niedrigere Gehalte im Oktober festgestellt worden. Der Harnstoffgehalt dagegen ist sowohl in der Tankmilch als auch bei den Einzeltieren im Sommer signifikant höher.

**Tab. 2:** Deskriptiven Statistik (Minimum, Maximum, Median, Standardabweichung (Stabw)) der Inhaltstoffe Milchfett, Milcheiweiß und Harnstoff aller 22 Betriebe für Einzeltier- und Tankmilchproben. Weiteres sind Jahresminimum und -maximum, Werte nach ZZ-Klassen, Betriebsgröße und Haltungsform angegeben.

	Milchfett (%)		Milcheiweiß (%)		Harnstoff (mg/dl)	
	Einzeltiere	Tankmilch	Einzeltiere	Tankmilch	Einzeltiere	Tankmilch
<b>Minimum</b>	1,50	3,66	1,38	2,88	0,96	12,15
<b>Maximum</b>	8,88	4,80	5,68	3,99	87,00	47,68
<b>Mittelwert</b>	4,29	4,25	3,52	3,42	23,30	24,40
<b>Median</b>	4,24	4,63	3,50	3,42	22,90	24,20
<b>Stabw</b>	0,77	0,20	0,41	0,20	8,30	5,50
<b>Schwankung übers Jahr Minimum</b>	4,03 Jun 2018	4,08 Aug 2018	3,38 Jul 2018	3,34 Aug 2018	20,00 Jun 2018, Nov 2018	22,20 Mär 2019
<b>Schwankung übers Jahr Maximum</b>	4,44 Jän 2019	4,44 Jän 2019	3,62 Jän 2019	3,55 Nov 2018	27,50 Sept 2018	27,50 Aug 2018
<b>Betriebe ZZ-Klasse 1</b>	4,21	4,29	4,47	3,40	23,00	25,10
<b>Betriebe ZZ-Klasse 2</b>	4,31	4,20	4,63	3,41	22,00	23,30
<b>Anbindehaltung</b>	4,24	4,18	3,44	3,37	24,00	25,80
<b>Laufstallhaltung</b>	4,23	4,26	3,52	3,43	23,00	23,90
<b>Kleine Betriebe (&lt;34)</b>	4,23	4,17	3,44	3,37	24,00	26,80
<b>Große Betriebe (&gt;34)</b>	4,23	4,29	3,52	3,44	22,00	22,80

**Tab. 3:** Ergebnisse der vergleichenden Statistik für Milchfett, Milcheiweiß und Harnstoffgehalt

	Milchfett (%)		Milcheiweiß (%)		Harnstoff (mg/dl)	
	Einzeltiere	Tankmilch	Einzeltiere	Tankmilch	Einzeltiere	Tankmilch
<b>Jahreszeitliche Schwankung</b>	signifikant niedrigere Fettgehalte im Jun, Jul, Aug ( $p < 0,001$ )		signifikant niedrigere Eiweißgehalte im Aug, Okt, auch in der Tankmilch feststellbar ( $p < 0,001$ )		signifikant höhere Harnstoffgehalte im Sommer ( $p < 0,001$ )	signifikant höhere Harnstoffgehalte im Sommer ( $p < 0,031$ )
<b>Haltungsform</b>	Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,213$ )	signifikant niedriger bei Anbindehaltung ( $p = 0,036$ )	signifikant niedriger bei Anbindehaltung ( $p = 0,003$ )	signifikant niedriger bei Anbindehaltung ( $p = 0,003$ )	signifikant höher bei Anbindehaltung ( $p = 0,015$ )	Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,189$ )
<b>ZZ-Klasse</b>	ZZ-Klasse 1 signifikant niedrigerer Fettgehalte ( $p < 0,001$ )	ZZ-Klasse 1 signifikant niedrigere Fettgehalte ( $p = 0,015$ )	ZZ-Klasse 1 signifikant niedrigere Eiweißgehalte ( $p < 0,001$ )	Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,665$ )	ZZ-Klasse 1 signifikant höhere Harnstoffgehalte ( $p = 0,002$ )	Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,313$ )
<b>Betriebsgröße</b>	kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,790$ )	kleine Betriebe signifikant niedrigere Fettgehalt ( $p < 0,001$ )	kleinen Betrieben signifikant niedrigere Eiweißgehalte ( $p < 0,001$ )	kleinen Betrieben signifikant niedrigere Eiweißgehalte ( $p < 0,001$ )	kleinen Betrieben signifikant höhere Harnstoffgehalte ( $p < 0,001$ )	kleinen Betrieben signifikant höhere Harnstoffgehalte ( $p < 0,001$ )
<b>Korrelation mit Milchmenge</b>	negative Korrelation ( $R = -0,27$ )	schwach positiv ( $R = 0,14$ )	negative Korrelation; ( $R = -0,34$ )	schwach positiv ( $R = 0,22$ )	keine Korrelation ( $R = 0,04$ )	Keine Korrelation ( $R = -0,06$ )
<b>Korrelation mit ZZ</b>	schwach positive Korrelation ( $R = 0,14$ )	Keine Korrelation ( $R = 0,06$ )	mittlere positive Korrelation ( $R = 0,22$ )	Keine Korrelation ( $R = -0,01$ )	keine Korrelation ( $R = -0,06$ )	Keine Korrelation ( $R = -0,03$ )
<b>Korrelation Einzeltierdaten mit Tankmilchgehalt</b>	positive lineare Korrelation ( $R = 0,55$ )		positive lineare Korrelation ( $R = 0,91$ )		positive lineare Korrelation ( $R = 0,75$ )	

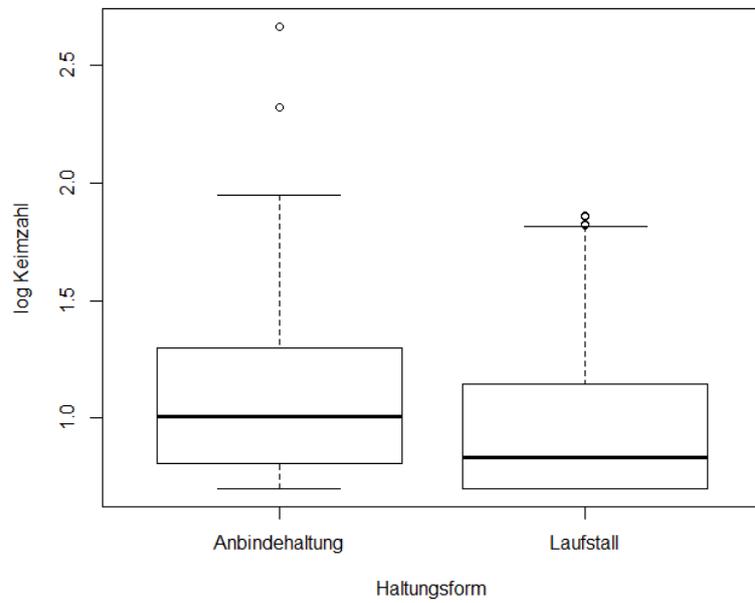
#### 4.2.1 Keimzahl

Die Keimzahl der Tankmilchproben betrug zwischen 5.000 und 209.000 KbE/ml, hatte einen Mittelwert von 15.982 KbE/ml, Median von 8.250 KbE/ml und eine Stabw von 22.825 KbE/ml, mit jahreszeitlichen Schwankungen des Median zwischen 5.667 KbE/ml (Dezember) und 11.667 KbE/ml (Jänner). Im Gegensatz zu den Milchinhaltsstoffen Fett, Eiweiß und Harnstoff zeigte sich bei der Keimzahl der Tankmilch jedoch kein deutlicher jahreszeitabhängiger Verlauf, und auch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Monaten ( $p = 0,164$ ).

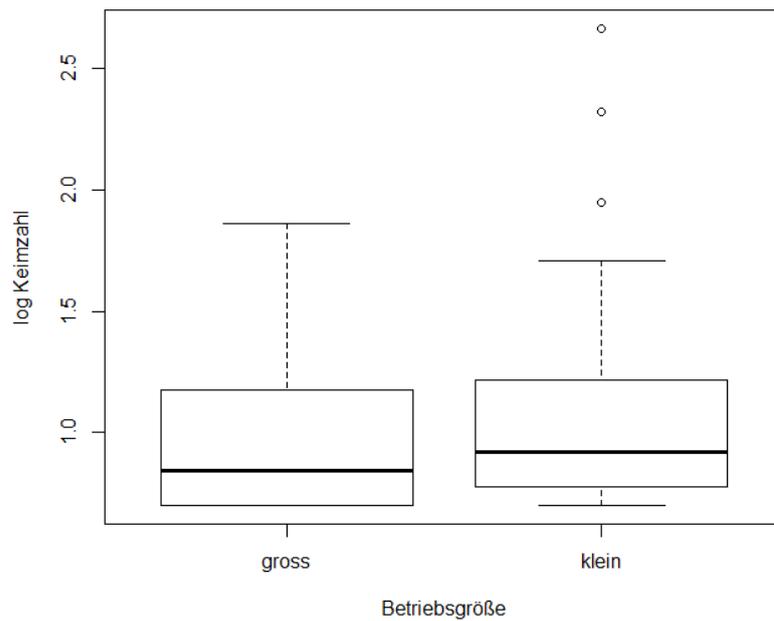
Beim Vergleich der Haltungssysteme ergaben sich folgende Tankmilch-Keimzahlen: in Anbindehaltung im Median 10.167 KbE/ml, Mittelwert 20.832 KbE/ml, Stabw. 51.129 KbE/ml und in Laufstallhaltung im Median 6.833 KbE/ml, Mittelwert 13.210 KbE/ml, Stabw 14.439 KbE/ml, mit signifikant höheren Werten bei Betrieben mit Anbindehaltung ( $p = 0,001$ ) (Abb. 2).

Kleine Betriebe hatten eine Keimzahl im Median von 31.260 KbE/ml mit einer Stabw von 44.191 KbE/ml und große Betriebe einen Median von 16.860 KbE/ml mit einer Stabw von 15.052 KbE/ml (Abb. 3) Es besteht ein signifikanter Unterschied der Keimzahl je nach Betriebsgröße ( $p = 0,045$ ).

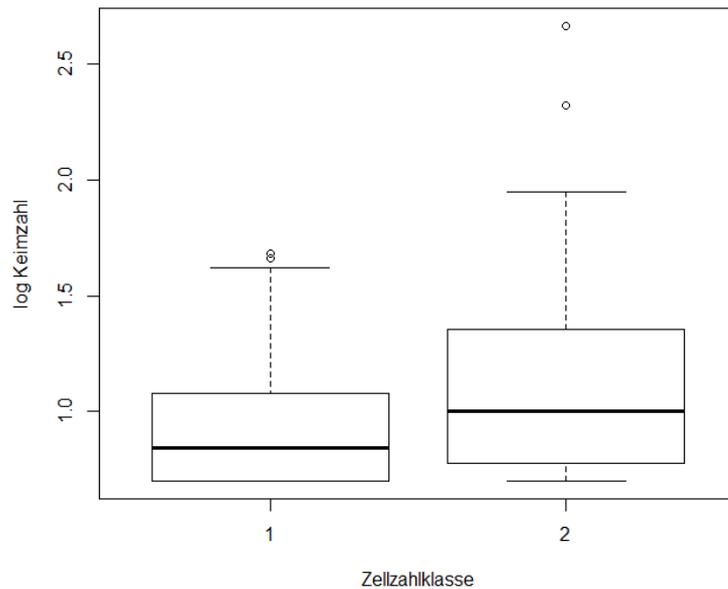
Betriebe in ZZ-Klasse 1 hatten in der Tankmilch Keimzahlen im Median von 7.000 KbE/ml und einem Mittelwert von 10.388 KbE/ml, Betriebe der ZZ-Klasse 2 im Median von 10.000 KbE/ml und Mittelwert 22.694 KbE/ml (Abb. 4). Die ZZ-Klassen wiesen einen signifikanten Unterschied zwischen der Keimzahl im Tank auf ( $p < 0,001$ ). Die Korrelation der Keimzahl mit der ZZ in der Tankmilch zeigte nur einen geringen positiven Zusammenhang ( $R = 0.26, p < 0,001$ ).



