

Tierärztliche Hochschule Hannover

Antepartale Einschätzung des Risikos postpartaler Produktionserkrankungen anhand metabolischer, endokrinologischer und immunologischer Blutparameter bei Milchkühen

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Anne Kathrin Sander
Bielefeld

Hannover 2010

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. M. Kaske

Klinik für Rinder

Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. H.-J. Schuberth

Arbeitsgruppe Immunologie

Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachter:

Prof. Dr. M. Kaske

2. Gutachter:

Prof. Dr. T. Blaha

Tag der mündlichen Prüfung:

05.05.2010

Meinen Eltern

Anne Kathrin Sander

Antepartale Einschätzung des Risikos postpartaler Produktionserkrankungen anhand metabolischer, endokrinologischer und immunologischer Blutparameter bei Milchkühen

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	9
Literatur.....	12
Publikation 1:.....	16
Plasma IGF-I Concentrations do not correlate with the ex vivo Phagocytic Activity in Dairy Cows during the Transition Period.....	
Publikation 2:.....	38
Calculation of the risk for postpartal diseases in dairy cows by blood parameters measured ante partum.....	
Publikation 3:.....	78
Zur Prävention peripartaler Erkrankungen der Milchkühe: Effekte der unmittelbar postpartalen Flüssigkeitsaufnahme auf Futteraufnahme und metabolisch relevante Blutparameter.....	
Publikation 4:.....	95
Zur Prophylaxe der peripartalen Erkrankungen der Milchkühe: Effekte der unmittelbar postpartalen Tränkeaufnahme auf die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten und ausgewählte Blutparameter.....	
Übergreifende Diskussion.....	118
Literatur.....	137
Zusammenfassung.....	146
Summary.....	150
Danksagungen.....	154

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
a.p.	ante partum
BCS	Body condition score
BHB/BHBA	β -Hydroxybutyrat
CPT-1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
CV	coefficient of variance
DMI	dry matter intake
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Fig.	Abbildung (Figure)
FITC	fluoresceinisothiocyanate
<i>g</i>	mittlere Erdschwerebeschleunigung
G	Gauge
GHR	growth hormone receptor
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
LMV	Labmagenverlagerung
DA	displacement of abomasum
μ L	microliter
μ mol	micromol
mRNA	messenger RNA
n	number
NEB	negative energy balance
NEFA	non esterified fatty acids
p	probability
PBS	phosphate buffered saline
PMN/L	polymorphonuclear neutrophil
PMR	partly mixed ration
p.p.	post partum
- PV	negative predictive value
+ PV	positive predictive value

r	correlation coefficient
Ret. sec.	Retentio secundinarum
ROS	reactive oxygen species
SD	standard deviation
SEM	standard error of mean
Tab.	Table / Tabelle
TMR	total mixed ration
wk	week
yr	year

Abkürzungen Gruppen:

H	healthy
HC	hypocalcaemia
K/DA	ketosis / displacement of abomasum
MA	mastitis
RFM/M	retained fetal membranes/metritis
PD	production disease
PDEK	production disease except ketosis

Einleitung

In der Transitperiode, d. h. drei Wochen vor bis drei Wochen nach der Kalbung (DRACKLEY 1999), sind enorme metabolische und endokrinologische homöostatische Anpassungsreaktionen bei Milchkühen notwendig, um die kurzfristigen Änderungen in Energiebedarf und -abgabe zu bewältigen (BAUMAN 2000). Es kommt zu einer Umverteilung von Nährstoffen aus maternalen Speichern in Richtung Placenta bzw. Milchdrüse (GRUMMER et al. 2004). Bei der Mehrzahl insbesondere der Hochleistungskühe entwickelt sich ein Energiedefizit infolge einer nicht adäquat zur Milchleistung ansteigenden Futteraufnahme. Die Futteraufnahmemenge ist in der Transitperiode deutlich reduziert, verglichen mit anderen Zeitpunkten des gesamten Laktations- Gestationszyklus (GRUMMER et al. 2004). Der Organismus versucht die negative Energiebilanz mit einer verstärkten Lipomobilisation zu kompensieren. Hierdurch erhöht sich die Disposition für Erkrankungen wie die hypocalcämische Gebärpause, Nachgeburtsverhaltung, Metritis, Ketose, Mastitis und Labmagenverlagerungen (DRACKLEY 1999; GRUMMER et al. 2004). Entsprechend treten Produktionserkrankungen am häufigsten während der Transitperiode auf (FLEISCHER et al. 2001). Die durch züchterische Selektion und Intensivierung der Fütterung erreichte und auch zukünftig weiter ansteigende Milchleistung verschärft dies Problem zunehmend (VEERKAMP u. BROTHERSTONE 1997; BRADE 2005).

