

## Abschlusssymposium 12.09.2014

### BMEL/BLE-Projekt 2810HS005 „Bedeutung von *Clostridium botulinum* bei chronischem Krankheitsgeschehen“

Moderation: M. Hoedemaker

Uhrzeit	Thema	Referent
9.00-9.15	Begrüßung	G. Greif, H.-J. Bätza (Hannover, Bonn)
9.15-9.30	2810HS005 – Das Projekt	M. Hoedemaker (Hannover)
9.30-9.55	Die Task Force: Daheim und unterwegs	F. Gundling (Hannover)
9.55-10.15	<i>C.-botulinum</i> -Diagnostik: Nachweis der Toxingene mittels PCR – Ergebnisse und Bedeutung	S. Fohler, S. Discher (Hannover, Jena)
10.15-10.35	<i>C.-botulinum</i> -Diagnostik: Nachweis des Toxins mittels Maus-Bioassay – Ergebnisse und Bedeutung	C. Seyboldt (Jena)
10.35-11.05	<b>KAFFEEPAUSE</b>	
11.05-11.30	Vorkommen von Clostridienspezies in Tier- und Umgebungsproben aus Fall- und Kontrollbetrieben	S. Fohler (Hannover)
11.30-11.55	Beziehungen zwischen Clostridien-Risikofaktoren und Fall-/Kontrollstatus	M. Hoedemaker (Hannover)
11.55-12:10	Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft der Clostridien in Pansen und Darm von Rindern bei chronischem Krankheitsgeschehen?	S. Riede (Hannover)
12.00-12.30	Gärreste aus Biogasanlagen – Ein Sicherheitsrisiko?	B. Köhler (Potsdam)
12.30-13.50	<b>MITTAGESSEN</b>	
13.50-14.15	„Chronischer Botulismus“ – Gibt es ein spezifisches Krankheitsbild?	T. Scheu (Hannover)
14.15-14.40	Chronisches Krankheitsgeschehen – Was könnte noch die Ursache sein?	T. Scheu (Hannover)
14.40-15.05	Grundfutterqualität – Ein Problem?	A. Wichern (Hannover)
15.05-15.35	<b>KAFFEEPAUSE</b>	
15.35-16.35	Einflüsse auf das chronische Krankheitsgeschehen – Eine epidemiologische Bewertung	K.C. Jensen, A. Campe, (Hannover)
16.35-16.50	Fazit	M. Hoedemaker (Hannover)
16.50- 17.30	Abschluss-Diskussion	Moderation: M. Hoedemaker (Hannover)

**Projektkoordination:**

Prof. Dr. Martina Hoedemaker, Ph.D.  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567246  
 Fax: 0511-856827246  
 Email: [Martina.Hoedemaker@tiho-hannover.de](mailto:Martina.Hoedemaker@tiho-hannover.de)

**Projektpartner Tierärztliche Hochschule:  
Klinik für Rinder (RiKli)**

Dr. Wolfgang Kehler  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567442  
 Fax: 0511-8567693  
 Email: [Wolfgang.Kehler@tiho-hannover.de](mailto:Wolfgang.Kehler@tiho-hannover.de)

Dr. Martin Höltershinken  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567408  
 Fax: 0511-8567693  
 Email: [Martin.Hoeltershinken@tiho-hannover.de](mailto:Martin.Hoeltershinken@tiho-hannover.de)

Dr. Maren Feldmann  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567338  
 Fax: 0511-856827338  
 Email: [Maren.Feldmann@tiho-hannover.de](mailto:Maren.Feldmann@tiho-hannover.de)

Dr. Theresa Scheu  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567418  
 FAX: 0511-856827418  
 Email: [Theresa.Scheu@tiho-hannover.de](mailto:Theresa.Scheu@tiho-hannover.de)

Dr. Anika Wichern  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8657418  
 FAX: 0511-856827418  
 Email: [Anika.Wichern@tiho-hannover.de](mailto:Anika.Wichern@tiho-hannover.de)

TA Frieder Gundling  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567411  
 FAX: 0511-856827411  
 Email: [Frieder.Gundling@tiho-hannover.de](mailto:Frieder.Gundling@tiho-hannover.de)

TA Phuong Do Duc  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567411  
 FAX: 0511-856827411  
 Email: [Phuong.Do.Duc@tiho-hannover.de](mailto:Phuong.Do.Duc@tiho-hannover.de)

**Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit  
(LMQS):**

Prof. Dr. Günter Klein  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567256  
 Fax: 0511-8567694  
 Email: [Guenter.Klein@tiho-hannover.de](mailto:Guenter.Klein@tiho-hannover.de)

PD Dr. Amir Abdulmawjood  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567440  
 Fax: 0511-8567694  
 Email: [Amir.Abdulmawjood@tiho-hannover.de](mailto:Amir.Abdulmawjood@tiho-hannover.de)

TÄ Svenja Fohler  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover  
 Tel.: 0511-8567555  
 FAX: 0511-8577694  
 Email: [Svenja.Fohler@tiho-hannover.de](mailto:Svenja.Fohler@tiho-hannover.de)

**Institut für Biometrie, Epidemiologie und  
Informationsverarbeitung (IBEI)**

Prof. Dr. Lothar Kreienbrock  
 Bünteweg 2  
 30559 Hannover  
 Tel.: 0511-9537950  
 Fax: 0511-9537974  
 Email: [Lothar.Kreienbrock@tiho-hannover.de](mailto:Lothar.Kreienbrock@tiho-hannover.de)

Dr. Amely Campe  
 Bünteweg 2  
 30559 Hannover  
 Tel.: 0511-9537961  
 Fax: 0511-9537974  
 Email: [Amely.Campe@tiho-hannover.de](mailto:Amely.Campe@tiho-hannover.de)

TÄ Katharina Charlotte Jensen  
 Bünteweg 2  
 30559 Hannover  
 Tel.: 0511-9537953  
 FAX: 0511-9537974  
 Email: [Katharina.Jensen@tiho-hannover.de](mailto:Katharina.Jensen@tiho-hannover.de)

**Physiologisches Institut (Physio)**

Prof. Dr. Gerhard Breves  
Bischofsholer Damm 15  
30173 Hannover  
Tel.: 0511-8567380  
Fax: 0511-8567687  
Email: [Gerhard.Breves@tiho-hannover.de](mailto:Gerhard.Breves@tiho-hannover.de)

Dr. Susanne Riede  
Bischofsholer Damm 15  
30173 Hannover  
Tel.: 0511-8567294  
Email: [Susanne.Riede@tiho-hannover.de](mailto:Susanne.Riede@tiho-hannover.de)

**Projektpartner: Friedrich-Loeffler-Institut, Jena**

Dr. Christian Seyboldt  
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen  
Friedrich-Loeffler-Institut  
Naumburger Str. 96 a  
07743 Jena  
Tel.: 03641-8042295  
Email: [Christian.Seyboldt@fli-bund.de](mailto:Christian.Seyboldt@fli-bund.de)

## 2810HS005 – Das Projekt

Martina Hoedemaker

Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover

Seit einigen Jahren wird von dem vermehrten Auftreten eines chronischen Krankheitsgeschehens in Milchviehbetrieben berichtet, welches mit vielfältigen, z.T. unspezifischen klinischen Symptomen insbesondere bei hochleistenden Milchkühen in der Früh lactation einhergeht. Letztendlich führt es zu chronischem Siechtum oder Tod der erkrankten Tiere und verursacht erhebliche wirtschaftliche Verluste in den betroffenen Betrieben. Da mit gängigen Untersuchungsprotokollen keine Klärung der Ursachen dieses chronischen Krankheitsbildes erzielt wurde, aber bei mikrobiologischen Untersuchungen Botulinumneurotoxin (BoNT) im Gastrointestinaltrakt und in den Organen erkrankter oder gestorbener Tiere gefunden wurde, wurde eine Toxikoinfektion mit *Clostridium (C.) botulinum* postuliert und die Krankheitssymptomatik mit der Toxinwirkung in Zusammenhang gebracht. Das Krankheitsbild wurde als „chronischer“ oder „viszeraler“ Botulismus bezeichnet und vom klassischen Botulismus abgegrenzt (2).

Bei dem Krankheitsbild wird eine Toxikoinfektion mit *C. botulinum* analog dem Säuglingsbotulismus oder dem intestinalen Botulismus beim Menschen postuliert (3). Die Tiere sollen hierbei Clostridien sporen aufnehmen, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, den Pansen und den Dünndarm zu passieren und in den Dickdarm zu gelangen. Nach Auskeimung werden dort kontinuierlich kleinste Toxinmengen freigesetzt, die dann nach Resorption für die verschiedensten Krankheitssymptome verantwortlich sind und letztendlich eine chronische Krankheitssymptomatik hervorrufen (2). Bisher ist noch nicht bekannt, welche Faktoren das Auskeimen und die Toxinbildung begünstigen. Zur Zeit haben die vorgestellten kausalen Zusammenhänge zwischen *C. botulinum* und dem chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehherden hypothetischen Charakter, da nachhaltige und belastbare wissenschaftlichen Studien, die diese untermauern, nicht vorgelegt wurden. Dies hat letztendlich dazu geführt, dass der sog. viszerale Botulismus bisher nicht als eigenständige Krankheit offiziell anerkannt wurde. Die wichtigsten Gründe hierfür sind:

1. Es fehlt eine klare Falldefinition aufgrund der vielen unspezifischen klinischen Symptome auf Tier- und Herdenebene. Daten über eine systematische Erhebung der Betriebsgegebenheiten in Verbindung mit einer gründlichen Einzeltierdiagnostik in einer statistisch auswertbaren Größenordnung wurden bisher nicht publiziert.
2. Die Tatsache, dass *C. botulinum* sowohl im Darmtrakt von gesunden als auch von kranken Tieren gefunden wird (4), führt zu Unsicherheiten in der Bewertung von positiven mikrobiologischen Befunden. Bisher wurde überwiegend nur in

Problembetrieben auf *C. botulinum* untersucht, es fehlen epidemiologische Daten aus unverdächtigen Betrieben und von klinisch gesunden Tieren.

3. Für ein chronisches Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben gibt es mehr als 20 Differentialdiagnosen, die berücksichtigt werden müssen.

Um die Zusammenhänge zwischen dem chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und *C. botulinum* oder seinen BoNT zu klären, wurde vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft unter der Trägerschaft der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung ein Forschungsprojekt (2810HS005) gefördert. Hierbei handelte es sich um eine epidemiologische Studie, die in Form einer Fall-Kontroll-Studie durchgeführt wurde. Bei einer Fall-Kontroll-Studie werden aus einer Studienpopulation Fälle (z.B. Herden mit chronischem Krankheitsgeschehen) und Kontrollen (unauffällige Betriebe) identifiziert. Dann werden mögliche Risiko- oder Expositionsfaktoren analysiert (z.B. Vorkommen von *C. botulinum*, andere Infektionskrankheiten, andere mögliche Differentialdiagnosen, Haltungs-, Fütterungs- und Managementfaktoren). Kommt ein bestimmter Expositionsfaktor häufiger in den Fällen als in den Kontrollen vor, besteht eine Assoziation, die auf mögliche kausale Zusammenhänge schließen lässt. Wie die Kausalitäten genau sind, kann im Rahmen einer Fall-/Kontrollstudie nicht geklärt werden. Hierzu sind dann weitergehende Untersuchungen notwendig. In der hier durchgeführten Studie galt der Nachweis von *C. botulinum* oder seinen BoNT als Hauptexpositionsfaktor. Zusätzlich wurden viele andere mögliche Faktoren untersucht aus dem Bereich der Differentialdiagnosen, der Haltung, der Fütterung und dem Management, die in irgendeiner Weise mit dem chronischen Krankheitsgeschehen in Verbindung stehen könnten. Insgesamt sollten 150 Betriebe (50 Kontrollen (K), 50 Betriebe ohne jegliche Clostridienimpfung (F1) und 50 Betriebe mit Clostridienimpfung außer gegen *C. botulinum* (F2) untersucht werden.