**Abb. 2:** Tankmilch-Keimzahl nach Haltungsformen  
Darstellung der Keimzahlgehalte (log formiert, KbE/ml) in der Tankmilch der zwei Haltungsformen Anbindehaltung und Laufstallhaltung ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 3:** Tankmilch-Keimzahl bei unterschiedlichen Betriebsgrößen  
Darstellung der Keimzahlgehalte (log formiert, KbE/ml) in der Tankmilch von großen ( $\geq 34$  Rindern) und kleinen ( $< 34$  Rindern) Betrieben ( $p = 0,045$ ).

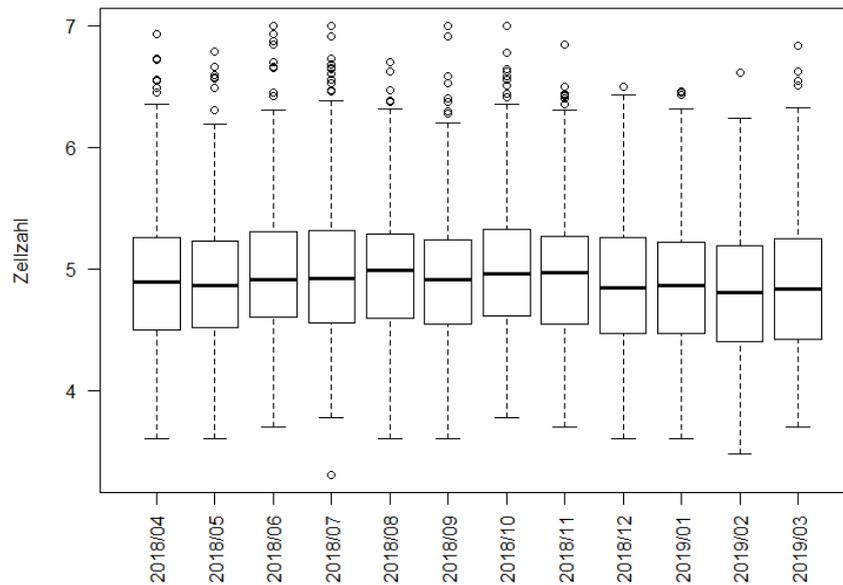


**Abb. 4:** Tankmilch-Keimzahl bei Einteilung in ZZ-Klassen

Darstellung der Keimzahlgehalte (log formiert, KbE/ml) in der Tankmilch der zwei ZZ-Klassen (ZZ-Klasse 1 <200.000 Zellen/ml, ZZ-Klasse 2 >200.000/ml) ( $p < 0,001$ ).

#### 4.2.2 Zellzahl

Die ZZ der Einzeltiere aller Betriebe war im Minimum 2.000 Zellen/ml, Maximum 9.999.000 Zellen/ml, Mittelwert von 223.367 Zellen/ml, Median 78.958 Zellen/ml und hatte eine Stabw von 583.832 Zellen/ml. Die Schwankungen des Medians der Einzeltier-ZZ übers Jahr reichten von 63.000 Zellen/ml im Februar bis 96.000 Zellen/ml im August, es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Einzeltier-ZZ in den Monaten Mai – November ( $p < 0,001$ ; Abb. 5). In der Tankmilch bewegte sich der ZZ-Gehalt zwischen 20.667 Zellen/ml und 425.000 Zellen/ml, mit einem Mittelwert von 139.393 Zellen/ml, Median von 134.033 Zellen/ml, einer Stabw von 77.735 Zellen/ml und einer Schwankung des Medians während des Jahres von 99.900 Zellen/ml (März) bis 169.500 Zellen/ml (Juni). Die monatlichen Unterschiede der Tankmilch-ZZ waren nicht signifikant ( $p = 0,116$ ).



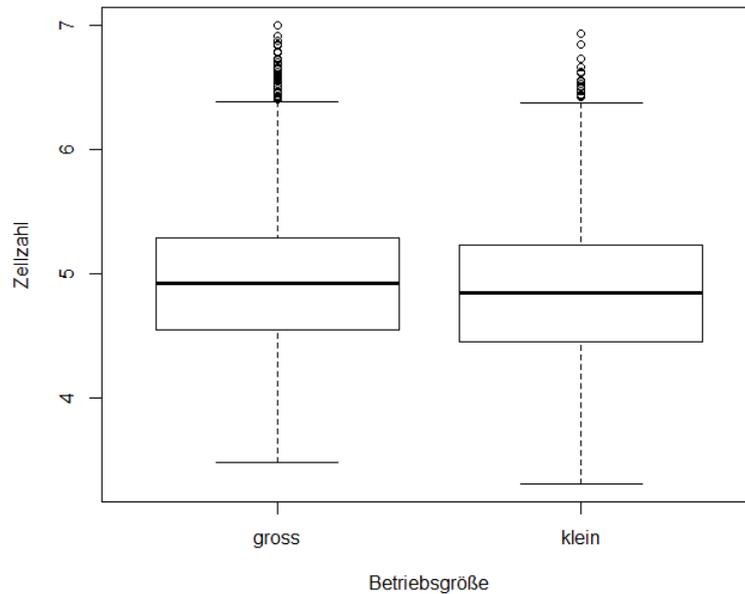
**Abb. 5:** Einzeltier-ZZ im Jahresverlauf

Die Einzeltier-ZZ sind im Jahresverlauf des Probejahres dargestellt. Die ZZ von Mai bis November sind signifikant höher als im Rest des Jahres ( $p < 0,001$ ).

Die Einzeltier-ZZ der Betriebe in ZZ-Klasse 1 betragen im Median 53.000 Zellen/ml mit einer Stabw von 50.629 Zellen/ml, der Mittelwert lag bei 67.946 Zellen/ml. In ZZ-Klasse 2 lag der Median der Einzeltier-ZZ bei 268.000 Zellen/ml und einer Stabw von 54.200 Zellen/ml, der Mittelwert lag bei 275.790 Zellen/ml. Betriebe in ZZ-Klasse 1 hatten Tankmilch-ZZ im Median von 79.000 Zellen/ml, Mittelwert 94.046 Zellen/ml und einer Stabw von 53.869 Zellen/ml. Betriebe in ZZ-Klasse 2 ZZ im Median von 176.000 Zellen/ml, Mittelwert 193.898 Zellen/ml und einer Stabw von 73.453 Zellen/ml.

Betriebe mit Anbindehaltung hatten Einzeltier-ZZ im Median von 83.000 Zellen/ml, Mittelwert von 222.284 Zellen/ml und einer Stabw von 630.168 Zellen/ml. Betriebe mit Laufstallhaltung im Median 77.000 Zellen/ml, Mittelwert 223.363 Zellen/ml, Stabw 622.869 Zellen/ml. Die ZZ der Tankmilch von Betrieben mit Anbindehaltung betrug im Median 129.000 Zellen/ml, Mittelwert 135147 Zellen/ml mit einer Stabw von 74.453 Zellen/ml. Betriebe mit Laufstallhaltung hatten im Tank ZZ im Median von 132.250 Zellen/ml, Mittelwert 142.105 Zellen/ml und einer Stabw von 84.112 Zellen/ml. Hier konnte weder bei den Einzeltier-ZZ ( $p = 0,062$ ) noch bei der Tankmilch-ZZ ( $p = 0,703$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den Haltungsformen festgestellt werden.

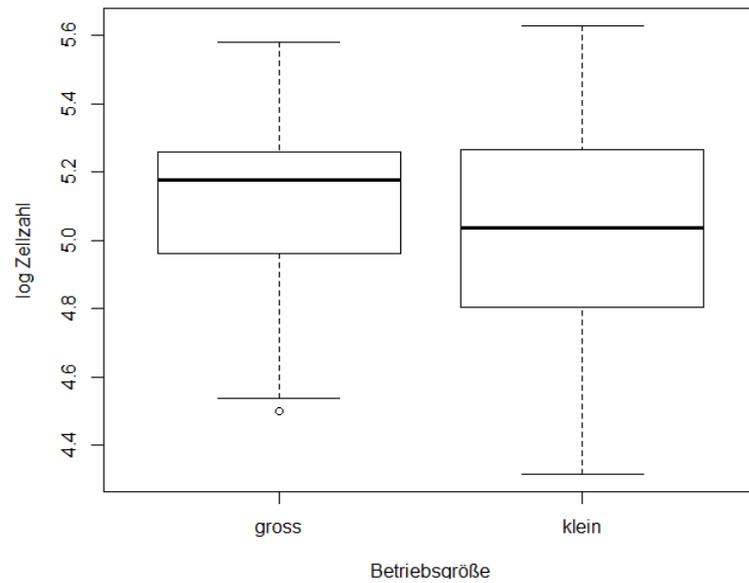
Der Unterschied der Einzeltier-ZZ von großen Betrieben (Median 83.000 Zellen/ml, Mittelwert 235.617 Zellen/ml, Stabw 664.282 Zellen/ml) und kleinen Betrieben (Median 70.000 Zellen/ml, Mittelwert 195.724 Zellen/ml, Stabw 252.897 Zellen/ml) war signifikant ( $p < 0,001$ ; Abb. 6).



**Abb. 6:** Einzeltier-ZZ nach Betriebsgröße

Darstellung der Einzeltier-ZZ großer ( $\geq 34$  Rinder) und kleiner ( $< 34$  Rinder) Betriebe ( $p < 0,001$ ).

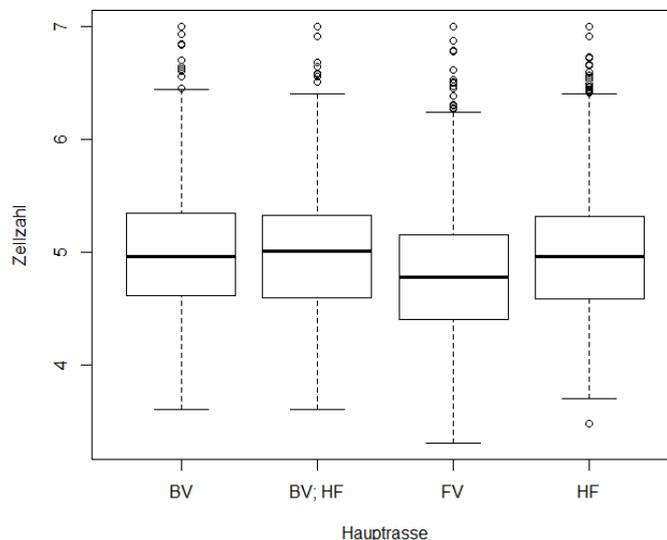
Der Unterschied der Tankmilch-ZZ bei großen (Median 150.000 Zellen/ml, Mittelwert 147.851 Zellen/ml, Stabw 69.004 Zellen/ml) und kleinen Betrieben (Median 108.500 Zellen/ml, Mittelwert 131.482 Zellen/ml, Stabw 90.139 Zellen/ml) war ebenfalls signifikant ( $p = 0,001$ ; Abb. 7).



**Abb. 7:** Tankmilch-ZZ nach Betriebsgröße

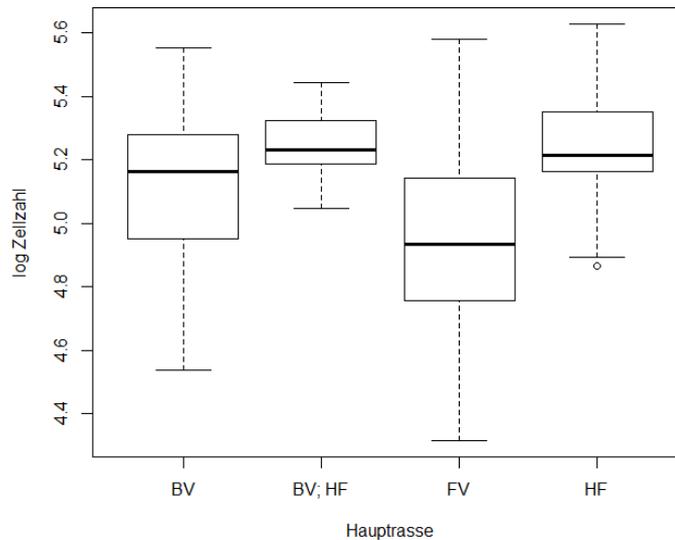
Darstellung der Tankmilch-ZZ großer ( $\geq 34$  Rinder) und kleiner ( $< 34$  Rinder) Betriebe ( $p = 0,001$ )

Bei der Einteilung nach Rinderrassen zeigte Fleckvieh die niedrigsten ZZ-Gehalte, gefolgt von Braunvieh und Holstein Frisian und Betrieben mit zwei Hauptrassen Holstein Frisian und Braunvieh. Die Unterschiede der ZZ nach Rassen sind signifikant sowohl bei den Einzeltieren ( $p < 0,001$ ), Abbildung 8, als auch in der Tankmilch ( $p < 0,001$ ), Abbildung 9, wobei die Rasse Fleckvieh die größte Streuung aufweist.