Kühe einer Herde unterscheiden sich jedoch wesentlich in der Adaptationsfähigkeit an die veränderten Stoffwechsellanforderungen (HERDT 2000; KASKE et al. 2005), viele Tiere bewältigen auch eine ausgeprägt negative Energiebilanz ohne Stoffwechsellentgleisungen oder andere Produktionserkrankungen.

Veränderungen in der Reaktivität des Immunsystems zum Zeitpunkt der Kalbung werden mit dem vermehrten Auftreten von Infektionskrankheiten in der Transitperiode in Verbindung gebracht (OHTSUKA et al. 2004). So sind die T-Zell

Subpopulationen um den Geburtszeitraum quantitativ und funktionell signifikant beeinflusst (VAN KAMPEN and MALLARD 1997). Zudem ist die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten, die für die Elimination von Bakterien entscheidend sind (SMITS et al. 1997), bei Kühen in einer negativen Energiebilanz herabgesetzt; dies geht einher mit einer erhöhten Anfälligkeit für Puerperalstörungen (KULCSAR et al. 2005; OPSOMER 2007). Die eingeschränkte Funktion von neutrophilen Granulozyten wird außerdem als eine Ursache für Nachgeburtsverhaltungen angesehen (KIMURA et al. 2002).

Eine Vielzahl von Maßnahmen wurde inzwischen geprüft, um Kühen die Bewältigung der metabolischen Belastung während der Transit-Periode zu erleichtern. Diese beziehen sich insbesondere auf das Haltungs- und Fütterungsmanagement (GRUMMER 2004; COOK 2004; GUTERBOCK 2004). Unter anderem gibt es Hinweise, dass die Aufnahme großer Tränkemengen unmittelbar post partum die mit der Abkalbung einhergehende Immunsuppression beeinflusst (MANSFELD R. 2008; NORDLUNG 2008). So ergaben sich nach der postpartalen Aufnahme von 20-30 L einer mit Glucose, Elektrolyten und Vitaminen angereicherten Tränke positive Effekte auf die Inzidenz von Produktionskrankheiten und die Milchleistung (GEISHAUER 2001; GUNDELACH 2007). Darüberhinaus besteht eine enge Korrelation zwischen der Höhe der Trockenmasseaufnahme und der Wasseraufnahme (MURPHY et al. 1983; MURPHY et al. 1992).

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, inwieweit sich bereits antepartal aus Blutuntersuchungen Hinweise auf postpartal auftretende Produktionskrankheiten ableiten lassen, um so das Risiko für postpartale Erkrankungen möglichst frühzeitig quantitativ beurteilen zu können. Daraus ergibt sich perspektivisch die Option, das Erkrankungsrisiko gefährdeter Tiere durch frühzeitige, spezielle präventive Maßnahmen zu vermindern.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen im Rahmen dieses Dissertationsprojektes untersucht:

1. Wie verändern sich metabolische und endokrinologische Leitparameter während der Trockenstehzeit und der Laktation?
2. Unterscheiden sich metabolische und endokrinologische Leitparameter zwischen Tieren, die in der Transitperiode klinisch erkranken und Tieren, die in der Transitperiode klinisch unauffällig bleiben?
3. Ist bereits ante partum erkennbar, welche Tiere in der Transitperiode einem hohen Risiko ausgesetzt sind, eine Produktionserkrankung zu entwickeln?
4. Wie verhält sich die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten im Zeitraum von drei Wochen vor bis vier Wochen nach der Kalbung? Ist die Phagozytoseleistung ein Grund, der ursächlich für eine hohe Inzidenz von Produktionserkrankungen in der Transitperiode ist?
5. Hat die Aufnahme einer Roboranstränke zum Zeitpunkt der Kalbung einen Einfluss auf metabolische oder endokrinologische Parameter bzw. die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten?

Dazu wurden metabolische und endokrinologische Leitparameter, die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten und das Auftreten von Erkrankungen bei 41 pluriparen und 18 primiparen Kühen der Rasse Holstein Friesian ausgewertet.

Literatur

BAUMAN, D. E. (2000):

Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. In (P. B. CRONJE; Ed.): Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction.

CAB International, 311-328

BRADE, W. (2005):

Nutzungsdauer und Abgangsursachen von Holsteinkühen: Konsequenzen für die Züchtung?

Prakt. Tierarzt 86, 658-667

COOK, N. B. and K. V. NORDLUND (2004):

Behavioral needs of the transition cow and considerations for special needs facility design.

Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 495-520

DRACKLEY, J. K. (1999):

ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?

J Dairy Sci 82, 2259-2273

FLEISCHER, P., M. METZNER, M. BEYERBACH, M. HOEDEMAKER and W. KLEE (2001):

The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows.

J Dairy Sci 84, 2025-2035

GEISHAUER, T. (2001):

Drenchen der Milchkuh: Wie und womit?

VETimpulse 18, 14-15

GRUMMER, R. R., D. G. MASHEK u. A. HAYIRLI (2004):

Dry matter intake and energy balance in the transition period.

Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 447-470

GUNDELACH, Y., M. HOEDEMAKER (2007):

Einfluss des postpartalen Drenchens mit Calciumpropionat auf die Stoffwechselfundheit, Milchleistung, Fertilität und Allgemeingesundheit hochleistender Milchkühe.

Tierärztliche Umschau 291-299

GUTERBOCK, W. M. (2004):

Diagnosis and treatment programs for fresh cows.

Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 605-626, vii

HERDT, T. H. (2000):

Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing.

Vet Clin North Am Food Anim Pract 16, 387-403

KASKE, M., K. HORSTMANN, S. SEGGEWISS, U. MEYER (2005):

Inter- und intraindividuelle Varianz von Futteraufnahme, Energiebilanz sowie metabolisch- endokrinologischen Leitparametern im Blut von hochleistenden Kühen in der Früh-laktation. Forum für angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung

Tagungsunterlagen, 82-84

KIMURA, K., J. P. GOFF, M. E. KEHRLI, JR. u. T. A. REINHARDT (2002):
Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle.
J Dairy Sci 85, 544-550

KULCSAR, M., S. JANOSI, T. LEHTOLAINEN, L. KATAI, C. DELAUAUD, O.
BALOGH, Y. CHILLIARD, S. PYORALA, P. RUDAS u. G. HUSZENICZA (2005):
Feeding-unrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants.
Domest Anim Endocrinol 29, 214-226

MANSFELD R., C. S.-L. U. R. M. (2008):
Steuerung des Metritis-/ Endometritis Risikos bei Milchkühen.
Kompendium Nutztier, Parey Verlag

MURPHY, M. R., C. L. DAVIS and G. C. MCCOY (1983):
Factors affecting water consumption by Holstein cows in early lactation.
J Dairy Sci 66, 35-38

MURPHY, M. R. (1992):
Water metabolism of dairy cattle.
J Dairy Sci 75, 326-333

NORDLUNG, K. (2008):
AABP Kongress, Charlotte/ North Carolina.

OHTSUKA, H., M. KOIWA, S. FUKUDA, Y. SATOH, T. HAYASHI, F. HOSHI, T. O.
YOSHINO u. S. KAWAMURA (2004):
Changes in peripheral leukocyte subsets in dairy cows with inflammatory diseases
after calving.
J Vet Med Sci 66, 905-909

OPSOMER, G., BOSSAERT, P., COOLS, S., DE KRUIF, A. (2007):

Reduced fertility in modern high yielding dairy cows: etiology and prevention.

Reproductive health 13, 391-401

SMITS, E., C. BURVENICH u. R. HEYNEMAN (1997):

Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood.

Vet Immunol Immunopathol 56, 259-269

VAN KAMPEN, C. u. B. A. MALLARD (1997):

Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets.

Vet Immunol Immunopathol 59, 79-91

VEERKAMP, R. F. u. S. BROTHERSTONE (1997):

Genetic correlations between linear type traits, food intake, live weight and condition score in Holstein Friesian dairy cattle.

J Anim Sci 64, 385-392

Publikation 1:

Plasma IGF-I Concentrations do not correlate with the ex vivo Phagocytic Activity in Dairy Cows during the Transition Period

A. K. Sander^{*}, M. Piechotta^{*}, M. Kaske^{*}, ¹H. J. Schuberth[†]

^{*} Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine, Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

[†] Immunology Unit, University of Veterinary Medicine, Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

1) Corresponding author:

Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth, Immunology Unit, University of Veterinary Medicine, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover

Tel. ++49 511 856 7267, Fax ++49 511 856 7682

e-Mail: hans-joachim.schuberth@tiho-hannover.de

An impaired function of PMNL is reported to be one of the major reasons for increased susceptibility of dairy cows to infections during the peripartal period. In vitro studies suggest that IGF-I affects the function of PMNL. Based on the phagocytic activity, capacity and total number of PMNL in the blood of primiparous and pluriparous cows, the plasma IGF-I level around calving are not indicative for the phagocytic overall performance of bovine PMNL.