Fallbetriebe wiesen ein chronisches Krankheitsgeschehen auf, das bei der Auswahl anhand von fünf Einschlusskriterien definiert war (herabgesetzte Milchleistung, erhöhte Abgangsrate, erhöhte Rate von Todesfällen, erhöhtes Aufkommen von milchfieberartigem Festliegen, Eindruck eines erhöhten Krankheitsaufkommens). Mindestens drei von fünf Kriterien mußten erfüllt sein. Kontrollbetriebe durften keines der Einschlusskriterien erfüllen. Als Studienregion galt die Norddeutsche Tieflandebene, weil dort eine Konzentrierung von Botulismuszufällen zu finden war (1) und ähnliche Betriebsstrukturen vorhanden waren (5). In jedem Betrieb wurden fünf klinisch unauffällige und fünf chronisch kranke Tiere ausgesucht und klinisch untersucht. Des Weiteren erfolgte eine detaillierte Erhebung über die Betriebsgegebenheiten einschließlich Haltung, Hygiene, Fütterung und Management sowie Untersuchungen auf mögliche Differentialdiagnosen. Tier- und Futterproben wurden auf *C. botulinum*, seinen BoNT und das Vorhandensein des BoNT-Gens in verschiedenen Instituten untersucht.

Mit dem vorliegenden Versuchsdesign sollten folgende Hypothesen getestet werden:

1. Es besteht eine Beziehung zwischen einem chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und dem Nachweis toxinogener *C.-botulinum*-Stämme bzw. BoNT.
2. Der Nachweis toxinogener *C.-botulinum*-Stämme bei chronisch kranken Tieren steht in Zusammenhang zu seiner Herkunft aus einem Fallbetrieb (d.h. ein Betrieb mit chronischem Krankheitsgeschehen).
3. Anhand der klinischen Symptomatik lässt sich eine eindeutige Falldefinition auf Betriebs- und Einzeltierebene erstellen.

Insgesamt gab es 287 gemeldete Betriebe, von denen 139 die Einschlusskriterien erfüllten. Davon waren n=45 F1-Betriebe, n=47 F2-Betriebe und n=47 Kontrollbetriebe. Es wurden 1390 Kühe untersucht, von denen 1389 Tiere ausgewertet werden konnten.

#### Literatur

1. Böhnel, H. u. F. Gessler (2012): Hinweise zum Vorkommen von Rinderbotulismus in Deutschland anhand von Laboruntersuchungen der Jahre 1996-2010. Tierärztl. Umsch., 67, 251-256
2. Böhnel, H., B. Schwagerick u. F. Gessler (2001): Visceral botulism – A new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. J. Vet. Med. 48, 373-383
3. EVSA (2005): Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the Commission related to *Clostridium spp.* in foodstuff. The EFSA Journal 199, 1-65
4. Dahlenborg, M., B. Borch u. P. Radström (2003): Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle. Int. J. Food Microbiol. 82, 105-110
5. Merle, R., M. Busse, G. Rechter u. U. Meer (2012): Regionalisierung Deutschlands anhand landwirtschaftlicher Strukturdaten. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 8, 52-59

## **Die Task Force: Daheim und unterwegs**

Frieder Gundling, Theresa Scheu

Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover

Für die Durchführung der Fall-Kontroll-Studie wurden vier Tierärzte an der Klinik für Rinder (Rikli) der Stiftung Tierärztlich Hochschule (TiHo) angestellt. Deren Hauptaufgabe lag in der Rekrutierung und dem Besuch der Betriebe, sowie der Anfertigung von ausführlichen Berichten für die teilgenommenen Landwirte während der Laufzeit des Projektes. Die Meldung der Betriebe erfolgte wahlweise durch den Landwirt selbst, den Hoftierarzt oder durch Berater entweder per Telefon, Fax, Mail oder über ein Melde-Tool auf der eigens dafür konzipierten Homepage.

### **Rekrutierung und Validierung der Betriebe**

Die Betriebe mit Boxenlaufstall-Haltung mussten in der Studienregion (norddeutsches Tiefland) liegen und mit mindestens 30 laktierenden Tieren der Milchleistungsprüfung angeschlossen sein. Eine Impfung gegen *C. botulinum* musste mindestens 3 Jahre zurückliegen, eine aktuelle Impfung gegen andere Clostridien-Spezies wurde toleriert (Fall2-Betriebe). Das Vorhandensein eines chronischen Krankheitsgeschehens wurde anhand folgender fünf Kriterien überprüft:

- Milchrückgang > 15 % über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten
- Todesfälle/Euthanasie > 5 % der Herde in den letzten 12 Monaten
- Abgangsrate (ohne Zuchtviehverkauf) > 35 % der Herde oder Erhöhung der Abgangsrate um 10 % oder mehr (z.B. von 28 % auf 39 %) in den letzten 12 Monaten
- Milchfieberartiges Festliegen > 10 % in den letzten 12 Monaten
- Erhöhte Krankheitsrate (subjektiv durch Landwirt und Hoftierarzt eingeschätzt)

Ein Verdachtsbetrieb musste drei von fünf der genannten Kriterien erfüllen, ein Kontrollbetrieb durfte keines der Kriterien erfüllen. Im Zuge eines oder mehrerer Telefoninterviews wurden die Angaben der Landwirte erhoben und im Falle einer Teilnahme mit Hilfe der Daten der Milchleistungsprüfung validiert.

### **Ablauf des Betriebsbesuchs**

Zunächst erfolgte zur Orientierung ein Rundgang durch den Betrieb. Zwei der vier Tierärzte begannen mit der Erfassung der Herdenindices wie Body Condition Scoring (BCS), Bewegungsscore bei allen laktierenden Tieren und Trockenstehern sowie Hygienescore und Bonitierung hervorstehender Knochenpunkte bei einer Stichprobe an Tieren. Hierbei wurden potentielle Kontroll- und Verdachtstiere für die Einzeltieruntersuchung ausgewählt und markiert. Für den Einschluss als Verdachtstier galten die Hauptkriterien Abmagerung und Habitus eines chronisch kranken Tieres (Dirksen et al. 2012). Zusätzlich musste noch

mindestens eines der beim chronisch-viszeralen Botulismus (Schwagerick u. Böhnel 2001) beschriebenen Symptome vorhanden sein:

- Herabgesetzte Milchleistung im Vergleich zum Herdendurchschnitt um 20 %
- Bewegungsscore (nach Sprecher et al. 1997)  $\geq 3$
- Parese, Paralyse, Ataxie (steifes oder schwankendes, unkoordiniertes Gangbild)
- Diarrhoe (Durchfall), Obstipation (Verstopfung)
- Verhaltensänderung (träge), Gehschwäche
- Sensorische Störung (Lid, Ohr-, Hautreflexe herabgesetzt oder fehlend)
- Dyspnoe (angestrengte Atmung)
- Kreislaufstörung (positiver Venenpuls)
- Bulbärparalyse (Lähmung der Kopfnerven)
- Klauenrehe (Stoffwechsel- /Belastungs-bedingte Veränderungen an den Klauen)
- Aufgezogener Bauch

Kontrolltiere durften keines der genannten Symptome aufweisen, mussten lahmheitsfrei sein und nicht an einer akuten Erkrankung leiden. Pro Betrieb wurden fünf Verdachts- und fünf Kontrolltiere untersucht. Gab es mehr Verdachts- oder Kontrolltiere, erfolgte eine randomisierte Auswahl.

Jedes der 10 Tiere wurde einer standardisierten gründlichen klinischen Untersuchung inklusive einer neurologischen Untersuchung unterzogen (Dirksen et al. 2012). Im Anschluss wurden Kotproben, Blutproben, Harnproben und Pansensaftproben (mittels Schlund-Sonde) gewonnen. Aus dem Schopfhaar wurden Haarproben entnommen. Verdachtstiere mit einem Bewegungsscore  $\geq 3$  wurden einer eingehenden Lahmheitsuntersuchung und systematischen Untersuchung der Klauen mit Nachschneiden und ggf. tierärztlicher Behandlung im Klauenstand unterzogen.

Der dritte Studentierarzt führte ein Fragebogen-Interview mit dem Landwirt zur Erfassung von Betriebscharakteristika, Haltung, Fütterung (Rationsdaten), Gesundheitsstatus der Herde, Management und Risikofaktoren für Clostridieninfektionen durch. Dieser Tierarzt beurteilte im Anschluss die Silagen, die aktuell offen lagen und an die laktierenden Kühe und Trockensteher verfüttert wurden am Silo makroskopisch und entnahm Proben. Weiterhin wurden die übrigen Futtermittel-Komponenten, sowie die vorgelegte Ration grobsinnlich beurteilt. Wasserproben wurden i.d.R. an der Zuleitung zum Stall und eine Milchprobe aus dem Milchtank entnommen.

Der vierte Tierarzt führte in den Stallabteilen, in denen die laktierenden Tiere und Trockensteher aufgestallt waren, eine Beurteilung des Haltungssystems (Anzahl Liegeboxen und Fressplätze inklusive einer Vermessung von jeweils 4 Boxen bzw. von Liegeflächen)



sowie von Stallhygiene und Stallluft durch. Eine Auszählung von Kuh-Komfort- und Wiederkauindex, sowie den Wiederkauschlägen von fünf Tieren wurde ebenfalls durchgeführt.

### Probenuntersuchung

1. Im klinisch-chemischen Labor der RiKli erfolgte die Analyse von Serum und EDTA-Blut.
  - Blutbild: Erythrozytengehalt, Hämatokrit, Hämoglobingehalt, MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin), Leukozytengehalt, Thrombozytengehalt
  - Gehalt an Bilirubin, Gesamteiweiß, freien Fettsäuren,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, Cholesterin, Vitamin A, Vitamin E, Kupfer, Zink, Selen, Aktivität der Enzyme des Leberstoffwechsels: AST (Aspartataminotransferase),  $\gamma$ -GT (Glutamyltranspeptidase), GLDH (Glutamatdehydrogenase) und eine Glutaraldehydprobe (Schnelltest auf Entzündung)
  - Kotproben: Magen-Darm-Würmer, Leberegel, Kokzidien, Lungenwürmer Sedimentationsverfahren
2. Im Institut für Mikrobiologie der TiHo wurden Einzelkotproben kulturell auf Salmonellen und Poolproben jeweils von den fünf Kontroll- und Verdachtstieren kulturell auf *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP) untersucht.
3. Im Institut für Parasitologie wurden Serumproben auf Lungenwurm-Antikörper (AK) und die Tankmilchprobe auf Leberegel-AK mittels ELISA untersucht.
4. In der IVD GmbH Hannover wurden Serumproben auf AK gegen Chlamydien (KBR) und gegen Coxiellen (KBR) analysiert.
5. Im Institut für Tierernährung der TiHo wurden die Silageproben grobsinnlich und der pH-Wert sowie der Trockensubstanzgehalt und nur bei den Grassilagen der Rohproteingehalt, der Reineiweißgehalt und der Aschegehalt bestimmt. Ein Aliquot der Silagen wurde zur Bestimmung des aeroben Gesamtkeimgehalts mit Leitkeimbestimmung sowie des Gehalts an Schimmelpilzen und Hefen an das Institut für Mikrobiologie weitergeleitet.
6. Im Institut für Futtermittel der LUFA Nord-West, Oldenburg wurden die Tränkwasserproben grobsinnlich beurteilt und untersucht.
  - Mikrobiologie: Aerobe Gesamtkeimzahl bei 22 °C und 36 °C (ISO 6222), Coliforme Keime und Escherichia (E.) coli (Methode: TrinkwV. 2001; LUFA Nord-West AA 1/3 534)

- Chemie: Gesamt-Eisengehalt, elektr. Leitfähigkeit und daraus berechneter Salzgehalt, Nitrat, Nitrit, Ammonium, Oxidierbarkeit (KMnO<sub>4</sub>), Chlorid, Sulfat, Phosphat.
7. Die Untersuchung der Kot-, Pansensaft-, Silage- und Tränkwasserproben auf BoNT bzw. Clostridien erfolgte im LMQS und dem Institut für Mikrobiologie der TiHo, sowie dem FLI Jena und wird an anderer Stelle genauer erläutert.