**Abb. 8:** Einzeltier-ZZ bei den unterschiedlichen Hauptrassen

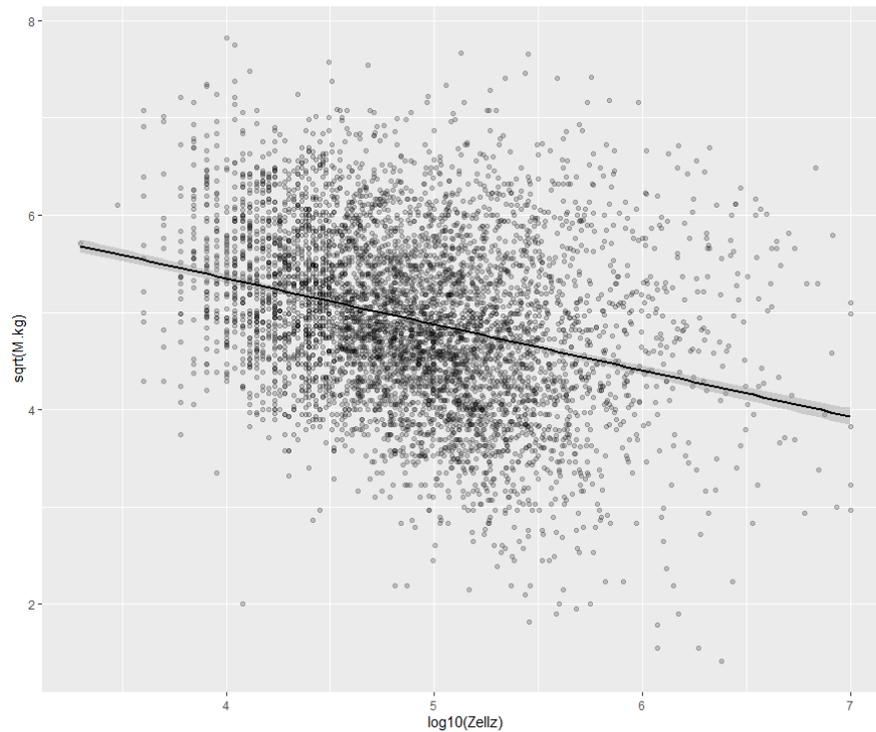
Darstellung der ZZ-Gehalte der Einzeltiere nach den unterschiedlichen Hauptrassen der Betriebe ( $p < 0,001$ ). BV = Braunvieh, BV;HF = Braunvieh ; Hosten Frisian, FV = Fleckvieh, HF = Holstein Frisian



**Abb. 9:** Tankmilch-ZZ bei den unterschiedlichen Haupttrassen

Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen ZZ der Tankmilch bei den unterschiedlichen Haupttrassen der Betriebe, die niedrigsten Durchschnittsgehalte werden bei Fleckvieh erzielt, gefolgt von Braunvieh, Holstein Frisian und dem Betrieb mit Haupttrassen Braunvieh und Holstein Frisian ( $p < 0,001$ ).

Bei der Korrelationsanalyse der ZZ der Einzeltiere mit den Milchmengen der Einzeltiere ergibt sich eine schwach negative Korrelation von  $R = -0,31$  (Abb. 10). Bei einer Korrelation aller Tankmilch-ZZ mit allen Einzeltier-ZZ ergibt sich eine stark positive Korrelation von  $R = 0,77$ . Bei Betrachtung der einzelnen Betriebe konnten unterschiedlich starke Korrelationen der Tankmilch-ZZ und Einzeltier-ZZ festgestellt werden (Tab. 4). Vergleicht man die Korrelationen der Tankmilch-ZZ und Einzeltier-ZZ in den zwei ZZ-Klassen, kann man einen Unterschied zwischen den Klassen feststellen: innerhalb ZZ-Klasse 1  $R = 0,68$  und innerhalb ZZ – Klasse 2  $R = 0,34$ . Auch im Jahresverlauf zeigen sich Unterschiede der Korrelation zwischen Tankmilch-ZZ und Einzeltier-ZZ. In den Monaten März, Mai und Juni konnte ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den restlichen Monaten des Jahres festgestellt werden (Tab. 5). Bei den Parametern Betriebsgröße, Haltung und Haupttrasse konnte keine signifikanten Unterschiede bei den Korrelationen von Tankmilch-ZZ und Einzeltier-ZZ festgestellt werden.



**Abb.: 10** Korrelation der Milchmenge (M.kg) der Einzeltiere zur Einzeltier-ZZ (logarithmiert;  $\log_{10}(\text{Zellz})$ ) ( $R = -0,31$ )

**Tab. 4:** Korrelationen von Tankmilch-ZZ mit Einzeltier-ZZ innerhalb einzelner Betriebe

<b>Laufende Nummer Betrieb</b>	<b>Korrelation</b>
1	$R = 0,70$
2	$R = -0,87$
3	$R = -0,05$
4	$R = 0,28$
5	$R = 0,67$
6	$R = 0,78$
7	$R = 0,74$
8	$R = 0,85$
9	$R = -0,07$
10	$R = 0,46$
11	$R = 0,83$
12	$R = 0,75$
13	$R = 0,21$
14	$R = 0,60$

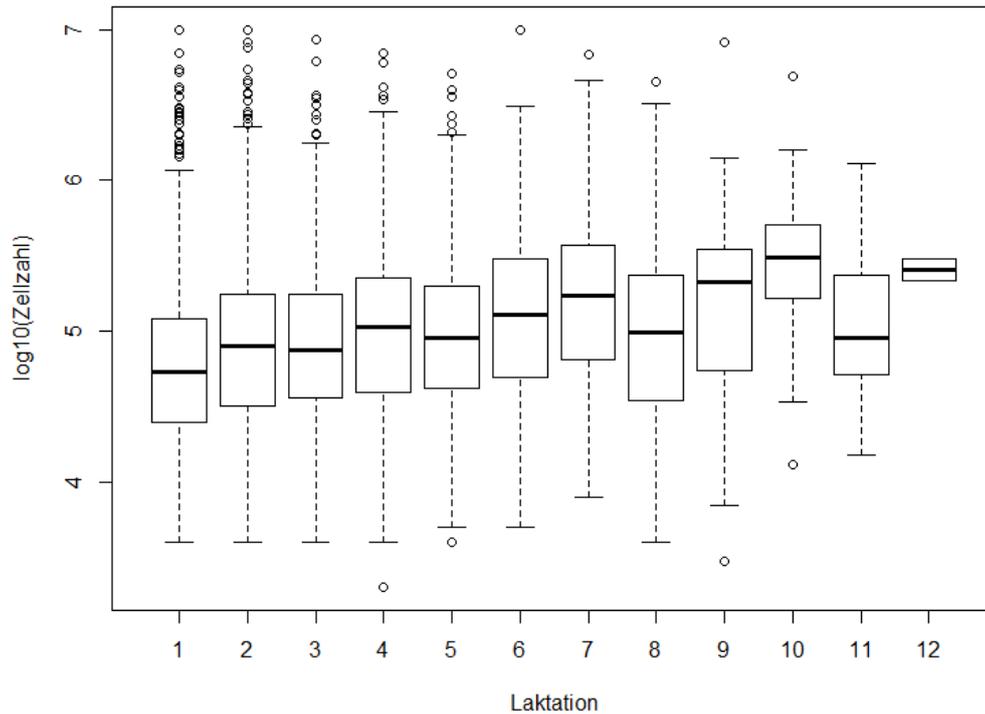
15	R = 0,47
16	R = -0,43
17	R = 0,37
18	R = 0,60
19	R = 0,38
20	R = 0,75
21	R = 0,45
22	R = 0,74

**Tab. 5:** Korrelation der Tankmilch ZZ und Einzeltier ZZ der einzelnen Monate

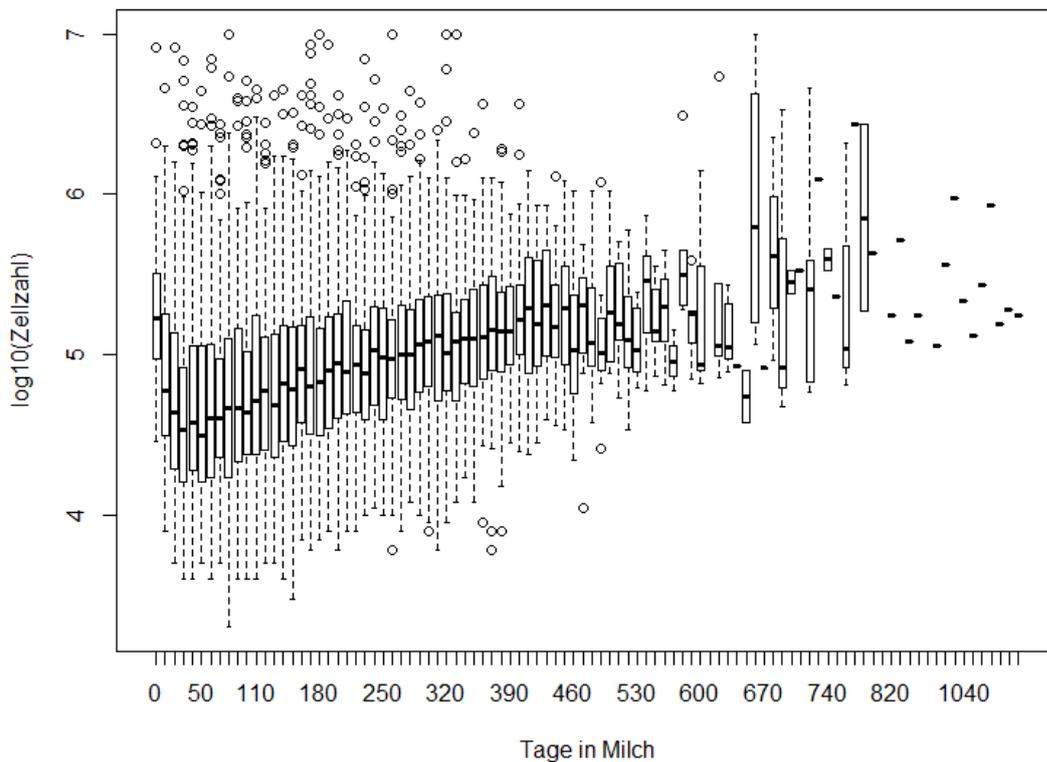
Monat	Korrelation
Jänner	R = 0,81
Februar	R = 0,76
März	R = 0,57
April	R = 0,70
Mai	R = 0,51
Juni	R = 0,57
Juli	R = 0,87
August	R = 0,73
September	R = 0,85
Oktober	R = 0,87
November	R = 0,85
Dezember	R = 0,87

Für die Fragestellung der ZZ-Entwicklung mit zunehmender Anzahl an Laktationen wurden 5.714 Datenpunkte verwendet und die Abhängigkeit zur Laktation untersucht. In Abbildung 11 ist zu sehen wie die durchschnittliche ZZ stetig mit der Anzahl der Laktationen anstieg, wobei berücksichtigt werden muss, dass die Laktationen 8–12 insgesamt nur 3,59 % der Kühe beinhalteten. Die Ergebnisse der linearen Regression wiesen auf einen durchschnittlichen Anstieg der ZZ pro Laktation von 13,12 % hin. Auch innerhalb einer Laktation zeigten sich Veränderungen der durchschnittlichen ZZ. In den ersten 30 Tagen fiel der Median der ZZ ab, von Tag 30 weg begann der Median linear bis zum Laktationsende zu steigen (Abb. 12). Bei

der Auswertung des ZZ-Verlaufs in der Laktation ist zu berücksichtigen, dass auch Daten von Kühen verwertet wurden, die länger als die angenommenen Standardlaktation (305 Tage) gemolken wurden, daher sind ab Tag 450 zu wenige Kuhdaten vorhanden, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen.



**Abb. 11:** Verlauf der ZZ mit Anzahl der Laktationen  
Gegenüberstellung der durchschnittlichen ZZ und der Laktationsanzahl. Die lineare Regression weist auf einen Anstieg von 13,12 % pro Laktation hin.