Abstract

The impaired function of PMNL during the peripartal period is one major reason for an increased susceptibility of dairy cows to infections in this critical time frame. PMNL dysregulating factors are widely unknown. IGF-I, however, has been reported to enhance PMNL functions in vitro. The objective of this study was to investigate the influence of plasma IGF-I concentrations (measured by an immunoradiometric assay)

on phagocytic activity (percentage of viable PMNL) and phagocytic capacity (mean fluorescence intensity of phagocytic PMNL) assessed by flow cytometry. Ante partum [a. p.], i.e. wk - 3, - 2, - 1 before calving, plasma concentrations of IGF-I were high (80-110 ng/mL) without significant differences between primiparous and pluriparous cows (n = 18 and n = 41, respectively). IGF-I declined towards the week of calving (wk 0). Post partum [p.p.], i.e. wk 1, 2, and 4 after calving, IGF-I remained lower than before parturition; levels were higher in primiparous compared to pluriparous cows. Phagocytic activity (PA) was constant in primiparous cows during the study period. Conversely, PMNL of pluriparous cows displayed a significantly increase and higher PA in wk 1 and 2 p.p. compared to primiparous cows. Phagocytic capacity (PC) decreased significantly only in primiparous cows at calving, while the number of PMNL in primiparous cows exceeded that of pluriparous cows significantly. The phagocytic power (PP) (a product of PA by PC), but not the phagocytic overall performance (POP, a product of phagocytic activity, phagocytic capacity, and PMNL number), differed between primiparous and pluriparous cows in wk 2 p.p. There were no significant differences in phagocytic overall performance except wk 4 after calving between the groups. In both groups we found a significant increase of POP at calving. No statistical correlations between total IGF-I plasma concentrations and PA, PC, PP, POP or PMNL number were found neither in primiparous nor in pluriparous cows.

It is concluded that PMNL functions seem not to be dependent on plasma IGF-I concentrations in dairy cows during the transition period.

Key words: IGF-I, PMNL, transition period, immune suppression

Introduction

Periparturient diseases are very common in high yielding dairy cows and result in major economic losses. The transition period has a great impact upon subsequent production, fertility, and health. Classical view is that immunity is suppressed or skewed towards anti-inflammatory reactions during gestation and that the periparturient period is generally associated with an immune suppression (Van Kampen and Mallard, 1997), which predisposes the cows to infectious diseases (Mehrzhad et al., 2009).

PMNL play a decisive role in the elimination of invading bacteria. Their phagocytic and bactericidal function is pivotal for the host defence (Smits et al., 1997). In dairy cows, pregnancy and lactation are associated with impaired functions of PMNL and lymphocytes (Kehrli et al., 1989; Sheldon et al., 2009). The transition from pregnancy to calving is also accompanied by a gradual decrease of PMNL bactericidal capacity (Hoeben et al., 2000). Furthermore, it has been reported that viability of blood PMNL is significantly higher in primiparous compared to pluriparous cows (Mehrzhad et al., 2002). The decrease of PMNL viability and production capacity of free radicals of pluriparous cows suggest a reduced protection of pluriparous compared to primiparous cows against pathogenic bacteria (Mehrzhad et al., 2009).

Endocrine and metabolic changes around calving may modulate PMNL phagocytic function (Burvenich et al., 2007; Madsen et al., 2002). One of various endocrine changes in the transition period is the significant decrease of plasma IGF-I concentrations by 70% after calving (Taylor et al., 2004), facilitating the mobilization of amino acids from skeletal muscle in support of hepatic gluconeogenesis (Bell, 1995; Boisclair et al., 1994). The plasma concentration of IGF-I was reported to be higher in primiparous compared to pluriparous cows. Lower IGF-I levels post partum have been associated with a longer calving to conception interval, and, despite repeated services, failures to conceive (Taylor et al., 2004). Cows with severe negative energy balance (NEB) and lower IGF-I concentrations post partum had reduced numbers of white blood cells and lymphocytes (Wathes et al., 2009). In vitro, IGF-I increased the phagocytosis of both IgG-opsonized *Staphylococcus aureus* and complement-opsonized *Candida albicans* by human PMNL. In addition, IGF-I

increased complement receptor expression on PMNL and their oxidative burst (Bjerknes and Aarskog, 1995; Inoue et al., 1998). Moreover, IGF-I inhibited spontaneous apoptosis of granulocytes in serum-free cultures of human granulocytes by 32-45%. This indicates that IGF-I may promote granulocyte functions by increasing granulocyte longevity (Kooijman et al., 2002). In contrast, in vivo studies with mice indicated that IGF-I administered intraperitoneally inhibited gastric accumulation of PMNL by inhibition of caspase-3-mediated EMAP-II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II) activation (Zhao et al., 2009). Comparable results were obtained in a study with piglets (Balteskard et al., 1998). Pretreatment of piglets with IGF-I infusion suppressed the ability of PMNL to phagocytose bacteria under nonseptic conditions. However, in vitro priming of human neutrophils with IGF-I revealed that IGF-I enhanced both phagocytosis and the respiratory burst. In cows, no studies regarding the effects of IGF-I on PMNL have been reported yet.