## ***Clostridium-botulinum*-Diagnostik: Nachweis der Toxingene mittels PCR - Ergebnisse und Bedeutung -**

Svenja Fohler, Amir Abdulmawjood, Günter Klein

Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Tierärztliche Hochschule Hannover

Sabrina Discher, Eva Jordan, Christian Seyboldt, Heinrich Neubauer

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena

*Clostridium botulinum* wird, entsprechend dem dem Vorhandensein der Gene für unterschiedliche Neurotoxine (BoNT), in Typen unterteilt. Die Typen A, B, E und F verursachen Erkrankungen bei Mensch und Tier, C und D hingegen nur bei Tieren. Jedes der *C. botulinum* Neurotoxine (BoNT) wird durch ein Neurotoxinogen codiert. Diese Gene können mit Hilfe PCR-basierter Verfahren nachgewiesen werden.

### **Singleplex Real Time-PCR**

Im Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) sind von jedem Betrieb (n=139) Kot und Pansensaft von zehn Tieren sowie Futtermittel- und Wasserproben auf das Vorkommen der sechs Neurotoxinogenvarianten untersucht worden. Für die PCR Untersuchung wurde jede Probe nach einer vier bis sechstägigen Voranreicherung in Reinforced Clostridial Medium (RCM) mit sechs verschiedenen singleplex Real Time-PCR-Assays untersucht. Um falsch negative Resultate auszuschließen, wurde für jede Probe zusätzlich eine interne Amplifikationskontrolle durchgeführt.

Definiert wurde ein Betrieb als *C. botulinum*-positiv, wenn in mindestens einer Tierprobe (Kot oder Pansensaft) eine BoNT-Genvariante nachweisbar war.

Untersucht und ausgewertet wurden 2.776 Proben von 1.388 Tieren, sowie 411 Futtermittel- und 139 Wasserproben. In Tierproben von 25 Betrieben (17,99 %) wurde BoNT-Gen gefunden. Diese verteilten sich auf fünf Fall-1- (11,11 %), elf Fall-2- (23,40 %) und neun Kontroll-Betriebe (19,15 %). Der Nachweis von mehr als einer BoNT-Genvariante gelang für keinen Betrieb. In Proben von 19 Betrieben konnte die Variante A des Neurotoxinogens nachgewiesen werden. Die Varianten B, D und F wurden auf jeweils 3, 2 bzw. einem Betrieb gefunden. In keiner Probe konnten die Gene codierend für die Varianten C oder E nachgewiesen werden. Insgesamt war bei 86 (6,19 %) aller untersuchten Tiere eine der Toxinogenvarianten nachweisbar. Bei zehn dieser Tiere konnte das jeweilige Toxinogen sowohl im Pansensaft als auch im Kot nachgewiesen werden. Betrachtet man die positiven Tiere getrennt nach Betriebskategorien, zeigen sich Anteile von 4,00 %, 7,89 % und 6,60 % auf

Fall-1-, Fall-2- bzw. Kontrollbetrieben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Betriebskategorien hinsichtlich des Nachweises von *C. botulinum* Neurotoxigenen festgestellt werden.

### **Klassische Singleplex-PCR**

Am Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen des Friedrich-Loeffler-Instituts in Jena (FLI) wurden 1.388 Kotproben untersucht.

Ein Teilbereich der Untersuchungen war der Nachweis der *C. botulinum*-Neurotoxigenvarianten A-F mittels PCR. Dazu wurde DNA zum einen direkt aus den Kotproben isoliert. Zum anderen wurde ein Teil jeder Probe in ein flüssiges Nährmedium (Modifiziertes Kochfleisch-Medium, MCM) überführt und sieben Tage in Abwesenheit von Sauerstoff bebrütet, sodass potentiell vorhandene Sporen von *C. botulinum* auskeimen und wachsen konnten. Aus diesen Anreicherungskulturen wurde nachfolgend DNA zum Nachweis von Neurotoxigenen isoliert. Die PCR-Analysen fanden für die Genvarianten A-F getrennt statt (Singleplex). Hinzu kam eine Inhibitionskontrolle für jede Proben-DNA, um das Vorhandensein von Hemmstoffen aus dem Kot in der DNA auszuschließen. In der Summe wurden 2.776 DNA-Präparationen in 19.432 PCR-Einzelansätze zuzüglich Positiv- und Negativkontrollen sowie Wiederholungen bei positiven PCR-Befunden untersucht. Eine Kotprobe wurde als positiv eingestuft, wenn sich in der Proben-DNA wiederholt *C. botulinum*-Neurotoxigene nachweisen ließen. Bei einem als positiv eingestuften Betrieb waren in mindestens einer Kotprobe Toxingene wiederholt nachweisbar.

In den Proben-DNAs, die direkt aus den 1.388 Kotproben isoliert wurden, konnte in 2 Fällen ein Toxigen nachgewiesen werden. Die 2 positiven Kotproben (Toxigen Typ A, Toxigen Typ F) kamen aus zwei Fall-2-Betrieben. In DNA-Präparationen aus 26 Anreicherungskulturen waren Neurotoxigene (A, B, D, E oder F) von *C. botulinum* nachweisbar. Diese Proben stammten aus 13 verschiedenen Betrieben aller drei Kategorien (Fall-1-, Fall-2-, Kontrollbetriebe). Die Variante C des Neurotoxigens war in keiner Proben-DNA nachweisbar. Im Rahmen der FLI-Untersuchungen waren insgesamt 28 Kotproben positiv. Dies entspricht 2,02 % der 1.388 Kotproben. Die positiven Proben stammten aus 14 verschiedenen Betrieben. Somit waren in 10,07 % der 139 Betriebe *C. botulinum* Neurotoxigene nachweisbar. Bezogen auf die Betriebskategorie waren 17,78 % der F1-Betriebe (8 Betriebe mit 12 positiven Kotproben aus der Anreicherungskultur), 8,51 % der F2-Betriebe (4 Betriebe mit 10 positiven Kotproben aus der Anreicherungskultur und 2 positiven direkten Kotproben) und 4,26 % der Kontrollbetriebe (2 Betriebe mit 4 positive Kotproben aus der Anreicherungskultur) positiv. Betrachtet man die Verteilung der positiven Kotproben auf den Status der Tiere als Verdachts- (V) oder Kontrolltier (K), so zeigen sich in

keiner Betriebskategorie Unterschiede (Fall-1-Betriebe: 6 V, 6 K; Fall-2-Betriebe: 6 V, 6 K; Kontrollbetriebe: 2 V, 2 K).

### **Zusammenfassung**

Werden die Untersuchungsergebnisse der TiHo und des FLI zusammengefasst, so konnten bei Proben aus 34 Betrieben (24,5 % aller Betriebe) Neurotoxine nachgewiesen werden. Die als positiv eingestuften Betriebe teilen sich zu 22,2 %, 27,7 % und 23,4 % in Fall-1-, Fall-2- und Kontrollbetriebe auf. Somit sind keine Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben hinsichtlich des Vorkommens von Neurotoxinen feststellbar. Insgesamt waren nur zirka 8 % aller untersuchten Einzeltiere der 139 Betriebe positiv beim Neurotoxinen-Nachweis. Der Anteil positiver Verdachtstiere betrug in Fall-1-Betrieben 6,2 %, in Fall-2-Betrieben 11,1 % und in Kontrollbetrieben 6,8 %. Positive Kontrolltiere waren in Fall-1-Betrieben zu 5,8 %, in Fall-2-Betrieben zu 9,4 % und in Kontrollbetrieben zu 8,1 % vertreten. Beim Nachweis von Neurotoxinen bestehen folglich keine Unterschiede zwischen Verdachts- und Kontrolltieren in allen Betriebskategorien.

Zu beachten ist, dass der Nachweis der Toxine lediglich bedeutet, dass genetisches Material von *C. botulinum* in den Proben vorhanden war. Der Gen-Nachweis allein lässt keine Aussage darüber zu, ob *C. botulinum* in Tier-, Futtermittel- und Wasserproben zum Zeitpunkt der Probennahme tatsächlich lebens- und vermehrungsfähig war, Neurotoxin produzieren konnte und dies tatsächlich auch produziert hat.

Ein direkter und deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *C. botulinum* und einem chronischen Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben kann nicht bestätigt werden. Somit ist *C. botulinum* nicht der Hauptexpositionsfaktor für die Entstehung der Problematik in den betroffenen Betrieben.

## ***Clostridium botulinum*-Diagnostik: Nachweis des Toxins - Ergebnisse und Bedeutung -**

Christian Seyboldt, Sabrina Discher, Eva Jordan, Heinrich Neubauer

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena

In den letzten Jahren wird über eine bei Rindern vorkommende, zehrende Erkrankung diskutiert, die von einigen Autoren dem Botulismus zugerechnet wird und als „viszeraler“ oder „chronischer“ Botulismus bekannt wurde. Um die Ursachen dieser sehr kontrovers diskutierten Erkrankung bei Rindern, die mit einem schleichenden Verfall einhergeht und ganze Rinderbestände betreffen kann, zu klären, wurde eine gemeinsame Studie von mehreren Instituten der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) und dem Friedrich-Loeffler-Institut durchgeführt. Hierin soll geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten chronischer Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben und dem Vorkommen von *Clostridium (C.) botulinum* und der Bildung von Neurotoxinen besteht. Das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen des FLI Teilprojektes „Nachweis von *Clostridium botulinum* und *Clostridium botulinum* Neurotoxin“ ist die Untersuchung von Kotproben aus dem Verbundprojekt auf *C. botulinum* Neurotoxin (BoNT) mittels des Maus-Bioassays. Ein Kernpunkt der Theorie zur Entstehung dieses Krankheitsbildes ist die Produktion von BoNT durch *C. botulinum* im Darm der betroffenen Rinder. Die labor diagnostische Grundlage der Hypothese „viszeraler“ oder „chronischer“ Botulismus ist somit der Nachweis von BoNT im Kot betroffener Tiere. Daher wurden im Rahmen der Studie insgesamt 1388 Kotproben von Tieren aus insgesamt 139 betroffenen Betrieben und nicht betroffenen Kontrollbetrieben auf BoNT untersucht. Die Auswahl und Zuordnung der Proben erfolgte durch die TiHo, das FLI übernahm den zuverlässigen Nachweis von BoNT in den gesammelten Kotproben. Bereits im Vorfeld hatte das FLI zusammen mit Laboren aus verschiedenen Bundesländern aufwendige Vergleichsuntersuchungen für entsprechende Nachweise durchgeführt. Hieraus wurde eine Empfehlung zur Durchführung des Maus-Bioassays zum Nachweis von *Clostridium botulinum* Neurotoxin in Rinderkot und Silage entwickelt und in dieser Studie eingesetzt. Die Untersuchungen der Kotproben ergaben in keiner der 1388 untersuchten Kotproben einen Hinweis auf BoNT. Somit kann die Hypothese des „viszeralen“ oder „chronischen“ Botulismus nicht bestätigt werden.