**Abb. 12:** ZZ-Verlauf innerhalb einer Laktation

Darstellung des ZZ-Verlaufes innerhalb einer Laktation. Es kommt zu einem Abfall von Laktationsbeginn bis zum Tag 30, anschließend zu einem Anstieg bis zum Laktationsende.

#### 4.2.3 Gützeit

Die Gützeit wurde von 724 verschiedenen Kühen ausgewertet. Sie lag bei 6,4 % der Tiere unter 45 Tagen, bei 34,4 % zwischen 45 und 85 Tagen, bei 19,0 % zwischen 85 und 115 Tagen und bei 40,3 % über 115 Tagen. Betriebe in Anbindehaltung hatten einen Median von 93,8 Tagen, Betriebe mit Laufstallhaltung einen Median von 108 Tagen, der Unterschied war nicht signifikant ( $p = 0,089$ ). Bei kleinen Betrieben lag die Gützeit im Median bei 96 Tagen und bei großen Betrieben bei 108 ( $p = 0,310$ ). Die Einteilung nach ZZ-Klassen ergab einen Median von 86 Tagen für ZZ-Klasse 1 Betriebe und 108 Tage für ZZ-Klasse 2 Betriebe, mit einem signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ). Auch zwischen den Hauptrassen ergab sich für die Gützeit ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ), wobei Braunvieh im Median bei 110 Tagen, Fleckvieh bei 89 Tagen, Holstein Frisian 134 und Betrieben mit zwei Hauptrassen (HF und BV) bei 98 Tagen lagen.

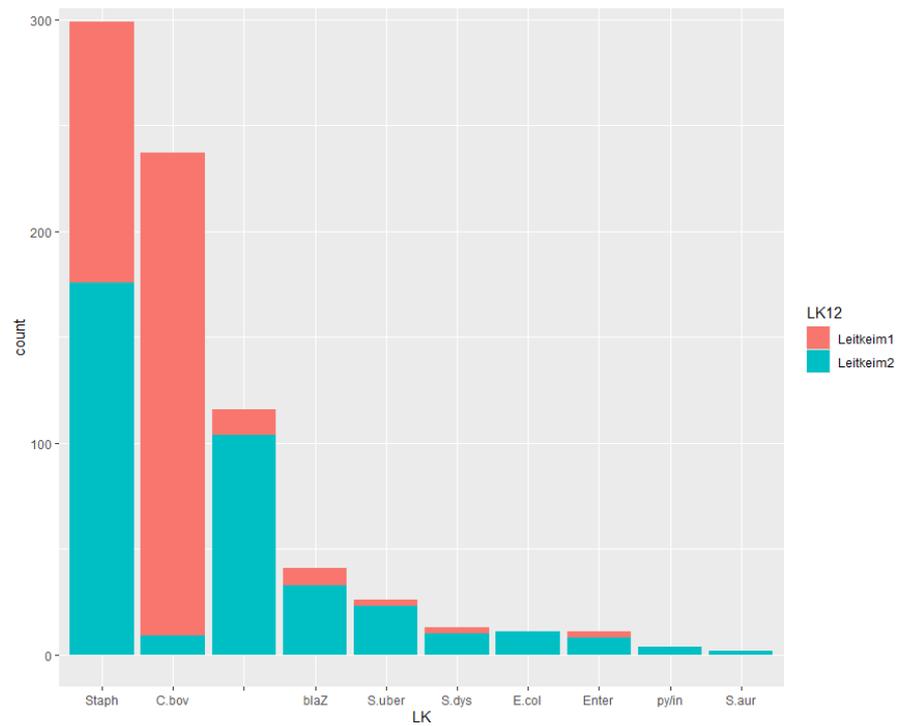
Bei der Korrelation der Gützeit mit der durchschnittlichen Einzeltier-ZZ ergab sich eine schwach positive Korrelation ( $R = 0,29$ ), mit der Milchmenge der Einzelkühe eine schwach negative Korrelation;  $R = -0,18$  und mit der Laktationsanzahl keine Korrelation ( $R = 0,05$ ).

#### 4.2.4 Leitkeime

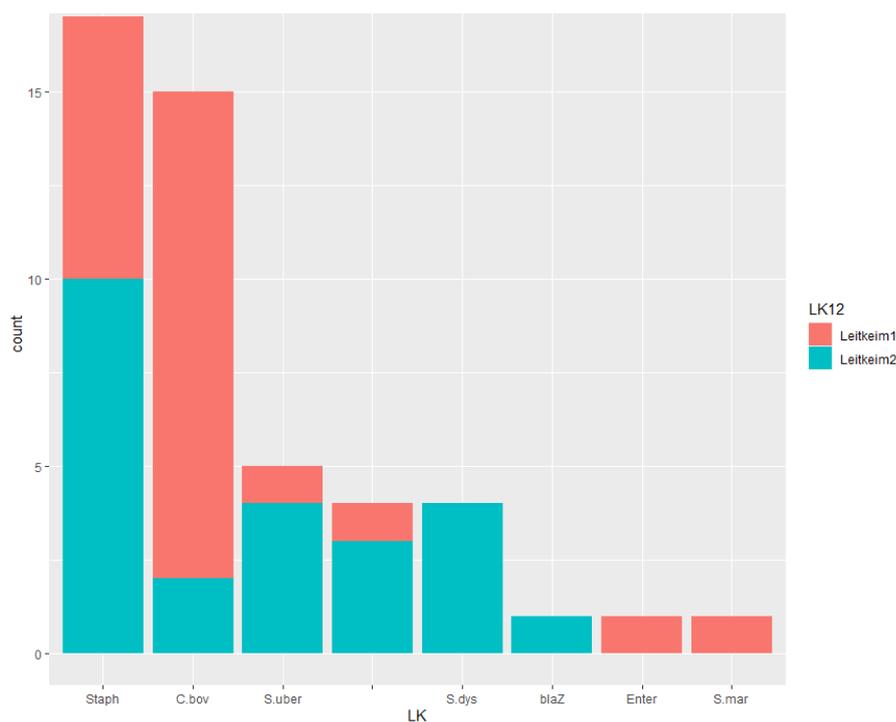
Die Häufigkeiten des Auftretens der mittels qPCR bestimmten Zielkeime in den Sammelgemelken und der Tankmilch der acht beprobten Betriebe ist in Tabelle 6 dargestellt. Die Zuordnung der Keime nach ihrem Auftreten als Leitkeim 1 (höchste DNA Kopienzahl) und Leitkeim 2 (zweithöchste DNA Kopienzahl) sind in Abbildung 13 (Sammelgemelke) und 14 (Tankmilch) dargestellt. Zu beachten ist dass auch das *Staphylococcus* spp. assoziierte  $\beta$ -Laktamase-Gen in der qPCR bestimmt und in den Abbildungen eingefügt wurde. Da dessen Vorkommen nicht Fokus der vorliegenden Arbeit ist, wurde es nicht im Bezug auf gleichzeitige Vorhandensein von *Staphylococcus* spp. analysiert und nicht im Detail diskutiert.

**Tab. 6:** Deskriptiven Statistik der detektierten Keime in 380 Sammelgemelken und 24 Tankmilchproben von drei Probenahmen auf acht Betriebe. (n = Anzahl positiver Proben; % = Anteil positiver Proben)

Keim	Sammelgemelk (Anzahl n)	Sammelgemelk (%)	Tankmilch (Anzahl n)	Tankmilch (%)
<i>C. bovis</i>	237	62,4	15	62,5
<i>E. coli</i>	11	2,9	0	0,0
<i>Enterococcus</i> spp.	11	2,9	1	4,2
kein 2.Keim	92	24,2	2	8,7
Negative Probe	12	3,2	1	4,3
<i>S. aureus</i>	2	0,5	0	0,0
<i>Sc. dysgalactiae</i>	13	3,4	4	16,7
<i>Sc. uberis</i>	26	6,8	5	20,8
<i>Serratia marcescens</i>	0	0,0	1	4,2
Staphylococcal $\beta$ -Laktamase-Gen	41	10,8	1	4,2
<i>Staphylococcus</i> spp.	299	78,7	17	70,8
<i>T. pyogenes</i>	4	1,0	0	0,0



**Abb. 13:** Häufigkeiten der Erregernachweise in den Sammelmelken  
 Darstellung der Leitkeime 1 und 2 nach DNA Kopienzahl (log-transformiert) in den Sammelmelken. LK = Leitkeim, Staph = *Staphylococcus* spp., C. bov = *C. bovis*, □ = kein Keim, blaz = Staphylococcal  $\beta$ -Laktamase-Gen, S. uber = *Sc. uberis*, S. dys = *Sc. dysgalactiae*, E. col = *E. coli*, Enter = *Enterococcus* spp., py/in = *T. pyogenes*, S. aur = *S. aureus*.



**Abb. 14:** Häufigkeiten der Erregernachweise in der Tankmilch

Darstellung der Leitkeime 1 und 2 nach ihrer DNA Kopienzahl (log-transformiert) in der Tankmilch. LK = Leitkeim, Staph = *Staphylococcus* spp., C. bov = *C. bovis*, S. uber = *Sc. uberis*, □ = kein Keim, S. dys = *Sc. dysgalactiae*, blaZ = Staphylococcal  $\beta$ -Laktamase-Gen, Enter = *Enterococcus* spp., S. mar = *Serratia marcescens*

Teilt man die Ergebnisse nach der Haltungsform der Betriebe ein, zeigen sich Unterschiede im Auftreten der Leitkeime. In Anbindehaltung trat sowohl bei den Sammelgemelken als auch bei der Tankmilch am häufigsten *C. bovis* auf. Am zweithäufigsten in Anbindehaltung trat bei den Sammelgemelken *Staphylococcus* spp. und bei der Tankmilch *Staphylococcus* spp. und *Sc. dysgalactiae*. Bei der Laufstallhaltung hingegen war sowohl bei Tankmilch als auch bei Anbindehaltung *Staphylococcus* spp. der am häufigsten und *C. bovis* der am zweithäufigsten nachgewiesenen Keim. Die weitere Reihenfolge der aufgetretenen Keime ist in Tabelle 7 dargestellt.

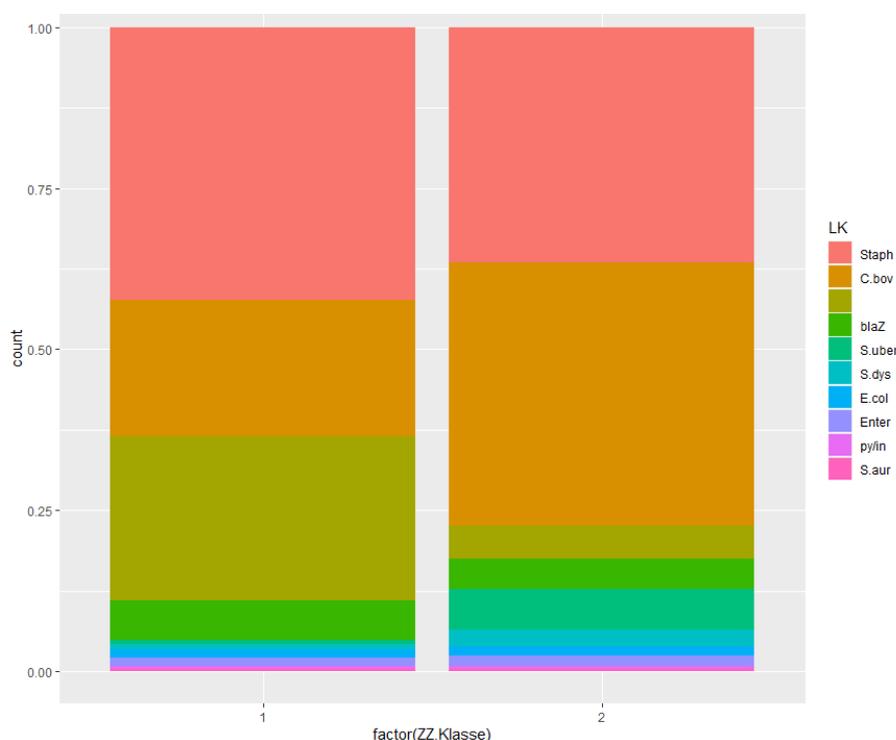
**Tab. 7:** Auflistung der Keime in Sammelgemelken (n=380) und Tankmilchproben (n=24) in absoluten Zahlen und %-Anteil je Haltungsform.