Following the hypothesis, that IGF-I may influence not only the number but also the function of bovine PMNL during the transition period, the objectives of this study were (a) to determine the effects of pregnancy, calving, and early lactation on PMNL phagocytic activity and capacity in primiparous and pluriparous cows, and (b) to test the correlations between IGF-I plasma concentrations and PMNL phagocytic activity and capacity.

Materials and methods

Animals and Management

A total of 59 dairy cows of the Hannover University Farm (48 Holstein Friesian [HF], 11 crossbreeds of Brown-Swiss x HF) were included in the study, which was approved and in accordance with German legislation on animal rights and welfare (AZ 33.9-42502-04-08/1592).

All pluriparous cows were dried off approximately six weeks before the predicted calving date and were grouped together with the primiparous cows in a cubicle housing system fitted with slatted floor. Dry cows were fed a grass-silage based partly mixed ration blended with 5% chopped straw. About two to one week before the predicted calving day cows were grouped in the transition area and fed the partly mixed ration prepared for fresh cows. Additionally cows got thrice daily 1 kg concentrate. Calving in straw-bedded maternity pens was uncomplicated in almost all cases; at least moderate obstetrical assistance was applied. After calving, the primiparous (HF, n = 18; 2.0 – 3.2 yr) and pluriparous cows (HF, n = 30, Brown-Swiss x HF- n = 11; 2nd – 5th lactation, 3.2 – 8.8 yr) were housed either in a straw yard and milked in a milking parlour twice a day or in cubicle housing system fitted with slatted floors and milked by a milking robot.

All lactating cows were fed a partly mixed ration (47.9 % corn silage, 39.7 % grass silage, 9.9 % soy, 2.5 % sugar beet crop) providing 6.9 MJ NEL/kg.

The partly mixed ration was formulated on the basis of a milk yield of 23 kg / d and was intended to provide ad libitum intake. Cows producing more than 23 kg / d were fed additionally concentrate in feeding stations.

Blood Sampling

Blood samples were collected into tubes containing sodium-heparin (BD-Vacutainer System, Plymouth; UK) and potassium-EDTA (Sarstedt, Nürnberg, Germany) as anticoagulant by jugular venipuncture using a 17-gauge needle.

The clinical status of the cows was monitored daily by the farm staff. If a significant reduce of milk yield and/or a reduced intake of concentrate was noticed, a

veterinarian was consulted. If evidence for a production disease was substantiated by clinical investigation, these cows were excluded from the respective blood sampling (Tab. 1).

Blood sampling was done from each cow once weekly always on the same day between 06:00 to 10:00 A.M. in wk - 3, - 2 and - 1 prior to the predicted calving date, in the week of calving, and in wk 1, 2, and 4 after calving.

The EDTA blood samples were cooled down immediately on ice, centrifuged (1600 x g, 20 min), and the plasma was kept frozen at -20°C until analyzed for IGF-I and cortisol. Sodium-heparin blood samples were kept at room temperature. Phagocytic activity and capacity of neutrophilic granulocytes were assessed within three hours after blood sampling.

Determination of IGF-I concentrations in Plasma

For total plasma IGF-I determination, an ACTIVE Insulin-Like Growth Factor-I coated tube IRMA Kit (DSL-5600, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA) was used. IGF-I was separated from its binding proteins by an acid-ethanol extraction procedure and IGF-I concentrations were determined with a two-site immunoradiometric assay. The intra-assay coefficient of variance (CV %) was 1.5 - 3.5% and the inter-assay CV was 1.5 - 8.5%.

Determination of cortisol concentrations in Plasma

Cortisol was determined using the Immulite system (Siemens Diagnostics, Deerfield, USA). The intra-assay coefficient of variation (CV %) was 6.3 – 10.0 % and the inter-assay CV was 5.8 - 8.8 %.