## Vorkommen von Clostridienspezies in Tier und Umgebungsproben aus Fall- und Kontrollbetrieben

Svenja Fohler, Amir Abdulmawjood, Günter Klein

Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit

Im Rahmen des Projektes sind von jedem Betrieb (n=139) Kot und Pansensaft von jeweils 10 Tieren sowie Futtermittelproben auf das Vorkommen von Clostridienspezies untersucht worden.

Zunächst erfolgte eine selektive Anzucht unter anaeroben Bedingungen im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Von allen Kulturen wurde DNA isoliert und eine PCR des 16S rDNA-Genabschnittes durchgeführt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der PCR-Produkte und die Identifikation anhand der Sequenzdaten im Abgleich mit zwei Gendatenbanken (NCBI-Blast und Sepsi-Test-BLAST™).

Insgesamt wurden aus allen Probenmatrizes clostridienverdächtige Isolate (n=8728) kultiviert. Von diesen konnten mehr als 92 % bis auf Speziesebene identifiziert werden. Es konnten 67 unterschiedliche Spezies, die der Ordnung *Clostridiales* zuzuordnen sind, kultiviert werden. Von diesen gehörten wiederum 56 zur Familie der *Clostridiaceae*. Die häufigste Spezies mit einem Anteil von 42,56 % war *C. sporogenes* gefolgt von der Quasispezies *C. cochlearium/ tetani* (13,43 %), *C. perfringens* (8,58 %), *C. butyricum* (5,50 %), *C. beijerinckii* (2,87 %), *C. bifermentans* (2,77 %) und *C. sartagoforme* (1,87%). Alle sonstigen Spezies kamen jeweils in geringerem Anteil als 1 % vor. Alle *C. sporogenes* sowie *C. novyi*, *C. baratii* und *C. butyricum* wurden aufgrund enger Verwandtschaft zu *C. botulinum* Spezies mittels Real Time-PCR auf das Vorhandensein der Toxingene des jeweils nah verwandten Typs getestet. Bei einem Isolat wurde das Toxigen von *C. botulinum*-Typ B nachgewiesen.

Im Durchschnitt wurden 10,7 verschiedene clostridienverdächtige Spezies pro Betrieb kultiviert. Mindestens fünf verschiedene Spezies wurden bei allen Betriebsformen gefunden. Maximal konnten bei einem Fall-2- Betriebe sogar 19 verschiedene Spezies kultiviert werden.

Aufgrund des hohen Anteils gefundener *C. perfringens* und der klinischen Bedeutung dieses Erregers sowohl in Human- als auch in Veterinärmedizin erfolgte eine weitere Charakterisierung aller *C. perfringens* Isolate nach Toxingentypen mittels Multiplex-PCR. Eine Multiplex-PCR wurde zum Nachweis der Majortoxingene (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*) und eine zweite für die beiden wichtigen Minortoxingene *cpb2* und *cpe* durchgeführt.

Insgesamt 679 (8,58 %) aller identifizierten Spezies waren *C. perfringens*. Der Anteil auf Kontroll-, Fall-1 und Fall-2 Betrieben war mit 8,09 %, 9,72 % und 7,92 % nicht signifikant

verschieden. Es konnte in unterschiedlichen Anteilen das *cpa*-, *etx*- *cpe*- und *cpb2*-Gen nachgewiesen werden. Die meisten Isolate wurden entsprechend dem Schema nach Petit et al. dem *C. perfringens*-Toxintyp A zugeordnet.

Aufgrund der Ergebnisse des 16S rDNA-Gennachweises konnte kein Zusammenhang zwischen dem Betriebsstatus und dem Vorkommen von *C. botulinum* oder *C. perfringens* aufgezeigt werden. Auch die weitere Charakterisierung von *C. perfringens* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Betriebskategorien.



## Beziehungen zwischen Clostridien-Risikofaktoren und Fall-/Kontrollstatus

Martina Hoedemaker, Phuong Do Duc, Theresa Scheu

Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover

Unter der Prämisse, dass chronische unspezifische Krankheitsgeschehen in Milchviehbetrieben durch *Clostridium (C.) botulinum* oder andere Clostridien wie z.B. *C. perfringens* hervorgerufen werden, wurde in einem Interview mit den Landwirten vor Ort nach Risikofaktoren für eine mögliche Clostridienbelastung gefragt, die von Landwirten, Tierärzten und der jeweiligen Fachpresse immer wieder diskutiert werden. Insgesamt wurden 74 Variablen ermittelt, von denen 70 aus dem Betriebsfragebogen (Interview) und vier aus der Beurteilung des Silos durch die Studentierärzte stammten.

Inhaltlich ging es um die Intensität und das Management der Grünlandnutzung, Art der Düngung, Vorhandensein einer Biogasanlage, Art und Verwendung der Gärsubstrate und -reste, Belastung der Flächen durch andere Tierarten (Wild, Wassergeflügel, Schädner), Auslauf und Weide für die unterschiedlichen Laktationsgruppen, Silobau, Erntetechnik (Schnitthöhe), Silierdauer und hygienischer Status der Silos. Diese Faktoren wurden in der Vergangenheit als Risikofaktoren für ein vermehrtes Vorkommen von *C. botulinum* genannt. Sie wurden hier zunächst nicht in Bezug zum Vorkommen von verschiedenen Clostridien-Spezies getestet sondern direkt auf einen Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines chronischen Krankheitsgeschehens (Fall-/Kontrollstatus) untersucht.

Dreiundzwanzig Variablen (31,1 %) zeigten keine Variabilität bei den drei verschiedenen Betriebskategorien (Kontrolle, Fall-1-Betrieb, Fall-2-Betrieb). Ein beträchtlicher Anteil an Variablen (n=41; 55,4 %) unterschied sich nicht zwischen den Betriebskategorien und kommt damit kaum als Risikofaktor für das Vorkommen von chronischem Krankheitsgeschehen in Frage. Bei 10 Variablen (13,5 %) konnten Unterschiede zwischen den Betriebsgruppen festgestellt werden (Tab. 1). Bei der Interpretation ist zu berücksichtigen, dass es sich zunächst nur um eine einfaktorielle Auswertung handelt. Die Assoziation von Variablen untereinander und die Gewichtung des Einflusses sind Gegenstand weiterer Auswertungen. Als möglicher Risikofaktor für eine Zuordnung zu einem Fallbetrieb ergeben sich danach die Weidehaltung für Laktierende, die mit der Verfügbarkeit von Weide (Anzahl ha Weide) in Verbindung steht, ein verfrühtes Öffnen oder sogar ein fehlender Verschluss des Maissilos sowie die Verwendung von Mist als Biogasanlagen-Input. Bezüglich letzterem muss einschränkend gesagt werden, dass nur 41 Betriebe Angaben hierzu gemacht haben. In dieser Studie konnte bis zum Stand der jetzigen Auswertung kein positiver Zusammenhang zwischen der Verwendung von Glyphosat, dem Vorkommen von Tauben, der Verwendung von Schweinegülle als Gärsubstrat und der Verfütterung von Biertreber und Auftreten

chronischer Krankheitssymptome gezeigt werden. Zum Teil ist gar ein gegenteiliger Trend erkennbar.

Tab. 1: Variablen zu der Thematik „Risikofaktoren für Clostridien in Bezug zum chronischen Krankheitsgeschehen“ aus der Befragung der Landwirte (n=70) und der sensorischen Überprüfung der Silos durch die Studentierärzte (n=4), die sich statistisch signifikant zwischen den Betriebskategorien unterscheiden (F1=Fallbetrieb ohne Impfung; F2=Fallbetrieb mit Clostridienimpfung; K=Kontrollbetrieb; Chi<sup>2</sup>-Test, Kruskal-Wallis-Test).

Variable	Betriebskategorie		
	Kontrolle	Fall-1	Fall-2
Anzahl ha Weide (MW $\pm$ SD)	5,2 $\pm$ 6,4 <sup>a1</sup>	9,9 $\pm$ 11,2 <sup>b</sup>	8,1 $\pm$ 8,5 <sup>a,b2</sup>
n	46	45	47
Einsatz von Glyphosat (%)	87,2 <sup>a</sup>	76,7 <sup>a,b</sup>	62,2 <sup>b</sup>
n	41	33	28
Mist als Biogasanlagen-Input (%)	31,3 <sup>a</sup>	70,0 <sup>a,b,1</sup>	73,3 <sup>b,2</sup>
n	5	7	11
Gülle/Kot vom Schwein als Biogasanlagen-Input (%)	46,7 <sup>a</sup>	0,0 <sup>b,1</sup>	40,0 <sup>a,b,2</sup>
n	7	0	6
Vorkommen von Tauben (%)	93,6 <sup>a,1</sup>	80,0 <sup>a,b,2</sup>	76,6 <sup>b</sup>
n	44	36	36
Weide-Laktierende $\leq$ 100 d in Milch (%)	31,9 <sup>a</sup>	56,8 <sup>b</sup>	46,8 <sup>a,b</sup>
n	15	25	22
Weide-Laktierende 101-200 d in Milch (%)	34,0 <sup>a</sup>	62,2 <sup>b</sup>	48,9 <sup>a,b</sup>
n	16	28	23
Weide-Laktierende > 200 d in Milch(%)	36,2 <sup>a</sup>	64,4 <sup>b</sup>	48,9 <sup>a,b</sup>
n	17	29	23
Silierdauer mind. 1 Maissilage < 3 Wochen (%)	21,7 <sup>a,1</sup>	39,0 <sup>a,b,2,x</sup>	40,0 <sup>b,y</sup>
n	10	16	18
Verfütterung von Biertreber (%)	19,1 <sup>a</sup>	11,1 <sup>a,b</sup>	4,3 <sup>b</sup>
n	9	5	2

Innerhalb eine Zeile: a vs. b: p < 0,05; 1 vs 2 und x vs. y: p < 0,1

## **Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft der Clostridien in Pansen und Darm von Rindern bei chronischen Krankheitsgeschehen?**

Susanne Riede, Gerhard Breves

Physiologisches Institut, Tierärztliche Hochschule

In der Vergangenheit wurde immer wieder das Auftreten eines chronischen Krankheitsgeschehens in Milchviehbetrieben beobachtet. Da bei den erkrankten Tieren häufig *C. botulinum* selbst oder deren Toxine nachgewiesen wurden, wurde ein Zusammenhang zwischen dieser pathogenen toxinbildenden Clostridien-Spezies und dem Krankheitsgeschehen postuliert. Es ist nun denkbar, dass die strukturelle Zusammensetzung der Clostridienpopulation bei den betroffenen Tieren als prädisponierender Faktor eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Auftreten des nicht näher charakterisierten Krankheitsbildes spielen könnte. Aus diesem Grund wurde qualitativ mit Hilfe der SSCP-Analyse (single strand conformation polymorphism) die mikrobielle Gemeinschaft der Clostridia in Dickdarm- und Pansensaftproben von jeweils 10 Rindern (5 Verdachtstiere, 5 Kontrolltiere) aus 15 Milchviehbetrieben (5 Kontrollbetriebe, 5 Fall-1-Betriebe, 5 Fall-2-Betriebe) untersucht. Bei den Fall-1-Betrieben handelte es sich um Betriebe, in denen die Kühe ungeimpft waren, aber die Kriterien für das Vorhandensein eines chronischen Krankheitsgeschehens vorlagen. Die Kühe aus den Fall-2-Betrieben waren mit der polyvalenten Clostridienvakzine geimpft worden. Die SSCP-Analyse wurde basierend auf der mikrobiellen 16S rDNA mit spezifischen Primern (P930, P932) für die Gruppe Clostridia Cluster I durchgeführt. Die Profile der mikrobiellen Gemeinschaften der Clostridia wurden mit Hilfe der Software GelComparII (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) ausgewertet. Dabei wurden jeweils die 10 Tiere aus einem Betrieb miteinander verglichen. Die SSCP-Analyse zeigte, dass Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft der Clostridia zwischen Dickdarm- und Pansensaftproben innerhalb desselben Betriebes auftraten, es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der mikrobiellen Gemeinschaft der Clostridia zwischen Kontroll- und Verdachtstieren innerhalb eines Betriebes gab. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass das beschriebene chronische Krankheitsgeschehen in keinem Zusammenhang mit einer veränderten mikrobiellen Gemeinschaft der Clostridia in Dickdarm/Pansen zu stehen scheint.