Haltungsform	Keime	Vorkommen Keime Sammelgemelk (n)	Anteil Keime Sammelgemelk (%)	Vorkommen Keime Tankmilch (n)	Anteil Keime Tankmilch (%)
Anbindehaltung	<i>C.bovis</i>	93	97,9	5	83,3
Anbindehaltung	<i>Staphylococcus</i> spp.	72	75,8	2	33,3

<b>Anbindehaltung</b>	kein 2. Keim	13	13,7	2	33,3
<b>Anbindehaltung</b>	Negative Probe	1	1,1	0	0,0
<b>Anbindehaltung</b>	<i>Sc. dysgalactiae</i>	7	7,4	2	33,3
<b>Anbindehaltung</b>	<i>Serratia marcescens</i>	0	0,0	1	16,7
<b>Anbindehaltung</b>	<i>Staphylococcal</i> $\beta$ -Laktamase-Gen	1	1,1	0	0,0
<b>Anbindehaltung</b>	<i>Sc. uberis</i>	1	1,1	0	0,0
<b>Anbindehaltung</b>	<i>Enterococcus</i> spp.	1	1,1	0	0,0
<b>Laufstall</b>	<i>Staphylococcus</i> spp.	227	79,6	15	83,3
<b>Laufstall</b>	<i>C. bovis</i>	144	50,5	10	55,6
<b>Laufstall</b>	kein 2. Keim	79	27,7	2	11,1
<b>Laufstall</b>	Negative Probe	11	3,9	0	0,0
<b>Laufstall</b>	<i>Staphylococcal</i> $\beta$ -Laktamase-Gen	40	14,0	1	5,6
<b>Laufstall</b>	<i>Sc. uberis</i>	25	8,8	5	27,8
<b>Laufstall</b>	<i>Sc. dysgalactiae</i>	6	2,1	2	11,1
<b>Laufstall</b>	<i>E. coli</i>	11	3,9	0	0,0
<b>Laufstall</b>	<i>Enterococcus</i> spp.	10	3,5	1	5,6
<b>Laufstall</b>	<i>T. pyogenes</i>	4	1,4	0	0,0
<b>Laufstall</b>	<i>S. aureus</i>	2	0,7	0	0,0

Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Euterpathogene in den ZZ-Klassen ist in Abbildung 15 dargestellt, und ist signifikant unterschiedlich ( $p = 0,001$ ). In ZZ-Klasse 1 Betrieben wurde *Staphylococcus* spp. als Leitkeim 1 und *C. bovis* als Leitkeim 2 festgestellt, in Sammelgemelken kommt *Staphylococcus* spp. bei 84,6 % und *C. bovis* bei 42,6 % der Proben, in der Tankmilch kommt *Staphylococcus* spp. in 83,3 % und *C. bovis* in 33,3 % der Proben vor. In ZZ-Klasse 2 Betrieben kommt als Leitkeim 1 *C. bovis* und als Leitkeim 2 *Staphylococcus* spp. sowohl in der Tankmilch (*C. bovis* in 91,7 %, *Staphylococcus* spp. in 58,3 %) als auch in Sammelgemelken (*C. bovis* in 81,8 %, *Staphylococcus* spp. in 72,9 %) vor. Bei den Tankmilchproben war auffällig, dass in ZZ-Klasse 1 sechs verschiedene Keime (*C. bovis*, *Enterococcus* spp., *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* spp., *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis*) und in ZZ-Klasse 2 dagegen nur vier verschiedene Keime auftraten (*C. bovis*, *Staphylococcus* spp., *Sc. dysgalactiae* und *Sc. uberis*). Für die Sammelgemelksproben

konnten signifikante Unterschiede zwischen Häufigkeiten von Erregern in den verschiedenen ZZ-Klassen festgestellt werden. *C. bovis* und *Sc. uberis* sind signifikant höher in ZZ-Klasse 2 ( $p < 0,05$ ), negative Proben dagegen kommen signifikant öfter in ZZ-Klasse 1 vor ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 15:** Aufteilung der Euterpathogene in die ZZ-Klassen 1 und 2

Im Diagramm sind links die Euterpathogenen der ZZ – Klasse 1 und rechts der ZZ – Klasse 2 nach Häufigkeit ihres Auftretens dargestellt. Staph = *Staphylococcus* spp., C. bov = *C. bovis*, □ = kein Keim, blaZ = Staphylococcal  $\beta$ -Laktamase-Gen, S. uber = *Sc. uberis*, S. dys = *Sc. dysgalactiae*, E. col = *E. coli*, Enter = *Enterococcus* spp., py/in = *T. pyogenes*, S. aur = *S. aureus*.

Für die auftretenden Keime in den zwei ZZ-Klassen wurde die Odds Ratio berechnet. *Sc. uberis* hat eine 13,63 x, *Sc. dysgalactiae* eine 3,79 x und *C. bovis* eine 2,23 x höhere Chance in ZZ-Klasse 2 Betriebe aufzutreten ( $p < 0,05$ ). Hingegen traten negative Proben mit einer 4,22 x geringeren Chance auf in ZZ-Klasse 2 Betrieben ( $p < 0,05$ ).

Betrachtet man das Auftreten der Keime aufgeteilt nach den Haupttrassen der Betriebe ergab sich bei den Sammelgemelksproben als Leitkeim 1 und 2 *Staphylococcus* spp. und *C. bovis*. Bei Braunvieh kam *Staphylococcus* spp. bei 85,4 % und *C. bovis* bei 35,4 %, bei Fleckvieh *Staphylococcus* spp. bei 80,9% und *C. bovis* bei 68,1 % und bei Holstein Frisian *C. bovis* bei 78,1% und *Staphylococcus* spp. bei 67,7% innerhalb der jeweiligen Rasse vor. Bei den Tankmilchproben war bei Braunvieh *Staphylococcus* spp. als Leitkeim 1 (in 100 % der

Proben) und *C. bovis* als Leitkeim 2 (33,3 %), beim Fleckvieh ebenfalls. *Staphylococcus* spp. als Leitkeim 1 (66,7 %) und *C. bovis* mit als Leitkeim 2 (58,3 %) und Holstein Frisian hingegen zeigte *C. bovis* als Leitkeim 1 (100 %) und *Staphylococcus* spp. und *Sc. uberis* zu gleichen Teilen als Leitkeim 2 (50%).

Die Leitkeime der Sammelmelke (*C. bovis* Leitkeim1, *Staphylococcus* spp. Leitkeim 2) wurden in 75% der Tankmilchproben wiedergefunden. 12,5% der untersuchten Tankmilchproben waren positiv auf andere in den Sammelmelken gefundenen Keimen. 8,3% der Tankmilchproben beinhalteten Keime, die in den Sammelmelken noch nicht gefunden wurden und in 4,2% der Tankmilchproben wurde kein Keim gefunden.

## 5 DISKUSSION

---

Das Ziel dieser Arbeit war es, die hohe Rohmilchqualität in Österreich in Zusammenhang mit Tiergesundheit zu stellen. Im Mittelpunkt standen dabei ZZ, Keimzahl und Inhaltsstoffen der Rohmilch von einzelnen Kühen und Tankmilchuntersuchungen und eine Leitkeimbestimmung ausgewählter Betriebe mittels qPCR. Eine zentrale Fragestellung war, wie die Qualitätsparameter in der Tankmilch das Geschehen in der Herde widerspiegeln.

### 5.1 MILCHINHALTSSTOFFE

Die Milchhaltsstoffe der Tankmilch bewegte sich bei Fett (3,2-5,0 %), Eiweiß (3,2-3,8 %) und Harnstoff (15-30 mg/dl) im physiologischen Bereich, einzelne Tiere zeigten Ausreißer, allerdings zeugen die Inhaltsstoffe der Mehrheit der Kühe von guter Rohfaser-, Energie- und Proteinversorgung. Die Auswertung der Milchhaltsstoffe Fett, Eiweiß und Harnstoff zeigten Schwankungen im Jahresverlauf des Probejahres. Dabei wiesen Fett und Eiweiß sowohl in den Einzeltierproben als auch in der Tankmilch niedrigere Gehalte in den Sommermonaten auf, Harnstoff dagegen signifikant höhere Gehalte im Sommer. Die Parameter Milchfett, Milcheiweiß und Harnstoff werden sehr stark von der Fütterung und damit von der Versorgung der Milchkuh beeinflusst. Niedrigere Fettgehalte können durch höheren Grünfütterungsanteil, z.B. durch Weidehaltung im Sommer, sowie höhere Kraftfutteranteile und damit resultierte geringere Rohfaseranteile erklärt werden (Steinwider und Häusler 2012). Höhere Gehalte an ungesättigten Fettsäuren im Futter können ebenfalls zu tieferen Milchfettgehalten führen. Der Eiweißgehalt wird vor allem durch die Energieversorgung der Tiere beeinflusst und kann bei Futterumstellung und verbundener verminderter Energiezufuhr, wie z.B. bei Weidehaltung oder beim Aufbrauchen der Maissilage im Sommer, absinken (Steinwider 2017). Der Harnstoffgehalt wird vor allem durch die Fütterung stark beeinflusst. Höhere Harnstoffgehalte in den Sommermonaten können z.B. durch Weidehaltung auftreten, welche Schwankungen in der Eiweißversorgung mit sich bringt (Steinwider und Häusler 2012). Diese Inhaltsstoffe werden auch durch Rasse und Laktationsstadium beeinflusst (Krömker und Bruckmaier 2007). Da in dieser Studie allerdings der Hauptanteil bei Fleckvieh liegt und Braunvieh und Holstein Frisian einen sehr geringen Anteil aufwiesen, konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden,

die zu einem aussagekräftigen Ergebnis geführt hätten. In unserer Studie erreichten die kleineren Betriebe niedrigere Fettgehalte (Tank), Eiweißgehalte (Einzeltiere und Tank), und höhere Harnstoffgehalte (Einzeltiere und Tank). Dazu passen auch die Ergebnisse der Auswertung nach Haltungform, dass Anbindeställe geringere Fett- und Eiweißwerte und höhere Harnstoffwerte haben, da Anbindeställe tendenziell auch wengier Rinder haben. Eine Erklärung dafür könnte auch hier in der Fütterung liegen. Größere Betriebe, die auch meist in Laufstallhaltung geführt werden, setzen oft auf eine intensivere und kontrolliertere Fütterung, durch die höhere Inhaltsstoffe erreicht werden können. Betriebe in Anbindehaltung dagegen werden meist extensiver geführt und müssen Auslauf für die Tiere gewähren, die meist als Weidehaltung, mit Grünfutterzugang, stattfindet und somit niedrigere Fett- und Eiweißgehalte aber höhere Harnstoffgehalte erklärt.

Wenn die Erhöhung der ZZ mit einem Entzündungsgeschehen einhergeht, kommt es meistens zu erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Euterschranke, die zu höheren Milchinhaltsstoffen führen kann (Cinar et al. 2015). Bei der Untersuchung der Milchinhaltsstoffe in den verschiedenen ZZ-Klassen zeigten sich signifikant höhere Fett- und Eiweißgehalte bei ZZ-Klasse 2 Betriebe. Beim Milcheiweiß konnte dieser Unterschied zwischen den ZZ-Klassen bei nur bei den Einzeltieren festgestellt werden. Beim Harnstoff war der Effekt von niedrigeren Werten in den ZZ-Klasse 2 Betrieben nur bei den Einzeltieren feststellbar. Eine Erklärung für signifikante Unterschiede bei den Einzeltieren, nicht aber bei der Tankmilch, könnte bei den verschiedenen Managementansätze bei ZZ-Erhöhung gesucht werden (Kruif et al. 2014). ZZ-Klasse 2 Betriebe sind durch vermehrtes Vorkommen von Tieren mit hohen ZZ Werten eher geneigt Tiere nicht in den Tank zu melken, was Unterschiede der Milchinhaltsstoffe zwischen Tank und Herde bewirken kann. Um zu sehen ob die Tankmilch den Herdenstatus widerspiegelt, wurden die Inhaltsstoffe der Einzeltierdaten und der Tankmilch korreliert. Da die Durchschnittswerte und der Median beider Gehalte in der Norm liegen und die Korrelation der Einzeltier- und Tankmilchgehalte dabei bei allen drei Milchinhaltsstoffen existenzielle (Eiweiß), starke (Harnstoff) und mittlere (Fett) positive Korrelation zeigen, spiegelt die abgelieferte Milch den Herdenstatus wieder. Jedoch zu unterschiedlichen Ausmaßen, da Milchfett auf Einzeltierebene mehr Variation als bei der Tankmilch aufweist.