Total and differential leukocyte counts

The number of circulating leukocytes was counted by an electronic cell counter (Celltac, Nihon Kohden, Rosbach). Differential leukocyte counts (percentages of subpopulations among all leukocytes) were determined by differentiating 100 cells using blood smears stained with May-Grünwald-Giemsa (Merck, Darmstadt,

Germany) with light microscopy. Numbers of PMNL / mL blood were calculated as % PMNL x total leukocytes.

Determination of Phagocytic Activity [PA] and Phagocytic Capacity [PC]

Nonviable *staphylococcus aureus* in suspension (Pansorbin, Calbiochem, Merck, Nottingham, UK) were labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). FITC-labelled *Staphylococcus aureus* were centrifuged at 14,000 x g for 1 min. Pelleted bacteria were resuspended in PBS and centrifuged again. This procedure was repeated twice. Finally, bacteria were adjusted to 2 x 10⁸ cells/mL PBS.

Flow cytometer tubes (Becton Dickinson, Plymouth; UK) were filled with 100 µL of heparinised whole blood, and 50 µL FITC-labelled bacteria suspension (1x10⁷ bacteria) were added. The mixture was incubated for 30 min at 37 °C and 5 % CO₂. Erythrocytes were lysed by adding 2 mL of double-distilled water for 20 s, followed by addition of 2 mL double-concentrated PBS. Leukocytes were centrifuged (14,000 x g) for 10 min, the supernatant discarded and resuspended in 300 µL sterile-filtered PBS containing 2 µg/mL propidium iodide.

Cells were analyzed using a particle counter (Coulter counter, Coulter Electronics Ltd., Luton., UK). The data were collected with FACStation using the software CellQuest (Becton and Dickinson Biosciences). Ten thousand events were acquired. Viable PMNL were identified after gating on events with characteristic forward and side scatter values which were negative for propidium iodide fluorescence. PMNL with ingested bacteria were identified as gated events with increased green fluorescence. Phagocytic activity (PA) was defined as the percentage of green fluorescing PMNL among viable PMNL. Phagocytic capacity (PC) was defined as the mean fluorescence intensity of green fluorescing PMNL. The phagocytic power (PP) was defined as the product of PA by PC, specifying the amount of ingested bacteria by a given PMNL population. The phagocytic overall performance (POP) was defined as the product of the PP by the absolute number (N) of PMNL present in a given assay.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with SigmaStat 2.0 software and $P < 0.05$ was considered to be significant. The Kolmogorov-Smirnov test was used to check whether results differed from a normal distribution. ANOVA and students' T-tests were used to identify differences between primiparous and pluriparous cows and, secondly, between weeks of the transition period. If normality failed, the rank sum test was applied. Correlations were tested using the Pearson product moment correlation, or, in case of not normally distributed data, the Spearman rank order test. Linear regressions were calculated between IGF-I concentrations and phagocytic activity, phagocytic capacity, phagocytic power, and phagocytic overall performance for each respective week of the study period. Data were presented as mean \pm SEM.

Results

Plasma IGF-I concentrations

IGF-I concentrations were significantly higher in wk - 3, - 2, - 1 compared to wk of calving (wk 0) and wk 1, 2, 4 ($p < 0.001$) (Fig. 1). IGF-I plasma concentrations did not differ between primiparous and pluriparous cows ante partum. In primiparous cows IGF-I concentrations were significantly higher a.p. compared to wk 0 (wk - 3, $p = 0.003$; wk - 2, $p = 0.018$; wk - 1, $p < 0.001$), wk 1 p. p. (wk - 3, $p = 0.009$; wk - 2, $p = 0.046$; wk - 1, $p < 0.001$) and wk 4 p. p. (wk - 3, $p = 0.017$; wk - 2, $p = 0.026$; wk - 1, $p < 0.001$). In wk -1 IGF-I concentrations were significantly higher compared to wk 2 post partum ($p = 0.002$). From wk 0 to wk 4 p. p., IGF-I concentrations were significantly higher in primiparous cows (Fig. 1) ($p < 0.01 - p < 0.001$) compared to pluriparous cows.

Plasma cortisol concentrations

Primiparous (38.9 ± 4.8 ng/mL) and pluriparous cows (33.6 ± 2.8 ng/mL) displayed the same cortisol concentrations at calving.

Blood neutrophilic granulocyte counts

Both in primiparous and pluriparous cows, blood PMNL counts increased significantly in wk 0 (Fig. 2). Primiparous cows displayed significantly higher PMNL counts ($11,393 \pm 771$ PMNL/ μ L blood) compared to pluriparous cows ($8,673 \pm 859$ PMNL/ μ L blood) ($p = 0.001$) at calving. The PMNL counts in primiparous cows tended to exceed those of pluriparous cows during the whole study period except wk 4 p. p. when the number was higher in pluriparous cows ($6,316 \pm 663$) than in primiparous cows ($3,744 \pm 451$) ($p = 0.007$).