## Gärreste aus Biogasanlagen – Ein Sicherheitsrisiko?

Bernd Köhler<sup>1</sup>, Susanne Riede<sup>2</sup>, Gerhard Breves<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ripac-Labor, Potsdam-Golm, <sup>2</sup>Physiologisches Institut, Tierärztliche Hochschule Hannover

Ziel der Studie war die qualitative und quantitative bakteriologische und mykologische Untersuchung von Gärsubstraten und Gärresten hinsichtlich des aeroben und anaeroben Gesamtkeimgehaltes, des Auftretens hygienisch relevanter Keime sowie ausgewählter pathogener Erreger unter besonderer Berücksichtigung pathogener Clostridien insbesondere Neurotoxin-bildender *Clostridium botulinum*-Stämme. Dabei sollten in Erweiterung der ersten Studie insbesondere solche Biogasanlagen untersucht werden, in denen in substantiellen Mengen Hühnertrockenkot mit als Gärsubstrat eingesetzt wird.

Das Untersuchungsmaterial stammte aus insgesamt 10 niedersächsischen Biogasanlagen. In 5 dieser Anlagen wurde Hühnertrockenkot/Hühnermist neben Energiepflanzen sowie Gülle als Gärsubstrat eingesetzt (Anlagen C1 – C5). Zu den übrigen 5 als Kontrolle dienenden Anlagen zählten 3 Anlagen, in denen überwiegend Energiepflanzen eingesetzt wurden (Anlage A1 – A3) und 2 Anlagen, in denen ein hoher Anteil an Gülle verwendet wurde (Anlagen B1 – B2). Von jeder Anlage wurden an vier aufeinander folgenden Tagen jeweils 4 repräsentative Proben der Gärsubstrate und der Gärreste entnommen. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme auf 4°C gekühlt und an das RIPAC-LABOR weitergeleitet. Alle Proben sind innerhalb eines Monats nach der Entnahme bearbeitet worden. Die Lagerung der Proben erfolgte in der Zwischenzeit bei 4-8°C.

Die Daten der vorliegenden Studie bestätigen vom Grundsatz die Befunde der ersten Studie hinsichtlich der Keimdichte und des Keimspektrums in den Gärsubstraten und Gärresten. Auffällig war, dass sich in den Proben aus den Anlagen, in denen Ausscheidungen aus Geflügelbetrieben eingesetzt wurden, keine gerichteten Unterschiede in Keimdichte und -spektrum ergaben. Dabei war ebenso in Übereinstimmung mit der vorangegangenen Studie die Keimdichte in den Gärresten niedriger, was vor allem durch einen geringeren Gehalt an anaeroben Keimen vermittelt wurde.

In der Gemeinschaft der *Clostridien* konnten 15 verschiedene identifizierte und 3 neue bisher nicht beschriebene Arten nachgewiesen werden. Unter den bekannten Arten waren mit dem positiven Nachweis von *Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, *Cl. sordellii* und *Cl. sporogenes* auch verschiedene Spezies, die als Ursache spezifischer Infektionen in Frage kommen.

Die Gärsubstrate wiesen in allen Anlagen höhere Clostridienkonzentrationen als in den Gärresten auf. Das spricht gegen eine Anreicherung von hygienisch relevanten bzw. pathogenen *Clostridium spp.* in den Gärresten. Dass ausschließlich in den Gärresten *Cl. tetani* (2mal) festgestellt werden konnte, könnte durch nachträgliche Kontamination der Gärreste in den Silos durch vorangegangene positive Produkte bedingt sein.

Insgesamt wurden 66 *Cl. perfringens* – Stämme hinsichtlich ihres Toxinbildungsvermögens geprüft. Alle Stämme konnten dem Toxintyp A zugeordnet werden. Eine spezifisch veterinärhygienisch / ätiologisch relevante Rolle kommt dabei den 8 Kulturen mit  $\beta$ 2-Toxinbildungsvermögen (3x Gärsubstrate, 2 Gärreste), den 5 Isolaten mit NetB-Toxinbildungsvermögen (3x Gärsubstrate, 2x Gärreste), den 20 Isolaten mit mittelgradigem  $\alpha$ -Toxinbildungsvermögen (7x Gärsubstrate, 13x Gärreste) sowie den 10 Isolaten mit hochgradigem  $\alpha$ -Toxinbildungsvermögen (je 5x Gärsubstrate und Gärreste) zu.

Die Untersuchung auf Neurotoxin bildende Clostridium spp.-Stämme ergab sowohl bei den Gärsubstratproben als auch Gärrestproben im Mausbioassay ausschließlich negative Befunde. Das heisst, dass die getesteten Biogasanlagen frei von Neurotoxin bildenden *Cl. botulinum*- Stämmen waren, wobei das ausgewählte Untersuchungsverfahren ca. 4 Keime/g eines aktiven Neurotoxinbildners nachweisen kann.

Abschließend bleibt festzustellen, dass auch aus dieser Studie ein mikrobiologisches Risikopotenzial von Biogasanlagen nicht abzuleiten ist und dass sich auch keine Hinweise für die Anreicherung von potenziell pathogenen Keimen während des Fermentationsprozesses ergeben haben.

## „Chronischer Botulismus“ – Gibt es ein spezifisches Krankheitsbild?

Theresa Scheu, Rita Börner

Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover

Eine der wesentlichen Aufgabenstellungen des Projektes, für den Fall des Vorliegens von Beziehungen zwischen *C. botulinum* und einem chronischen Krankheitsgeschehen im Bestand, war die Erarbeitung einer Definition des Krankheitsbildes bei betroffenen Tieren mit Beschreibung der relevanten Symptome. Die Herausforderung lag dabei im Ausschluss möglichst vieler Differentialdiagnosen, da die bislang beschriebene Symptomatik auch bei vielen anderen Erkrankungen infektiöser wie nichtinfektiöser Natur auftreten kann.

Dazu wurden auf jedem Betrieb fünf sogenannte Verdachtstiere (V-Tiere) und fünf Kontrolltiere (K-Tiere) klinisch untersucht. Initial mussten V-Tiere abgemagert sein (BCS: Body-Condition-Score < 2,5) und den Habitus eines chronisch kranken Tieres aufweisen (stumpfes Haarkleid, mattes und träges Verhalten; Dirksen et al. 2012). Weiterhin musste jedes V-Tier mindestens ein offensichtlich erkennbares Zusatzkriterium aufweisen, welches sich an den beschriebenen Symptomen von Schwagerick und Böhnel (2001) zum Krankheitsbild des „chronischen Botulismus“ orientierte. Umgekehrt durften die Kontrolltiere keines dieser Symptome zeigen. Um eine Auswahl der Tiere treffen zu können, wurden alle laktierenden Tiere der Herde einer Beurteilung der Körperkondition (BCS), des Gangbildes sowie einer Beurteilung der Verschmutzung und etwaiger Verletzungen an Beinen und Rumpf (Stichprobe) unterzogen. Die klinische Untersuchung der zehn derart ausgewählten Tiere erfolgte auf Grundlage der Beschreibungen nach Rosenberger (Dirksen et al. 2012) mit besonderem Augenmerk auf neurologische Abweichungen (Lähmungen der Kopfnerven, Ausfälle im Gangbild, herabgesetzte Reflexe). Insgesamt wurden 86 Befunde mit 130 Symptomen untersucht. Als weiterführende Untersuchung wurden V-Tiere mit einer höhergradigen Lahmheit (Bewegungs-Score nach Sprecher (1997)  $\geq 3$ ) in einem Klauenstand untersucht und gegebenenfalls behandelt.

Insgesamt wurden 17.705 laktierende Tiere (inklusive trockenstehende Kühe) beurteilt. Daraus wurden 1.389 Tiere (695 Verdachtstiere und 694 Kontrolltiere) ausgewählt und klinisch untersucht.

### **Auswahlkriterien (mindestens ein Kriterium pro Verdachtstier)**

Mit rund 77 % der V-Tiere in Kontrollbetrieben (K), 83 % der V-Tiere in Fall 1-Betrieben (F1) und 86 % der V-Tiere auf Fall 2-Betrieben (F2) war eine höhergradige Lahmheit das häufigsten Zusatzkriterium zur Auswahl eines V-Tieres. Die nächst häufigeren Zusatzkriterien waren eine Kreislaufinsuffizienz (K: 33,6 %; F1: 31,1 %; F2: 24,3 %) und eine

verminderte Milchleistung im Herdenvergleich (20 % weniger Milch im Vergleich zu Tieren im selben Laktationsstadium mit derselben Laktationsnummer; K: 14,0 %; F1: 19,6 %; F2: 19,1 %). Zusatzkriterien wie Dyspnoe (angestrengte Atmung), sensorische Störungen (herabgesetzte Reflexe), Gehschwäche, Ataxien, Paresen oder Paralysen sowie die Lähmung der Kopfnerven (Bulbärparalyse) waren mit rund 6 % bis 0,4 % vergleichsweise selten Grund zur Auswahl.

### **Unterschiede zwischen Verdachtstieren und Kontrolltieren**

Nach Prüfung aller Befunde der klinischen Untersuchung mit den dazugehörigen Ausprägungen mittels Chi-Quadrat-Test, konnten bei 49 Symptomen Unterschiede zwischen Verdachts- und Kontrolltieren festgestellt werden ( $p < 0,05$ ). Als sogenannte fixe Effekte wurden die Laktationsdauer (V-Tiere waren im Mittel erst 117 Tage nach der letzten Abkalbung, K-Tiere bereits durchschnittlich 179 Tage in Milch), die Laktationsnummer (V-Tiere waren im Mittel in der 3., K-Tiere in der 2. Laktation) und die Körperkondition (V-Tiere mittlerer BCS 2,5, K-Tiere 3,0-3,25) ermittelt. Diese Effekte sowie der Status des Betriebes (K, F1, F2), und des Tieres (V-Tier, K-Tier) wurden in der nachfolgend angewendeten logistischen Regression mit berücksichtigt.

Insgesamt 23 Symptome ergaben bei allen drei Betriebskategorien (K, F1, F2), sieben Symptome lediglich auf F1- und F2-Betrieben (3 bzw. 4) und sechs Symptome nur auf K-Betrieben Unterschiede zwischen V-Tieren und K-Tieren ( $p < 0,05$ ). Die verbleibenden 13 Symptome kamen entweder als Kombination auf F1 und K Betrieben (5) oder auf F2 und K Betrieben (1) vor, bzw. waren nicht länger signifikant (7).