### 5.1.1 Keimzahl

Die Keimzahl in der Tankmilch war mit einem Mittelwert von 15.982 KbE/ml, und einem Median von 8.250 KbE/ml deutlich unter dem Grenzwert, der für eine S-Klasse Einstufung (<50.000 KbE/ml) notwendig ist (Agrar Markt Austria). Während des Jahresverlaufs zeigten sich keine signifikanten jahreszeitlichen Schwankungen, das deutet im Durchschnitt und Median auf eine kontinuierlich hohe Milchqualität durch eine konstant hohe Melkhygiene im Jahresverlauf hin. Unterschiedliche Witterungsbedingungen, Hitze- und Kälteperioden, sowie Feuchtigkeit zu den verschiedenen Jahreszeiten, können starken Einfluss auf die Keimzahl haben, die auch eine höhere Stressbelastung der Tiere verursacht. Im Sommer treten vermehrt Belastungen durch Fliegen und andere Insekten auf, im Winter dagegen gibt es je nach Stallbauart eine geringere Luftzirkulation und vermehrte Schmutzbelastung der Tiere durch höhere Feuchtigkeit. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass dieser jahreszeitliche Einfluss nicht zwingend präsent ist, und macht deutlich, dass eine konstante Melkhygiene eine gewisse Unabhängigkeit davon sichert (van Schaik et al. 2002).

Beim Vergleich der Haltungssysteme sind dagegen signifikant höhere Keimzahlgehalte in Betrieben mit Anbindehaltung aufgetreten als bei Laufstallhaltung. Die Anbindehaltung ist immer wieder als Risikofaktor beschrieben, da längere und oft ansteigende Milchwege in Rohrmelkanlagen Oberfläche für Kontaminationen bieten und die Reinigung von langen Milchwegen sich schwieriger gestaltet (Fahr und Lengerken 2003) Auch wenn der Median und Mittelwert der Tankmilch Keimzahl bei beiden Haltungsformen unter dem Grenzwert lagen, gab es immer wieder Überschreitungen der 50.000 KbE/ml. Wider Erwarten gab es bei Laufstallhaltung öfter Ausreißer über dem Grenzwert bei den monatlichen Messungen, was auf kurzfristige Probleme, wie technische Schwierigkeiten mit der Melk- oder Kühlanlage, hindeutet, da die Keimzahl bei der nächsten Messung, nach Beheben des Problems, wieder im Optimalbereich war. Betriebe mit Anbindehaltung zeigten allerdings eine deutlich höhere Standardabweichung. In Anbindehaltung wird direkt am Standplatz der Kuh gemolken, bei unzureichender Melkhygiene kann der Keimdruck hier höher sein als in Betrieben mit Melkstand, wo die Kuh aus der Stallumgebung geht und an einem sauberen Platz gemolken wird (Fahr und Lengerken 2003).

Kleine Betriebe (<34 Rinder) haben im Median höhere Keimzahlen, große Betriebe (>34 Rinder) haben im Median niedrigere Keimzahlen. Allerdings handelt es sich bei den großen Betrieben nur um Betriebe mit Laufstallhaltung, bei den kleinen um Anbindehaltung, wo wie beschreiben eine höhere Keimzahl gefunden wurde (Fahr und Lengerken 2003).

Untersucht man die Keimzahl in Zusammenhang mit der ZZ, ergab sich, dass ZZ-Klasse 1 Betriebe auch niedrigere Keimzahlgehalte im Median haben als Betriebe der ZZ-Klasse 2). Die beiden Parameter haben als größten gemeinsamen Nenner das Management des Betriebes, wie z.B. Melkhygiene, Melkreihenfolge und Trockenstellmanagement. Es ist beschrieben dass in Betrieben, die Probleme mit höherer ZZ haben, auch gleichzeitig häufiger Keimzahlprobleme auftreten (Borneman und Ingham 2014). Jedoch ergab sich bei der Korrelation von ZZ und Keimzahl nur eine geringe positive Korrelation. Die ZZ ist ein stark tierbezogener Parameter, der durch erhöhten Keimdruck ansteigen kann, allerdings erst als Folgereaktion, z.B. bei Mastitis durch Umweltpathogene. Umgekehrt dagegen, steigt die Keimzahl aufgrund von erhöhter ZZ nicht immer an, da auch nicht infektiöse ZZ-Erhöhungen auftreten (Fahr und Lengerken 2003). Die Keimzahl und ZZ zeigen zwar eine positive Korrelation, allerdings wird die Keimzahl von vielen anderen Faktoren beeinflusst, die vom Management der Betriebe abhängt (Borneman und Ingham 2014).

### 5.1.2 Zellzahl

Der Median der ZZ lag bei den Einzeltiermessungen bei 78.958 Zellen/ml, Mittelwert 222.367 Zellen/ml und bei der Tankmilch bei 134.033 Zellen/ml, Mittelwert 139.393 Zellen/ml, damit lag auch hier der Mittelwert unter dem Grenzwert, der für eine Einstufung in die S-Klasse (<200.000 Zellen/ml) notwendig ist (Agrar Markt Austria). Tiere mit hoher ZZ werden in der Regel nicht in den Tank gemolken, wodurch in der Tankmilch eine geringere Streuung der ZZ-Gehalte entsteht und Median und Mittelwert näher beisammen liegen, und der Median der Einzeltiere niedriger ist als der Median der Tankmilch.

Bei der ZZ ergab sich eine stark positive Korrelation von den Einzeltierdaten zur Tankmilch ( $R = 0,77$ ), es konnten aber betriebsindividuell verschiedene Korrelationen festgestellt werden ( $R = -0,87$  0,85). Betriebe der ZZ-Klasse 1 zeigten öfter stark positive Korrelationen als Betriebe der ZZ-Klasse 2. Dies kommt zum einen aufgrund von betriebsunterschiedlichem

Management beim Auftreten erhöhter ZZ in Einzeltieren zustande. Je nachdem wie lange es dauert bis die ZZ-Erhöhung festgestellt wird, ab welchem ZZ-Gehalt die Milch nicht mehr geliefert wird und wie konsequent die Milch dann auch weggemolken wird, beeinflussen die Korrelation zwischen Herde und Tank. Es spricht aber auch dafür, dass Betriebe in ZZ-Klasse 1 mehr der tatsächlich produzierten Milch auch liefern und weniger Milch mit hoher ZZ anfällt, die sie nicht liefern.

Bei den jahreszeitlichen Schwankungen des ZZ-Verlaufes ergab sich bei den Einzeltiermessungen ein signifikanter Verlauf mit Erhöhung von Mai bis November. Bei der Tankmilch war diese Schwankung allerdings nicht signifikant. Durch das Wegmelken von Kühen mit höherer ZZ lässt sich erklären, warum die Tankmilch einen konstanten Jahresverlauf zeigt. Schwankungen der ZZ von Einzeltiere im Jahresverlauf können durch Stress begründet werden, der die Euterabwehr senken. Ursache dafür können im Sommer Hitzestress oder schwankende Grundfutterqualität und Futterumstellungen sein (Alhussien und Dang 2018). Im Herbst wird oft von Sommer- auf Winterfütterung umgestellt, zusätzlich kommen in den Herbstmonaten feuchte und unbeständige Witterungsbedingungen dazu, die einen Stressfaktor für die Milchkuh darstellen (van Schaik et al. 2002).

Wider Erwarten konnte bei der ZZ kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Haltungform festgestellt werden. Da in Anbindehaltungen Rohrmelkanlagen zum Einsatz kommen, die durch bauliche Gegebenheiten oft kein konstantes Vakuum garantieren, treten bei dieser Haltungform öfter Zitzenveränderungen, wie Hyperkeratosen, oder bedeckte Zitzenverletzungen durch weniger Platzangebot auf, die Ursache für erhöhte ZZ sein könnten. Bei Problemen des Managements der Anbindeplätze kann es auch durch unsauberes Arbeiten zu erhöhten Keimdruck und damit erhöhter ZZ kommen, da am Anbindeplatz auch gemolken wird. Allerdings kann bei Betrieben mit Anbindehaltung im Gegensatz zur Laufstallhaltung eine Melkreihenfolge zur Mastitisvorbeuge leichter durchgeführt werden (Fahr und Lengerken 2003).

Betriebe über 34 Rinder (=große Betriebe) hatten sowohl bei den Einzeltieren als auch bei der Tankmilch eine signifikant höhere ZZ. Als große Betriebe wurden insgesamt sechs der 22 eingestuft (312 Tieren), nur zwei dieser Betriebe wurden als ZZ-Klasse 1 eingestuft (94 Tiere), in ZZ-Klasse 2 waren 218 Tiere. Die 16 kleinen Betriebe hatten gesamt 349 Tieren,

davon sechs ZZ-Klasse 1 Betriebe mit 140 Tieren. In großen Herden besteht die Gefahr von zunehmender Übertragung von Euterpathogenen während der Melkzeit und damit auch ein erhöhtes Mastitisrisiko und höhere ZZ bei großen Herden (Archer et al. 2013). Allerdings ist in großen Herden das Mastitismanagement durch intensivere Haltung oft besser gestaltet, Tiere mit hohen ZZ werden früher erkannt und Investitionen in die Melktechnik zur Verbesserung der Eutergesundheit werden eher durchgeführt. Dadurch kann eine niedrigere ZZ bei großen Herden erreicht werden (O'Connell et al. 2015).

Tiere mit hoher Leistung zeigten geringere ZZ als Tiere mit niedrigerer Leistung (Korrelation Leistung und Milchmenge  $R = -0,31$ ). Entsteht durch Stress oder durch eine Entzündung also eine ZZ-Erhöhung, geht die Milchproduktion im Euter zurück. Die Ursache dafür ist bei der Zerstörung des Milchbildenden Epithels durch Entzündungszellen zu finden (Alhussien und Dang 2018). Leistungsstarke Tiere gelten oft als krankheitsanfälliger, ist allerdings eine gute Versorgung der Kuh und ein gutes Management gewährleistet, stehen Tiere mit hoher Leistung für niedrige ZZ und gute Eutergesundheit.

Beim Vergleich der ZZ der einzelnen Rassen hatten Fleckvieh die niedrigsten Gehalte, gefolgt von Braunvieh und Holstein Friesian. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Verteilung der Rassen auf 330 Fleckvieh, 285 Holstein Friesian und 194 Holstein Friesian Kühen beachtet werden. Ein Mischbetrieb aus Braunvieh und Holstein Friesian wurde aus der Statistik entfernt, da er eine zwei-gipfelige Verteilungskurve der ZZ aufwies. Auch andere Studien konnten Rasseunterschiede feststellen, wo vor allem Braunvieh und Holstein Friesian höhere ZZ aufwiesen. Grund dafür ist vor allem die Euter- und Zitzenbeschaffenheit. Dünne und kurze Zitzen mit schlechtem Schließmuskel treten häufig bei diesen Rassen auf und sind Risikofaktoren für Mastitiden und ZZ-Erhöhlungen (Alhussien und Dang 2018).