Phagocytic activity [PA] and capacity [PC]

Phagocytic activity did not differ between primiparous and pluriparous cows ante partum (Fig 3A). In pluriparous cows, but not in primiparous cows, a significant increase of PA was observed in wk 1 post partum. In wk 1 and wk 2 the PA of pluriparous cows exceeded that of primiparous cows significantly.

PC was similar in primiparous and pluriparous cows except wk - 2 with higher values in pluriparous cows compared to primiparous cows ($p = 0.04$) (Fig 3B). In primiparous cows PC decreased between wk - 1 and wk 0 from wk - 1 till calving ($p = 0.025$) with a subsequent increase to wk 1 ($p = 0.002$).

Phagocytic power [PP] and overall performance [POP]

The phagocytic power tended to be higher in pluriparous than in primiparous cows which reached a level of significance only in wk 2 p.p. ($p = 0.01$) (Fig. 4A).

In primiparous and pluriparous cows, PP increased from calving to wk 1 (in primiparous cows significantly, $p = 0.014$) followed by a decrease from wk 1 to wk 2 (Fig. 4A). PP of primiparous cows was only in wk-1 higher than in pluriparous cows. POP increased from wk -1 to wk 0 in primiparous and pluriparous cows ($p < 0.001$), followed by a significant decrease (wk 1) (primiparous cows $p < 0.001$, pluriparous cows $p = 0.009$). In pluriparous cows there was a significant increase from wk 1 to wk 2 post partum ($p = 0.02$). In wk 4 phagocytic overall performance was significantly higher in pluriparous cows compared to primiparous cows ($p = 0.02$) (Fig 4B). POP was comparable between primiparous and pluriparous cows throughout the period tested except wk 4.

PMNL and IGF-I plasma concentrations

No correlations were obvious between IGF-I concentrations and PC, PMNL numbers, PP and POP neither in primiparous nor in pluriparous cows (data not shown). A total of 70 correlations were tested. The only exceptional cases were found in primiparous cows with a negative correlation between IGF-I concentrations and PA in the week of calving ($p = 0.018$, $r = -0.67$), and in pluriparous cows with a similar negative correlation in wk 4 post partum ($p = 0.009$, $r = -0.47$).

Discussion

The impaired function of PMNL during the peripartal period depends on a variety of humoral and cellular factors and is discussed to be one major reason for an increased susceptibility of dairy cows to infections. Fatty liver and NEB were already associated with an impaired peripheral blood neutrophil function (Hammon et al., 2006; Zerbe et al., 2000). In primiparous cows even less factors are known to affect the immunity in early lactation (Piepers et al., 2009). Plasma levels of IGF-I are reduced during NEB and decrease towards calving with lowest concentrations at calving (Lucy, 2000; Wathes et al., 2009).

The considerable variation of IGF-I concentrations throughout the transition period (Fig. 1), represents an excellent precondition to check whether IGF-I levels correspond to changes of parameters characterizing phagocytic PMNL function.

Moreover, primiparous cows with ongoing growth during pregnancy and first lactation were reported to have higher IGF-I concentrations than pluriparous cows (Taylor et al., 2004), providing a rational approach for the comparison of primiparous with pluriparous cows during the peripartal period. Absolute IGF-I concentrations and the characteristically decrease of IGF-I concentrations around calving were comparable to results of other studies (Kawashima et al., 2007; Mallard et al., 1997; Taylor et al., 2004).

Since in vitro studies suggested that IGF-I enhances PMNL functions (Bjerknes and Aarskog, 1995; Inoue et al., 1998; Kooijman et al., 2002) we addressed the hypothesis that IGF-I plasma concentrations are predictive for the functionality of PMNL between wk - 3 a. p. and wk 4 p. p. in primiparous and pluriparous cows.

IGF-I around Calving

The previously reported higher IGF-I concentrations in primiparous cows in wk -1 (Taylor et al., 2004) could not be confirmed (Fig. 1), which might be due to differences in feeding regime or the lower number of animals used in our study. In agreement with Taylor et al. (2004) we found significantly higher IGF-I concentrations at calving and post partum in primiparous compared to pluriparous cows.

PMNL- Number and IGF-I

Increased number of blood PMNL at calving was probably due to a stress reaction contributing to L-selectin shedding (Hoeben et al., 2000; Wegner et al., 1976).