Von den 23 Symptomen, die auf allen drei Betriebs-Kategorien Unterschiede zwischen V- und K-Tieren ergaben, stammten acht aus den Bereich Allgemeinzustand, je vier aus den Organsystemen Atmung und Herz-/Kreislauf, drei aus den Organsystemen Bewegungsapparat, zwei aus dem Bereich Reproduktion und je eins aus den Organsystemen Verdauung und Neurologie. Rund 3 % bis 11 % der Tiere, die ein Symptom zeigten, waren bei der Untersuchung von Kot oder Pansensaft positiv bezüglich des Nachweises von *C.botulinum*-Neurotoxin-Gen (BoNT-Gen).

### **Zusammenhang zwischen Symptomen und Herkunft der Verdachtstiere aus einem Fall-Betrieb**

Für zehn Symptome konnte ein sogenannter Betriebseffekt nachgewiesen werden. Eine einheitliche Zuordnung dieser zu lediglich einer bestimmten Betriebskategorie war nicht möglich. Bei vier Symptomen (Füllung der Episkleralgefäße, Röhrenatmung, Umfangsvermehrungen und periartikuläre Schwellung des Carpus) konnte ein Zusammenhang zwischen V-Tieren aus F2-Betrieben und V-Tieren aus K-Betrieben

festgestellt werden. Für die Symptome Fluktuation im Uterus und Entlastung von Gliedmaßen konnte dieser Zusammenhang zwischen V-Tieren aus F1-Betrieben und V-Tieren aus K-Betrieben gezeigt werden. Drei Symptome (abweichende Intensität der Herztöne, periartikuläre Schwellung am Tarsus und Urovagina) waren häufiger bei V-Tieren aus F2 Betrieben im Vergleich zu V-Tieren aus F1 Betrieben zu finden. V-Tiere aus F2-Betrieben hatten häufiger verschärfte Lungengeräusche als V-Tiere von K- und F1 Betrieben.

### **Diskussion**

Die mittels statistischer Methoden selektierten Befunde erlauben eine gute Beschreibung eines chronisch kranken Tieres, jedoch ist ein Rückschluss auf einen oder mehrere potentielle Auslöser nicht möglich, da die Beschreibung in der Summe zu unspezifisch bleibt. Bei jedem dieser Symptome bleiben verschiedene Differentialdiagnosen abzuklären. Bei minimal rund 3 % maximal 11 % der Tiere mit dem jeweiligen Symptom konnte BoNT-Gen nachgewiesen werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Nachweis von BoNT-Gen und den beschriebenen Symptomen kann damit nicht uneingeschränkt festgestellt werden, da es unter dem Postulat eines Zusammenhangs zwischen *C. botulinum* und dem Auftreten der Symptome keine Erklärung für die verbleibenden 80-95 % der Symptome gäbe. Hinzu kommt, dass lediglich der Nachweis von BoNT-Gen gelang. Freies Toxin wurde in keinem Fall nachgewiesen. Somit kann, unter Vorbehalt der weiterhin andauernden Auswertungen, bislang kein klares Krankheitsbild für den sogenannten chronischen Botulismus definiert werden.



## **Chronisches Krankheitsgeschehen – Was könnte noch die Ursache sein?**

Theresa Scheu, Rita Börner, Frieder Gundling

Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover

Aufgrund der allgemein unspezifischen Symptom-Beschreibungen zum Krankheitsbild des sogenannten „chronischen Botulismus“ kommt eine Vielzahl an Differentialdiagnosen in Betracht. Um eine systematische Abklärung dieser zu erzielen, wurden Kotproben und Blutproben von 1389 Einzeltieren sowie die Tankmilch von 139 Betrieben untersucht.

### **Serologische Untersuchungen**

Die serologischen Untersuchungen von Serum auf Coxiellen- und Chlamydien Antikörper mittels Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Betrieben. Der Grad der Durchseuchung gerade bei Chlamydien (Abort-Erreger, Fruchtbarkeitsstörungen, Artritiden, etc.) ist mit rund 96 % in Kontroll-Betrieben (K), 93 % in Fall1-Betrieben (F1) und rund 96 % in Fall2-Betrieben (F2) hoch (mind. eine von zehn Proben positiv). Zum Vergleich liegt der Durchseuchungsgrad bezüglich Coxiellen bei ca. 62 % (K) bzw. 49 % (F1) und 45 % (F2) niedriger. Ebenfalls keinen Zusammenhang zum Betriebsstatus ergaben die Auswertungen zu Antikörpern gegen Lungenwürmer und Antikörpern gegen Leberegel (Tankmilch).

### **Parasitologische Untersuchungen**

Lediglich beim Nachweis von Magen-Darm-Wurm Eiern im Kot mittels Mikroskop konnten Unterschiede in den Betrieben festgestellt werden. So hatten 53 % der F1-Betriebe mindestens ein Tier mit positiven Nachweis, während es bei den K-Betrieben und den F2-Betrieben rund 32 % bzw. 34 % waren ( $p < 0,05$ ). Hinsichtlich Leberegel-Eiern, Lungenwürmern und Kokzidien gab es keine statistischen Unterschiede zwischen den Betrieben.

### **Mikrobiologische Untersuchungen**

In keinem Fall konnten Salmonellen kulturell nachgewiesen werden. Insgesamt vier F1-Betriebe, drei F2-Betriebe und ein K-Betrieb hatten mindestens eine positive Pool-Probe (je fünf Verdachtstiere und fünf Kontrolltiere pro Probe) bezüglich der Anzucht von *Mycobakterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP).

### **Klinisch-chemische Untersuchungen**

Die Mittelwerte der Enzyme des Leberstoffwechsels (AST,  $\gamma$ -GT, GLDH), sowie die Werte der freien Fettsäuren (FFS), Bilirubin und Cholesterin waren alle bis auf GLDH, deren

Mittelwerte unabhängig von der Betriebskategorie und Tier-Kategorie oberhalb des Normbereichs lagen, innerhalb der Normwerte. Betriebseffekte bei den Verdachtstieren (V) waren lediglich für FFS und Cholesterin nachzuweisen, da V-Tiere von K-Betrieben höhere Werte im Vergleich zu V-Tieren von F1- und F2-Betrieben hatten.

Insgesamt war die Versorgung mit Selen, Zink, Kupfer, Vitamin A und Vitamin E auf allen Betrieben ausreichend. Dennoch ist anhand der Mittelwert-Vergleiche ein statistischer Unterschied zwischen V-Tieren und Kontrolltieren (K) festzustellen. Mit Ausnahme der Kupferwerte hatten V-Tiere statistisch signifikant niedrigere Werte als K-Tiere ( $p < 0,05$ ). Betriebseffekte konnten in einzelnen Fällen nachgewiesen werden, ergaben jedoch keinen einheitlichen Zusammenhang.

Deutliche Unterschiede gibt es bei den Parametern Gesamteiweiß (GE) und der Glutaraldehydprobe (GAP), welche beide ein Entzündungsgeschehen im Körper andeuten. In allen drei Betriebskategorien haben V-Tiere signifikant geringere GAP-Werte und höhere GE-Werte im Vergleich zu K-Tieren. Statistische Unterschiede gibt es dabei zwischen K-Betrieben und F1- bzw. F2-Betrieben.

### **Untersuchungen am Klauenstand**

Insgesamt wurden 584 lahme V-Tiere weiterführend im Klauenstand untersucht. Einen Überblick über die Diagnosen zeigt die Abbildung 1. Die Auswertung bezieht sich auf 1131 Hinterbeine, wobei pro Bein die stärkste (schlimmste) Ausprägung gilt.

Das Fehlen von Pflegespuren (39,6 %), zu lange Klauen, fehlende Hohlkehlung (63,3 %), ein flacher Ballen und axiale Wandbeschädigung sprechen für mangelnde und fehlerhafte Klauenpflege. Rusterholz'sche (RSG) und Klauensohlengeschwüre in unterschiedlicher Ausprägung kommen an 53,4 % der untersuchten Hinterbeine vor. Reheveränderungen finden sich an fast 80 % der Hinterbeine. Ausprägungen sind konkave Dorsalwand (47,7 %), Reheringe (48,6 %), Wanddefekte (44,5 %), doppelte Sohle (39,8 %) und Verfärbungen der Sohle (40,4 %). Dermatitis interdigitalis im Ballenbereich (Ballenfäule) findet sich an 80 % der Beine. Fäuleveränderungen wurden aber auch im Zwischenklauenbereich angetroffen (17,7 %). Dermatitis digitalis (Mortellaro) wurde an 48,2 % der Beine festgestellt. Phlegmonöse Veränderungen im Fußbereich wurden in 16,7 % der Fälle gefunden. Sie waren i.d.R. mit anderen Befunden vergesellschaftet und sind ein Ausdruck einer schwerwiegenden schon weit fortgeschrittenen Klauenerkrankung mit eher ungünstiger Prognose. Zu beachten ist, dass meistens mehrere Befunde und Diagnosen an einem Bein in unterschiedlicher Ausprägung festgestellt wurden. Für sechs Befunde/Diagnosen konnte ein Bezug zur Betriebskategorie hergestellt werden: Klauenpflugespuren, flacher Ballen,

fehlende Hohlkehlung, RSG, doppelte Sohle und Limax. Dabei waren aber nur RSG und doppelte Sohle in F1 und F2-Betrieben häufiger als in K-Betrieben ( $p < 0,05$ ), während sich für die anderen vier Variablen keine eindeutigen Beziehungen zum Fall-Status herleiten ließen. Bei rund 43 % der untersuchten Hinterbeine konnten tiefgreifende Defekte (Verletzung tieferer Schichten der Klaue: deutlicher Wanddefekt, tiefes/perforierendes KSG und RSG, Spitzendefekt) diagnostiziert werden, wobei es auch hier keine Unterschiede in den Betriebskategorien gab. Deutlicher Mortellaro spielt bei rund einem Drittel der gefundenen Veränderungen eine Rolle.

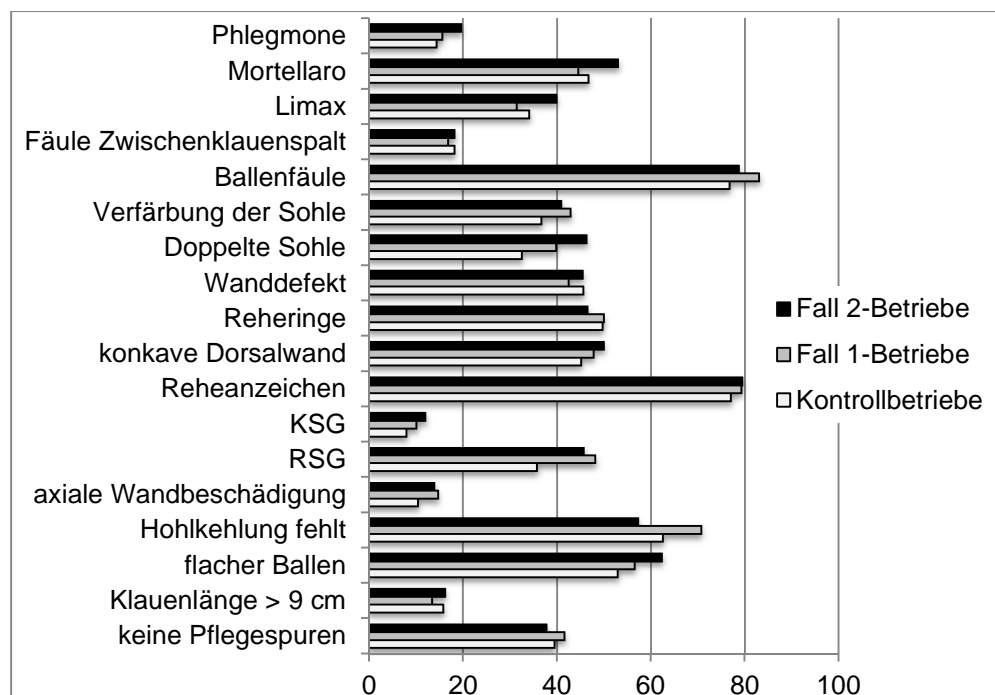


Abb. 1: Häufigkeit von Befunden und Diagnosen (%) an den Hinterbeinen (n=1.131) von insgesamt 584 lahmen Verdachtstieren.