Mit steigender Zahl der Laktationen stieg auch die ZZ der getesteten Tiere. Die lokale Immunabwehr des Euters sensibilisiert sich durch Infektionen und Stresssituationen in vorangegangenen Laktationen. Mit steigendem Alter kommt es auch zu einer rascheren Mobilisierung von Abwehrzellen (Flere et al. 2016). Auch innerhalb einer Laktation kam es nach der Kalbung zuerst zum Abfall der ZZ bis zum 30. Laktationstag, danach zu einem Anstieg der ZZ bis zum Trockenstellen. Zu Beginn und zum Ende der Laktation zeigen die Euter von gesunden Milchkühen eine verminderte Immunabwehr auf, die zum Ansteigen der

ZZ führen kann (Alhussien und Dang 2018). Der Anstieg der ZZ mit dem Laktationsstadium zeigt sich auch durch die Korrelation der ZZ mit der Gützeit (physiologisch 85-115 Tage). Betriebe in ZZ-Klasse 2 zeigten längere Gützeiten, diese Betriebe hatten auch höhere ZZ und Keimzahlen. Diese Parameter sind sehr stark von der Betriebsführung beeinflussbar, die Gützeit ist als Fruchtbarkeitsparameter Anhaltspunkt für das Fruchtbarkeitsmanagement und Fruchtbarkeitsprobleme

### 5.1.3 Leitkeime

Am häufigsten trat in den Tankmilch- und Sammelgemelksproben als Leitkeim 1 *Staphylococcus* spp. auf. Als natürliche Bewohner des Strichkanals können *Staphylococcus* spp. mit der Milch ausgeschieden und auch bei eutergesunden Tieren nachgewiesen werden (Derakhshani et al. 2018). *Staphylococcus* spp. tritt bei den meisten Proben entweder als Leitkeim 1 oder als Leitkeim 2 auf. Er kann als niedrig pathogener Mastitiserreger Wegbereiter für stärker pathogene Erreger sein. Der als Leitkeim 2 identifizierte *C. bovis* gehört zu den am häufigsten vorkommenden Besiedlern der Zitzenhaut (Piessens et al. 2012), daher ist er eher als Kommensale zu betrachten. *C. bovis* wird sehr selten als Euterpathogen beschrieben, erst in Kombination mit anderen Pathogenen wird er als Ursache für ZZ-Erhöhung beschrieben (Derakhshani et al. 2018). Neben den beiden Leitkeimen wurden *E. coli*, *Enterococcus* spp., *S. aureus*., *Sc. dysgalactiae*, *Sc. uberis*, *Serratia marcescens* und *T. pyogenes* in den Milchproben gefunden. Von diesen Pathogenen traten nur *Sc. uberis* und *Sc. dysgalactiae* in mehr als 15% der Tankmilchproben auf, alle anderen Keime waren sowohl in der Tankmilch als auch in den Sammelgemelken in <10% der Proben zu finden. Beide Erreger gehören zu den „major pathogen“ Mastitiserregern, diese Erreger verursachen eine höhere ZZ in Tankmilchproben als „minor pathogen“ (dos Reis et al. 2011).

Sowohl bei Anbindehaltung als auch bei Laufstallhaltung waren *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* die beiden Leitkeime. Beide Erreger gehören zu den kuhassoziierten Euterpathogenen (Winter 2009), wodurch auf keinen direkter Zusammenhang mit der Aufstallungsform geschlossen wird, obwohl eine Belastung durch schlechte Umweltbedingungen die Immunabwehr des Euters negativ beeinflussen kann und als Wegbereiter für Infektionen dient (Kruif et al. 2014).

Auch bei den beiden ZZ-Klassen konnte *Staphylococcus* spp. und *C. bovis* als Leitkeime identifiziert werden, in ZZ-Klasse 1 war *Staphylococcus* spp. Leitkeim 1 und in ZZ-Klasse 2 *C. bovis*. Das Auftreten von *C. bovis* wurde auch in anderen Studien mittels PCR untersucht und häufig in der Milch von eutergesunden Tieren beschrieben, mit nur mit einem geringen Anstieg der ZZ, solange keine weiteren Euterpathogene hinzukommen. Bei der Untersuchung des Euters wird *C. bovis* vor allem als Besiedler der Zitzenhaut und Strichkanaloberfläche beschrieben (Quigley et al. 2013). In ZZ-Klasse 1 traten neben den zwei Leitkeimen mehrere Keime auf, sieben weitere in Sammelgemelken und fünf weitere bei den Tankmilchproben, allerdings je in weniger als 17% der Proben. Die meisten dieser Keime gehören zu den gering pathogenen Mastitiserregern, bis auf wenige Ausreißer mit *E. coli*. Die gering pathogenen Erreger verursachen meist subklinische Mastitiden mit ggr. ZZ-Erhöhungen, sofern in einem Betrieb das Melk- und Mastitismanagement gut funktioniert, werden aufgetretenen ZZ-Erhöhungen allerdings sofort erkannt und behandelt.

Die Euterpathogenen, die in ZZ-Klasse 2 neben den Leitkeimen auftraten, waren vorwiegend Erreger, die zu der Gruppe der stark pathogenen Mastitiserreger gezählt werden. *Sc. uberis* und *Sc. dysgalactiae* traten in ZZ-Klasse 2 gehäuft auf. Diese Erreger persistieren nach einer abgeklungenen Mastitis meist im Euter und werden weiter ausgeschieden, sie verursachen ggr. ZZ-Erhöhungen und infizieren andere Tiere. Nur strenge Managementmaßnahmen und Abgänge betroffener Kühe können diese subklinischen Mastitiserreger aus dem Bestand eradizieren (Krömker et al. 2014). Treten vermehrt subklinische Mastitiden in einer Herde auf, gibt es vermehrt Tiere, die durch ihre erhöhte ZZ die Tank-ZZ heben. Das spiegelt auch die oddsratio der Mastitiserreger in unserer Studie wider. Die Chance in ZZ-Klasse 2 aufzutreten ist für *Sc. uberis* 13,63 x, für *Sc. dysgalactiae* 3,79 x und für *C. bovis* 2,23 x höher als in ZZ-Klasse 1. *Sc. uberis* und *Sc. dysgalactiae* sind Erreger, die chronische und subklinischen Mastitiden mit ZZ-Erhöpfung verursachen können (St Rose et al. 2003). Neben dem Auftreten von gering pathogenen Mastitiserregern wurden auch vermehrt negative Proben in ZZ-Klasse 1 im Vergleich zur ZZ – Klasse 2 festgestellt. Es kann damit darauf geschlossen werden, dass die ZZ-Gehalte des Tanks einer Herde als Indikator für die auftretenden Mastitiserreger innerhalb einer Herde sind. Tiere in ZZ - Klasse 1 haben mehr negative Proben, weniger Mastitiserreger und vor allem weniger hoch pathogene Keime in positiven Proben.

Leitkeime 1 und 2 wurden zu 75 % auch in der Tankmilch wiedergefunden. *Staphylococcus* spp. war dabei allerdings nur in 74 % der Tankmilchproben, aber in Sammelgemelken in 80 %. Dafür wurden in der Tankmilch nur sieben verschiedene Keime gefunden, in den Sammelgemelken dagegen neun verschiedene. Bei den Sammelgemelksproben waren mehrere major pathogene Bakterien zu finden, in den Tankmilchproben dagegen nicht. Da der durchschnittliche ZZ der Tankmilch allerdings niedriger ist als der der Einzeltierbeprobung, lässt darauf schließen, dass bei Infektionen mit „major pathogen“ Mastitiserregern die Milch nicht in den Tank gemolken wurde oder durch den Verdünnungseffekt im Tank nicht mehr detektiert wurden. Die Tankmilch spiegelt daher zwar die Mastitispathogenen der Herde wider, die nur geringe oder keine ZZ-Erhöhung verursachen, hoch pathogene Erreger, die akute Mastitiden verursachen, können allerdings nicht immer wieder gefunden werden.

Interessant war, dass durch die Einteilung in die ZZ-Klassen das Management die größte Beeinflussung darstellte. Betriebe in ZZ-Klasse 1 zeigten also niedrigere ZZ und niedrigere Keimzahl, kürzere Gützeiten und das vermehrte Vorkommen von Keimen, die zu den „minor pathogen“ gehören, als in ZZ-Klasse 2. Tiere in den Herden österreichischer Milchviehbetriebe zeigten hohe Leistung in Kombination mit niedriger ZZ, das heißt, bei hoher Leistung muss nicht gleichzeitig die ZZ erhöht sein. Allerdings steigt die ZZ mit steigender Laktationszahl und Laktationsfortschritt auch bei eutergesunden Tieren an.

Die Tankmilch gilt bei den Milchinhaltsstoffen als guter Parameter um die Herde zu repräsentieren. Auch bei der ZZ ist das der Fall, weiters produzieren Betriebe der ZZ-Klasse 1 mehr Milch, die sie auch tatsächlich liefern, da weniger Milch weggemolken werden muss. Die Leitkeime können auch durch die Tankmilch detektiert werden. Keime die zu den major pathogen gehören, werden jedoch seltener wieder in der Tankmilch nachgewiesen, da sie entweder weggemolken werden oder durch die Verdünnung nicht mehr nachgewiesen werden können. Bei den in dieser Studie untersuchten Betrieben lässt sich abschließend sagen, dass eine ZZ <200.000 im Tank eine größere Sicherheit für ein gutes Management und bessere Eutergesundheit darstellt als eine ZZ >200.000.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

Die in Österreich produzierte Rohmilch erreicht höchste Qualitäts-Standards, gekennzeichnet durch den hohen Anteil an gelieferter S-Klasse Milch und fast ausschließlich Milch ohne Qualitätsabzüge. Die Beurteilung der Rohmilchqualität findet nach den Inhaltsstoffen Milchfett und Milcheiweiß, sowie den Qualitätskriterien Zellgehalt, Keimzahl, Gefrierpunkt und Hemmstoffnachweis in der Milch statt. Die Milchuntersuchungen der Einzeltiere durch den LKV und der Tankmilch durch die Molkereien schafft in Österreich die Grundlage für die strenge Kontrolle milchliefernder Betriebe. Um die hohe Rohmilchqualität in Österreich im Zusammenhang mit der Tiergesundheit zu stellen, standen in dieser Arbeit ZZ, Keimzahl, Inhaltsstoffe, Fruchtbarkeitsdaten, Leistungsdaten und molekularbiologische Untersuchungen auf Mastitis-Erreger, von den einzelnen Kühen und der Tankmilch der untersuchten Betriebe zur Verfügung. Die Ergebnisse wurden unter anderem mit der Einteilung der Betriebe in hohe und niedrige ZZ-Klasse, Haltungssart, Betriebsgröße, Jahresverlauf und Rasse in Zusammenhang gebracht. Betriebe in ZZ-Klasse 1 (< 200.000 Zellen) hatten niedrigere Fett- und Eiweißgehalte (bei den Einzeltieren), sowie höhere Harnstoffgehalte, als Betriebe in ZZ-Klasse 2 (>200.000 Zellen), ebenso ergaben sich Schwankungen der Milchinhaltsstoffe im Jahresverlauf und niedrigere Keimzahlen und Gützeiten in ZZ-Klasse 1. In ZZ-Klasse 1 tritt als Leitkeim 1 *Staphylococcus* spp. und als Leitkeim 2 *C. bovis* auf, weitere nachgewiesene Keime gehören zur Gruppe der minor pathogenen Mastitiserreger. In ZZ-Klasse 2 sind *C. bovis* Leitkeim 1 und *Staphylococcus* spp. Leitkeim 2, die weiteren gefundenen Euterpathogenen gehören vorwiegend zur Gruppe der major pathogenen. Betriebe in Anbindehaltung zeigten niedrigere Fett- und Eiweißgehalte, aber höhere Harnstoffgehalte und höhere Keimzahlen als Betriebe mit Laufstallhaltung. Die ZZ steigt mit steigender Laktationszahl und Gützeit, sowie innerhalb der Laktation, mit vorherigem Abfall bis zum 30. Laktationstag und anschließenden Anstieg bis zum Trockenstellen. Tiere mit hoher Milchleistung zeigen niedrigere Zellgehalte ( $R = -0,31$ ). Die Tankmilch der Betriebe spiegelt den Betriebsstatus durch starke Korrelation zwischen Inhaltsstoffen der Einzeltiere und der Tankmilch, sowie dem Wiederfinden der Leitkeime, in 75% der Fälle, wider.

## 7 SUMMARY

---

Raw milk produced in Austria achieves the highest quality standards, characterized by the high proportion of S-Class milk and almost exclusively milk without quality deductions. The evaluation of raw milk quality is based on the ingredients milk fat and milk protein, quality criteria somatic-cell count (SCC), total bacteria count, freezing point and residues of antibiotics in milk. Quality control of individual animals by the LKV and bulk-tank milk by the dairies create the basis for strictly controlled dairy farms in Austria. To connect the high quality of raw milk in Austria with animal health, the focus of this work was on SCC, total bacteria count, ingredients, fertility data, milk yield and mastitis pathogens, milk data from individual cows and herds. Results were linked to SCC classification (1 = low, <200,000 cells 2 = high, >200,000 cells), husbandry system, herd size, seasonal effects and animal breed. Farms in SCC-class 1 had lower fat and protein contents (in the individual animals), as well as higher urea contents than farms in SCC-class 2. There were also fluctuations in milk ingredients over the course of the year and lower bacterial counts and service periods in SCC-class 1. In SCC-class 1, *Staphylococcus* spp. was the most often detected bacterium, *C. bovis* the second, other present bacteria belong to the group of minor pathogenic bacteria. In SCC-class 2, *C. bovis* was the most frequent detected, and *Staphylococcus* spp. the second-most, other udder pathogens belong to the group of major pathogens. Tie-stall farms showed lower fat and protein contents, higher urea contents and higher total bacteria counts than farms with loose housing. SCC increases with increasing lactation number and service period, as well as during lactation, with a previous decrease until 30 day in milk and subsequent rise to drying point also in healthy animals. Animals with high milk yield show lower SCC ( $R = -0.31$ ). The bulk-tank milk reflects the farm status well, proven by strong correlation between tank-milk ingredients and individual animal data, as well as the detection of the mastitis pathogens from individual animal samples in 75% of tank milk samples.