## Diskussion

Die deutlich abweichenden Parameter der klinisch-chemischen Untersuchung (GE und GAP), sowie der erhöhte Bedarf an Antioxidantien (Vitamin E, Vitamin A, Selen), deuten auf ein Entzündungsgeschehen hin. Möglicher Eintrittsweg für eine Vielzahl unspezifischer Entzündungserreger (Staphylokokken, Streptokokken, *E. coli*, *Trueperella pyogenes*, etc.) sind Defekte an den Klauen und Gelenken, aber auch voran gegangene Entzündungen von Euter oder Gebärmutter. Es kann zu einer Streuung der Erreger im Körper mit Affektion verschiedener Organe, vor allem Herz (Klappen), Niere, Leber und Lunge kommen. Die Folge sind Abszess-Bildungen und chronisch verlaufende Endzündungen, die eine Vielzahl der Symptome erklären könnten. Initial ist eine korrekte und frühzeitige Versorgung von Klauendefekten essentiell für die Gesunderhaltung einer Herde, nicht zuletzt um starke Schmerzen für betroffene Tiere zu minimieren.

## Grundfutterqualität – Ein Problem?

Anika Wichern, Katrin Gollub, Franziska Mecke

Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover

### **Silagequalität:**

Zur Beurteilung der Silagequalität wurde initial eine sensorische Beurteilung von 409 offenen Silagen auf den Betrieben durchgeführt. Zudem wurden Proben genommen, welche an drei Instituten der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover untersucht wurden. Im Institut für Mikrobiologie wurde auf aerobe und anaerobe Bakterien, Schimmelpilze und Hefen untersucht. Weitere Analysen erfolgten im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit (BoNT-Gen-Nachweis, Real Time PCR) sowie im Institut für Tierernährung (Trockensubstanz, Rohasche, Rohprotein, Reineiweiß, pH). In einem Fragebogen wurden Details wie Erntebedingungen, Abdeckung und etwaiger Einsatz eines Siliermittelzusatzes erhoben.

Bei der sensorischen Beurteilung der Silagequalität fiel auf, dass signifikant mehr Silagen auf Fallbetrieben Abweichungen bezüglich deutlich vorkommender Fäulnis, Schimmel sowie Geruchsabweichungen aufwiesen ( $P < 0,05$ ). Die Ergebnisse dieser Sinnenprüfung spiegelten sich zudem in den mikrobiologischen Analysen wider. Auf Fallbetrieben wurden Silagen signifikant ( $P < 0,05$ ) häufiger in die Qualitätsstufe 4 (gemäß VDLUFA) eingruppiert. Silagen dieser Kategorie wiesen in mindestens einer Keimgruppe eine Überschreitung des Orientierungswertes um mehr als das 10-fache auf. In lediglich 11 Silagen, die sowohl aus Kontroll-, wie auch aus Fallbetrieben stammten, wurde das BoNT-Gen Typ A isoliert. In Bezug auf Trockensubstanzgehalt und pH-Wert der Maissilagen ergaben sich nach bisheriger Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Betriebskategorien. Dies traf auch für den Trockensubstanz-, Rohasche-, Rohprotein- und Reineiweißgehalt der Grassilagen zu. Allerdings wurde auf Fallbetrieben deutlich häufiger eine nicht ausreichend durchsäuerte Grassilage verfüttert (pH-Wert  $> 4,7$ ;  $P < 0,05$ ).

Die Befragung der Landwirte ergab, dass in Kontrollbetrieben zum einen häufiger eine Siloabdeckung mit zusätzlichem Netz erfolgte und zudem bei Grassilagen öfter Siliermittel zum Einsatz kamen ( $P < 0,05$ ). Keine Unterschiede ergaben sich in Bezug auf die Bauart des Silos (Bodenplatte, Seitenwände), die Anschnittsfläche (glatt oder unregelmäßig), den Silagevorschub oder das Vorkommen von Schadnagern.

Zusammenfassend konnte anhand der sensorischen und mikrobiologischen Untersuchungen in Fallbetrieben eine schlechtere Silagequalität festgestellt werden.

**Grobfuttrationen:**

In dieser Studie wurden Gras- und Maissilage, Luzerne, Heu, Stroh sowie Frischgras (geschnitten oder Weide) als Grobfuttermittel definiert. Diese Definition ermöglichte den Vergleich zwischen Betrieben mit Fütterung einer totalen Mischration (TMR) und Betrieben, die eine aufgewertete Mischration (AMR) oder Komponenten fütterten. Als Berechnungsgrundlage für diese Grobfuttrationen dienten die in der Regel vorliegenden Analysen der Silagen, während für alle anderen Grobfuttermittel Tabellenwerte der deutschen landwirtschaftlichen Gesellschaft (DLG) verwendet wurden. Der Fokus der Auswertung lag auf der Grobfuttration der Frühlaktierenden (Laktationstag 0-100), da es sich hier um die Hauptrisikogruppe im Laktationsverlauf handelt (Tab. 1).

In Kontrollbetrieben wurde signifikant mehr Grobfutter vorgelegt. Zudem enthielt die Grobfuttration der Kontrollen deutlich mehr Energie sowie Stärke und Zucker im Vergleich zu den Fallbetrieben ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu waren die Gehalte an Rohasche, Rohfaser, Rohprotein sowie die RNB (Ruminale Stickstoffbilanz) signifikant geringer. Keine Unterschiede ergaben sich bezüglich der Gehalte an strukturierter Rohfaser und nutzbarem Rohprotein ( $P > 0,05$ ). Es wurde insgesamt deutlich, dass Kontrollbetriebe rechnerisch eine höhere Milchleistung aus der Grobfuttration erreichten. Auch die Auswertung der MLP-Daten bestätigte ein höheres Leistungsniveau der Kontrollbetriebe. Es gilt festzuhalten, dass dieses nicht über den höheren Anteil an Kraftfutter erreicht wurde, sondern über die vermehrte Vorlage und das höhere Energieniveau der Grobfuttration. Der höhere Energiegehalt lässt sich nicht zuletzt durch eine bessere Silagequalität, sondern auch durch einen größeren Maissilageanteil in der Grobfuttration der Kontrollbetriebe erklären.

**Fazit:**

Es lässt sich schlussfolgern, dass qualitativ hochwertiges, schmackhaftes und energiereiches Grobfutter für eine wiederkäuergerechte Milchkuration, hohe Grobfutteraufnahme sowie Milchleistung unerlässlich ist.

Tab. 1: Vergleich der Rationskennzahlen der berechneten Grobfuttermischungen unter Berücksichtigung des Betriebsstatus (Kontrollbetrieb [K], Fallbetrieb [F1 und F2 zusammengefasst]). Die Pfeile (↑↓) bedeuten, dass die Kennzahlen in K-Betrieben höher bzw. niedriger waren ( $p < 0,05$ ); mit n.s. sind die Kennzahlen ohne Unterschiede gekennzeichnet. Zugrunde gelegt wurde die Ration für Kühe im Laktationsstadium bis 100 Tage nach der Abkalbung.

Parameter	Kontrolle	Fallbetrieb	
<b>TS-Vorlage (kg)</b>	14,29	13,31	↑
<b>Energiegehalt (MJ NEL/kg TS)</b>	6,41	6,28	↑
<b>Stärke und Zucker (g/kg TS)</b>	196,23	165,32	↑
<b>Rohasche (g/kg TS)</b>	67,15	75,73	↓
<b>Rohfaser (g/kg TS)</b>	217,40	229,00	↓
<b>Rohprotein (g/kg TS)</b>	115,30	121,74	↓
<b>RNB (g)</b>	-38,70	-23,32	↓
<b>Strukturierte Rohfaser (%)</b>	83,91	83,63	n.s.
<b>Nutzbares Rohprotein (g/kg TS)</b>	131,98	133,10	n.s.
<b>Milchbildung aus MJ NEL (kg)</b>	15,95	13,68	↑

## **Einflüsse auf das chronische Krankheitsgeschehen – Eine epidemiologische Bewertung**

Katharina Charlotte Jensen, Cornelia Frömke, Lothar Kreienbrock, Amely Campe

Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung,  
WHO-Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health  
Tierärztliche Hochschule Hannover

### **Einleitung**

Da *C. botulinum* nach den bisherigen Ergebnissen dieser Studie als alleinige Ursache für das chronische Krankheitsgeschehen auf norddeutschen Milchviehbetrieben nicht bestätigt werden konnte, sollen die im weiteren gezeigten Ergebnisse zusätzliche Erkenntnisse darüber bringen, welche anderen Faktoren dazu beitragen, dass sich ein chronisches Krankheitsgeschehen mit Milchleistungsabfall, vermehrten Todesfällen, einer erhöhten Abgangsrate, vermehrt festliegenden Kühen und dem Eindruck eines erhöhten Krankheitsaufkommens entwickeln kann.

Zudem war eines der Ziele des Verbundprojektes, das chronische Krankheitsgeschehen sowohl auf der Ebene der Einzeltiere aber auch auf Herdenebene zu charakterisieren. Daher sollen die hier vorgestellten Ergebnisse auch dazu beitragen, festzustellen, ob es auf Herdenebene eindeutige und klar zu definierende Indikatoren gibt, die auf das Vorliegen des hier untersuchten chronischen Krankheitsgeschehens hinweisen.

### **Material und Methoden**

Zur Analyse beider Fragestellungen wurden von den Projektpartnern aus der Klinik für Rinder hypothesenbasiert Risikofaktoren für das Krankheitsgeschehen und geeignete Indikatoren für die Herdengesundheit ausgewählt und deskriptiv ausgewertet. Nach einer Prüfung auf Assoziation der Merkmale untereinander, auf fehlende Werte und auf zu gering besetzte Ausprägungen der Merkmale wurde mittels einfaktorieller logistischer Regression der Einfluss der einzelnen Faktoren bzw. Indikatoren auf den Fall-Kontroll-Status abgeschätzt. Zudem wurde der Zusammenhang zwischen quantitativen Merkmalen und dem Risiko, ein Fallbetrieb zu sein, auf Linearität geprüft. Merkmale, die in der einfaktoriellen Auswertung einen p-Wert von  $<0,2$  aufwiesen, wurden mittels mehrfaktorieller logistischer Regression weiter analysiert. Dabei wurden mittels Rückwärtsselektion ( $p < 0,05$ ) diejenigen Merkmale identifiziert, die den deutlichsten Einfluss auf ein chronisches Krankheitsgeschehen haben. Sämtliche Auswertungen wurden getrennt für ungeimpfte und

geimpfte Fallbetriebe durchgeführt, um zu prüfen, ob unterschiedliche Muster der Herdengesundheit oder Risikomuster auftreten.

## **Ergebnisse und Diskussion**

### 1. Herdengesundheit

Da Kontrollbetriebe mehrfaktoriell signifikant mehr Kühe mit einem BCS über dem Sollbereich (Mittelwert (MW): Fallbetriebe (F) 7,1%, Kontrollbetriebe (K) 10,7%), einen besseren Kuh-Komfort-Index (KKI < 75%: 57,6% der F, 23,4% der K) und weniger Kühe mit Hautläsionen an den Beinen (Dekubitalstellen; MW: F 31,3%, K: 21,8% der Herde) aufwiesen, kann geschlussfolgert werden, dass Betriebe mit einem chronischen Krankheitsgeschehen vermehrt auf die Energieversorgung ihrer Tiere achten sollten und Veränderungen vornehmen sollten, die das Wohlbefinden der Tiere verbessern.

Zudem zeigte sich, dass die ungeimpften Fallbetriebe mehrfaktoriell signifikant eine längere Zwischenkalbezeit (MW: F1 419, K 406 Tage) und einen höheren Verschmutzungsgrad der Tiere am Euter (MW: F1 38,5%, K 26,8% der Herde) aufwiesen als Kontrollbetriebe. Die längere Zwischenkalbezeit in ungeimpften Fallbetrieben kann zum einen eine Folge des bereits seit längerem bestehenden chronischen Geschehens sein, zum anderen kann dies auch ein Hinweis auf ein verbesserungsfähiges (Reproduktions-) Management sein. Aufgrund des Studiendesigns werden zurückliegende Risikofaktoren und vorhergehende Krankheitszustände zum selben Zeitpunkt erhoben wie der Effekt (hier: das Vorliegen chronischer Herdenprobleme). Daher lassen sich Fragen der Kausalität der gefundenen Zusammenhänge – wie hier im Beispiel der Zwischenkalbezeit – erst in einem zweiten Schritt in longitudinalen Studien klären. Dagegen weist der aktuell gefundene höhere Verschmutzungsgrad der Tiere am Euter in ungeimpften Fallbetrieben verglichen mit Kontrollbetrieben direkt darauf hin, dass betroffene Betriebe ein noch stärkeres Augenmerk auf die Sauberkeit der Kühe und deren Umgebung legen müssen.

Geimpfte Fallbetriebe wiesen mehrfaktoriell signifikant einen niedrigeren Wiederkau-Index auf als Kontrollbetriebe (MW: F2 42,2, K 53,4). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kühe auf geimpften Fallbetrieben einen niedrigeren Wiederkau- und Kuh-Komfort-Index aufwiesen, da die Kühe durch die vorangegangenen Impfungen nervöser auf die Studientierärzte reagierten. Da der Wiederkau-Index aber überwiegend ein Resultat aus der zuvor erfolgten Nahrungsaufnahme, dem Strukturgehalt der Ration, dem Liegekomfort und dem vorhandenen Stresslevel der Tiere in der Wiederkauphase ist, deutet der niedrigere Wiederkau-Index in den geimpften Fallbetrieben darauf hin, dass vermehrte Aufmerksamkeit auf die Futterstruktur und –qualität gelegt werden sollte. Zudem sollten gegebenenfalls



stallbauliche und weitere Maßnahmen eingeleitet werden, damit die Tiere ausreichend Ruhe und Platz zum Wiederkauen haben.

Der Anteil lahmer Kühe überschritt in allen teilnehmenden Betrieben (Fälle und Kontrollen) die üblicherweise in der Literatur dokumentierten Werte und zeigt einfaktoriel signifikant mehr lahme Kühe in Fallbetrieben als in Kontrollbetriebe (MW: K 58,6%, F 66,9% der Herde mit Bewegungsscore > 1). Inwiefern sich dieser Effekt auch im mehrfaktoriellen Modell bestätigt, kann wegen der vielfältigen Interaktionen der beteiligten sonstigen Variablen nicht abschließend beurteilt werden, jedoch kann eine intensivere Bekämpfung von Lahmheiten einer der Schritte für Betriebe sein, die ihre Herdengesundheit langfristig und dauerhaft verbessern möchten.

Die Eutergesundheit betreffend zeigte sich hinsichtlich der Zellzahlen in keinem Analyseschritt ein Unterschied zwischen Fall- und Kontrollbetrieben. Hinsichtlich der Anzahl der untersuchten Einzeltiere hatten geimpfte Fallbetriebe einfaktoriel signifikant sogar weniger Kühe mit verändertem Milchsekret. Es kann somit nicht davon ausgegangen werden, dass die Eutergesundheit ein Indikator für das chronische Krankheitsgeschehen ist.

## 2. Risikofaktoren

Vergleicht man die Risikomuster derjenigen Faktoren, die für das Auftreten von chronischem Krankheitsgeschehen verantwortlich waren zwischen den geimpften und nicht geimpften Fallbetrieben, so konnte kein Faktor identifiziert werden, der für beide Fallbetriebstypen gleichermaßen ein Risiko darstellte. Zusammenfassend kann man jedoch für beide Betriebstypen feststellen, dass eine bessere Futterqualität insbesondere bezüglich der Energiedichte dem Auftreten von chronischem Krankheitsgeschehen ebenso vorbeugen könnte wie eine sauberere und tiergerechtere Liegeboxen.

Für ungeimpfte Fallbetriebe halbiert die Steigerung der Energiedichte im Grundfutter von 6,2 auf 6,4 NEL MJ/ kg TS die Chance ein chronisches Krankheitsgeschehen zu entwickeln (OR:0,538 95%-KI:0,331-0,856). Obwohl ein Energiegehalt von 6,2 NEL MJ/ kg TS bereits als eine mittlere bis ausreichende Energieversorgung angesehen werden kann, deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass die Steigerung des Energiegehaltes auf über 6,2 NEL MJ/ kg TS die Herde so viel besser mit Energie versorgt, dass dies dem Auftreten von chronischem Krankheitsgeschehen vorbeugen kann. Sofern Betriebe gar keine Abteile mit dreckigen Laufflächen hatten, senkte dies die Chance für das Vorkommen von chronischem Krankheitsgeschehen um das Fünffache im Vergleich zu Betrieben, bei denen  $\geq 50\%$  der Abteile eines Betriebes dreckige Liegeflächen aufwiesen (OR: 0,197 95%-KI: 0,067-0,581). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die hygienischen Bedingungen beim Auftreten von chronischem Krankheitsgeschehen auf jeden Fall verbessert werden sollten oder wenn

möglich schon zuvor mehr Aufmerksamkeit finden sollten. Hinsichtlich des Tier-Tränkeplatz-Verhältnisses zeigte sich, dass dieses auf Kontrollbetrieben häufig etwas erhöht (1-1,5) war, während ungeimpfte Fallbetriebe sich gleichmäßig über alle drei Ausprägungen (<1, 1-1,5, >1,5) verteilten. Das Odds Ratio für ein Tier-Tränkeplatz-Verhältnis zwischen 1-1,5 gegen < 1 beträgt 0,21 (95%-KI: 0,06-0,69). Inwiefern ggf. die erhöhten Abgänge ungeimpfter Fallbetriebe zum Zeitpunkt des Betriebsbesuchs hierfür verantwortlich sind, konnte nicht abschließend geklärt werden.

In geimpften Fallbetrieben wurde die Chance ein chronisches Krankheitsgeschehen zu entwickeln um das Siebenfache (OR: 7,15 95%-KI: 1,37-37,38) reduziert, wenn bei keiner der auf dem Betrieb verfütterten Silagen ein abweichender mikrobiologischer Befund nachgewiesen werden konnte. Eine Überschreitung der Gesamtkeimzahl bzw. eine Belastung der Silagen mit Verderbnis anzeigenden Keimen kann über die Bildung von Endo- bzw. Mykotoxinen zu die unspezifischen Erkrankungen, Fruchtbarkeitsproblemen, Leistungsminderungen, und einer Schwächung des Immunsystems führen. Dagegen hatten geimpfte Fallbetriebe seltener Grassilagen mit einem Reineiweißgehalt < 50% (OR: 0,15 95%-KI: 0,04-0,67) als Kontrollbetriebe. Somit kann die Hypothese, dass ein verminderter Reineiweiß-Gehalt für die Entstehung des chronischen Krankheitsgeschehens ursächlich ist, nicht bestätigt werden. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Beprobung der Silagen zeitlich nach der Entstehung der Herdenprobleme erfolgte.

Auch bei den geimpften Fallbetrieben ist die Energiedichte wichtig. So senkt eine Steigerung der Energie der Ration von 6,8 auf 7,0 MJ NEL/ kg TS die Chance für chronisches Krankheitsgeschehen um das 2,5fache (OR:0,398, 95%-KI: 0,347-0,716). Wenn ein Betrieb in keinem Boxenlaufstall-Abteil Hochboxen hat, senkt dies die Chance für chronisches Krankheitsgeschehen gegenüber den Betrieben nur mit Hochboxen um das Achtfache (OR: 8,47 95%-KI: 2,04-35,16). Hochboxen können sich negativ auf den Kuh-Komfort-Index auswirken und zu Dekubitalstellen führen, sofern sie nicht eingestreut sind oder mit weichen Gummimatten ausgelegt sind.

Nach den bisher vorgestellten Ergebnissen liegen systematische Unterschiede hinsichtlich der Risikofaktoren zwischen geimpften und ungeimpften Fallbetrieben vor. Diese können nicht allein durch die Anwendung einer Impfung erklärt werden. Ob die Differenzen durch unterschiedliche Lösungsstrategien bei Herdengesundheitsproblemen bzw. eine unterschiedliche Einstellung von Landwirt und Tierarzt verursacht werden, kann im Rahmen dieser Studie nicht beantwortet werden.

## **Résumé**

Das chronische Krankheitsgeschehen ist auf Herdenbasis charakterisiert durch eine schlechtere Körperkondition, vermehrt Dekubitalstellen und schlechtere Kuh-Komfort-Indices im Vergleich zu Herden, die keine chronischen Herdenprobleme haben.

Bei den Analysen der Faktoren, die mit einem chronischen Krankheitsgeschehen assoziiert sind, konnten Muster identifiziert werden, jedoch war kein einzelner Faktor so auffällig, dass er als allein auslösend für diese Problematik verantwortlich gemacht werden kann. Vielmehr muss von einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren ausgegangen werden. Besonders auffällig waren die Bereiche Fütterung und Haltung, welche durch explizite Maßnahmen des betrieblichen Managements verbessert werden können. Die auslösenden Faktoren scheinen sich zwischen den geimpften und ungeimpften Fallbetrieben zu unterscheiden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass zukünftig für Betriebe, auf denen ein chronisches Krankheitsgeschehen auftritt, eine genaue, umfassende und individuelle Untersuchung des Betriebes notwendig ist, um zum einen die Situation der Herdengesundheit genau zu beschreiben und zum anderen das betriebliche Management so klar zu erfassen, dass sowohl für die Herdengesundheit wie auch für die individuellen Risikofaktoren Lösungsansätze gemeinsam mit dem Landwirt erarbeitet und eingeleitet werden können. Für die langfristige und flächendeckende Verbesserung der Herdengesundheit bedarf es daher nicht nur einer weiteren Erforschung der Ursachen, sondern insbesondere einer offenen und konstruktiven Zusammenarbeit von Forschung, Landwirtschaftskammern, Beratern, Tierärzten und Landwirten, um den Ursachen vorzubeugen bzw. sie praxisnah zu bekämpfen.