## **8 FÖRDERHINWEIS**

---

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens des Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation (FFoQSI) erstellt. Das COMET-K1 Kompetenzzentrum FFoQSI wird im Rahmen von COMET – Competence Centers for Excellent Technologies durch BMVIT, BMDW und die Bundesländer Niederösterreich, Oberösterreich und Wien gefördert. Das Programm COMET wird durch die FFG abgewickelt.

Diese Arbeit wurde von der Österreichischen Buiatrischen Gesellschaft (ÖBG) gefördert.

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

µl	Mikroliter
rpm	Umdrehungen pro Minute
AB	Anbindehaltung
Abb	Abbildung
AMA	Agrar Markt Austria
BCa	angepassten Bootstrap Methode
Aug	August
Blaz	<i>Staphylococcal</i> β-Laktamase-Gen
BV	Braunvieh
C. bov	<i>C. bovis</i> / <i>Corynebacterium bovis</i>
CMT	California-Mastitis-Test
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. col	<i>E. coli</i> / <i>Escherichia coli</i>
Ct	Cycle threshold
Enter	<i>Enterococcus spp.</i>
FV	Fleckvieh
HF	Holstein-Friesian
IAC	Interne-Amplifikations-Kontrolle
Jän	Jänner
Jul	Juli

Jun	Juni
KbE	koloniebildende Einheiten
KbE/ml	Koloniebildende Einheiten pro Milliliter
KZ	Keimzahl
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LKV	Leistungskontrollverband
LF	Laufstallhaltung
Lfd Nr	laufende Nummer
LK	Leitkeim
log	logarithmisch
Mär	März
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
n	Anzahl
Nov	November
p	Signifikanz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
py/in	<i>T. pyogenes</i> / <i>Trueperella pyogenes</i>
qPCR	quantitativen PCR
R	Korrelationskoeffizient nach Pearson
S. aur	<i>S. aureus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i>
S. dys	<i>Sc. dysgalactiae</i> / <i>Streptococcus dysgalactiae</i>

S. uber *Sc. uberis* / *Streptococcus uberis*

SCC Somatic cell count / Zellzahl

Sept September

spp species pluralis

Staph *Staphylococcus* spp.

Tab Tabelle

ZZ Zellzahl

ZZ/ml Zellzahl pro Milliliter

ZZ-Klasse Zellzahl Klasse

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

---

Agrar Markt Austria: Milch und Milchprodukte

<https://www.ama.at/Marktinformationen/Milch-und-Milchprodukte/Aktuelle-Informationen>  
(Zugriff 08.01.2020)

Alhussien M, Dang A. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World* 11 (5), 562–577. DOI: 10.14202/vetworld.2018.562-577.

Archer S, Mc Coy F, et al. 2013. Association of season and herd size with somatic cell count for cows in Irish, English, and Welsh dairy herds. *Veterinary Journal* 196 (3), 515–521. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.12.004.

Baumgartner W, Hrsg. 2018. Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere. Neunte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 385-386

Borneman D, Ingham S. 2014. Correlation between standard plate count and somatic cell count milk quality results for Wisconsin dairy producers. *Journal of Dairy Science* 97 (5), 2646–2652. DOI: 10.3168/jds.2013-7784.

Bundesministerium für Gesundheit, Sport und Konsumentenschutz: Milchhygieneverordnung. <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010738&FassungVom=2000-12-31> (Zugriff 19.02.2020)

Bundesministerium für Gesundheit, Sport und Konsumentenschutz: Erzeuger-Rahmenbedingungen-Verordnung

<https://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/Bundesnormen/NOR40211309/NOR40211309.html>  
(Zugriff 13.03.2020)

Burvenich C, van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research* 34 (5), 521–564. DOI: 10.1051/vetres:2003023.

- Cinar M, Serbester U, Ceyhan A, Gorgulu M. 2015. Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* 14 (1), 3646. DOI: 10.4081/ijas.2015.3646.
- Derakhshani H, Fehr K B, Sepehri S, Francoz D, de Buck J, Barkema H W, Plaizier J C, Khafipour E. 2018. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science* 101 (12), 10605–10625. DOI: 10.3168/jds.2018-14860.
- Deutz A, Obritzhauser W, Hrsg. 2003. Eutergesundheit und Milchqualität. Krankheiten erkennen, vorbeugen, behandeln. Graz: Stocker, 21-22
- dos Reis M, Barreiro R, Moreno G, Porcionato F, Santos V. 2011. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *Journal of Dairy Science* 94 (9), 4406–4412. DOI: 10.3168/jds.2010-3776.
- Fahr R, Lengerken G, Hrgs. 2003. Milcherzeugung. Grundlagen - Prozesse - Qualitätssicherung. Frankfurt am Main: Dt. Fachverl, 400-520
- Flere D, Povše M P, Škorjanc D, Janžekovič M, Jeretina J. 2016. Evaluation of factors affecting somatic cell count in milk. *Acta Argiculturae Slovenica* 5 (1), 148–153.
- Hand K J, Godkin A, Kelton D F. 2012. Milk production and somatic cell counts: a cow-level analysis. *Journal of Dairy Science* 95 (3), 1358–1362. DOI: 10.3168/jds.2011-4927.
- Heikkilä A-M, Liski E, Pyörälä S, Taponen S. 2018 Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 101 (10), 9493–9504. DOI: 10.3168/jds.2018-14824.
- Hogeveen H, Huijps K, Lam T J G M. 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal* 59 (1), 16–23. DOI: 10.1080/00480169.2011.547165.
- Koskinen M T, Wellenberg G J, Sampimon O C, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L. 2010. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for

identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science* 93 (12), 5707–5715. DOI: 10.3168/jds.2010-3167.

Krömker V, Bruckmaier R, Hrsg. 2007. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Stuttgart: Parey, 47-102

Krömker V, Reinecke F, Paduch J-H, Grabowski N. 2014. Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis. *Clinical Microbiology* 03 (04), 1–2. DOI: 10.4172/2327-5073.1000157.

Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M, Hrsg. 2014. Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Dritte überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke, 91-100

Kulkarni A, Kaliwal B B, Plastridge W N. 2013. Bovine Mastitis: A Review. *Journal of Dairy Science* 41 (9), 544–545. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(58)91071-3.

LKV Austria: Leistungsprüfung <https://lkv.at/at/leistungspruefung/> (Zugriff 08.01.2020)

O'Connell A, McParland S, Ruegg P L, O'Brien B, Gleeson D. 2015. Seasonal trends in milk quality in Ireland between 2007 and 2011. *Journal of Dairy Science* 98 (6), 3778–3790. DOI: 10.3168/jds.2014-9001.

Piessens V, Vliegheer S, Verbist B, Braem G, van Nuffel A, Vuyst L. 2012. Characterization of *coagulase-negative staphylococcus* species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *Journal of Dairy Science* 95 (12), 7027–7038. DOI: 10.3168/jds.2012-5400.

Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford T, Ross R P, Fitzgerald G, Cotter P. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* 37 (5), 664–698. DOI: 10.1111/1574-6976.12030.

Rollin E, Dhuyvetter K C, Overton M W. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine* 122 (3), 257–264. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.11.006.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research* 34 (5), 475–491. DOI: 10.1051/vetres:2003027.

Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. 2015. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Zehnte aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 85-297

St Rose S, Swinkels J, Kremer W, Kruitwagen C, Zadoks R. 2003 Effect of penethamate hydriodide treatment on bacteriological cure, somatic cell count and milk production of cows and quarters with chronic subclinical *Streptococcus uberis* or *Streptococcus dysgalactiae* infection. *Journal of Dairy Research* 70 (4), 387–394. DOI: 10.1017/S0022029903006460.

Steinwider Andreas: Milchinhaltstoffe - Fütterung <https://www.raumberg-gumpenstein.at/cm4/de/forschung/publikationen/downloadsveranstaltungen/finish/3213-pdf-vorlesungsdateien/30168-boku-milchinhaltstoffe> (Zugriff 12.03.2020)

Steinwider A, Häusler J. 2012. Möglichkeiten und Grenzen der Weidehaltung von Milchkühen im Berggebiet Österreichs. [Vortrag]. In: Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein. Tierärztliche Bestandsbetreuung - Fokus Fütterung. Tierärztetagung. Irdning. 31.5.2012

Süntinger S. 2018. Bakteriologische Milchuntersuchung - Nutzen für Zucht und Herdenmanagement. [Vortrag]. In: ZAR - Zentrale Arbeitsgemeinschaft österreichischer Rinderzüchter. Brennpunkt Eutergesundheit und Antibiotikaeinsatz. Seminar des Ausschusses für Genetik. Salzburg. 8.3.2018.

Thermo Fisher Scientific Inc.: Thermo Scientific PathoProof Complete-16 kit Instructions for Use <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/PF1600LB?SID=srch-srp-PF1600LB> (Zugriff 08.01.2020)

van Schaik G, Lotem M, Schukken Y H. 2002. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. *Journal of Dairy Science* 85 (4), 782–789. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74136-2.

Winter P, Hrsg. 2009. Praktischer Leitfaden Mastitis. Stuttgart: Parey, 40-91

Winter P. 2010. Die Zellzahl in der Milch als Grundlage zur Sanierung von Mastitis-Problembetrieben. [Vortrag]. In: Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein. Tierärztliche Bestandsbetreuung für Milchviehbetriebe. Tierärztetagung. Irdning. 28.5.2010

## 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb.: 1: Pipetierschema der PCR Deepwell 96 well plate .....	17
Abb. 2: Tankmilch-Keimzahl nach Haltungsformen .....	24
Abb. 3: Tankmilch-Keimzahl bei unterschiedlichen Betriebsgrößen .....	24
Abb. 4: Tankmilch-Keimzahl bei Einteilung in ZZ-Klassen .....	25
Abb. 5: Einzeltier-ZZ im Jahresverlauf .....	26
Abb. 6: Einzeltier-ZZ nach Betriebsgröße .....	27
Abb. 7: Tankmilch-ZZ nach Betriebsgröße .....	28
Abb. 8: Einzeltier-ZZ bei den unterschiedlichen Hauptrassen .....	28
Abb. 9: Tankmilch-ZZ bei den unterschiedlichen Hauptrassen .....	29
Abb.: 10 Korrelation der Milchmenge der Einzeltiere zur Einzeltier-Zellzahl .....	30
Abb. 11: Verlauf der Zellzahl mit Anzahl der Laktationen .....	32
Abb. 12: Zellzahlverlauf innerhalb einer Laktation .....	33
Abb. 13: Häufigkeiten der Erregernachweise in den Sammelgemelken .....	35
Abb. 14: Häufigkeiten der Erregernachweise in der Tankmilch .....	36
Abb. 15: Aufteilung der Euterpathogene in die ZZ-Klassen 1 und 2 .....	38

## 12 TABELLENVERZEICHNIS

---

Tab. 1: Betriebsaufstellung .....	13
Tab. 2: Deskriptive Statistik aller 22 Betriebe .....	21
Tab. 3: Vergleichende Statistik für Milchfett, Milcheiweiß und Harnstoffgehalt .....	22
Tab. 4: Korrelationen Tankmilch-ZZ mit Einzeltier-ZZ innerhalb einzelner Betriebe .....	30
Tab. 5: Korrelationen Tankmilch-ZZ und Einzeltier-ZZ nach Monaten .....	31
Tab. 6: Deskriptive Statistik der detektierten Keime .....	34
Tab. 7: Auflistung der Keime in Sammelgemelken und Tankmilchproben .....	36