The number of PMNL at calving was significant higher in primiparous compared to pluriparous cows, while cortisol concentrations were comparable. Although IGF-I plasma concentration and PMNL number were significantly higher in primiparous compared to pluriparous cows at calving, no correlation was observed between these two parameters over the whole study period. This is in contrast to further results (Kooijman et al., 2002), who reported a correlation between IGF-I concentrations and PMNL longevity.

In the present study there was a significant higher PA in pluriparous compared to primiparous cows in wk 1 and wk 2 after calving. This is in contrast to Mehrzad et al. (2009) who reported a pronounced reduction in phagocytosis of *S. aureus* in PMNL from pluriparous cows compared to those of primiparous. This contradiction may be explained by different approaches to investigate PA. Whereas Mehrzad et al. (2009) added pooled bovine serum to purified PMNL and bacteria, we used a whole blood assay and, thus, the PA of individuals depended not only on the intrinsic activity of the phagocytic cells but also on the phagocytosis-enhancing factors (e.g. antibodies, complement factors) in the plasma of individuals. Although we did not further analyze plasma concentrations of opsonising factors, it seems reasonable to suggest that pluriparous cows have higher respective plasma levels resulting in a higher PA compared to primiparous cows.

Differences between primiparous and pluriparous cows were even more pronounced when considering the PC (depicting the mean fluorescence value of PMNL which had phagocytosed). Compared to rather constant values in pluriparous cows, there was a significant decrease in primiparous cows around calving. Thus, not only the fraction of PMNL which phagocytosed, but also the number of phagocytosed bacteria per cell was significantly lower in primiparous cows.

Phagocytosis assessed in whole blood assays ex vivo is affected not only by PA and PC, but also by the number of PMNL (Fig. 4B). Thus, we calculated also the POP

taking all these parameters into account. This analysis demonstrated that pluriparous and primiparous cows did not differ in respect to PMNL function at time of calving. In primiparous cows, apparently lower PA and PC were compensated by higher blood PMNL numbers. The differences between primiparous and pluriparous cows regarding PA, PC, and number of PMNL suggest that it is insufficient to determine only one parameter to assess PMNL function.

Interestingly all peripartal changes of all parameters assessed to describe phagocytic PMNL function differed markedly from the concomitant changes in plasma IGF-I levels. Consequently, there were no correlations found, suggesting that IGF-I plasma concentrations are not indicative for altered PMNL functions. This conclusion is supported by findings of Hoeben et al. (1999) who treated cows with bovine somatotropin, which increased plasma IGF-I concentration significantly. However, no effect on the generation of reactive oxygen species by PMNL and no migration-enhancing effects could be observed. Studies with other species suggest that treatment with IGF-I also had no enhancing and even a suppressing effect on the phagocytic function of ex vivo analysed PMNL e.g. in piglets (Balteskard et al., 1998), which is at least partially in line with our observations.

The ex vivo findings are however in some contrast to the reported PMNL function enhancing effects of in vitro added free IGF-I (Fu et al., 1991; Balteskard et al., 1998; Bjerknes and Aarskog, 1995; Inoue et al., 1998). The discrepancy between in vitro and our ex vivo results in respect to the role of IGF-I for PMNL function may be due to the dose – effect relation. Physiological concentrations of in vitro added IGF-I primed PMNL for an enhanced generation of reactive oxygen species (Fu et al., 1991). In studies revealing an enhancing effect of IGF-I on phagocytosis, hundred- to thousand-fold higher IGF-I concentrations (Balteskard et al., 1998; Inoue et al., 1998) than physiologically found in plasma were used. Thus, the addition of free IGF-I to in vitro culture medium seems to be inappropriate to reflect the in vivo situation where at least 99% of IGF-I is bound to IGFBP3 (IGF-binding protein 3) leaving only small fraction (about 0.9 ng/mL) of free IGF-I (Denley et al., 2005). Thus, POP obtained

from cows with low plasma IGF-I concentrations around calving are consistent with the physiological actions of IGF-I in whole blood assays for determination of phagocytic activity and capacity.

Conclusion

The POP of PMNL is a derived parameter characterizing the amount of PMNL which are able to phagocytose and their performance in a given time frame. The whole blood assay together with the flow cytometric evaluation indicates that the peripheral pool of PMNL is less suppressed regarding phagocytosis at the time of calving than previously assumed. A decline of the phagocytic capacity of PMNL population is overcompensated by higher numbers of available PMNL. Since correlations between individual parameters of the phagocytosis by PMNL and IGF-I plasma concentrations did not strikingly show up, IGF-I levels cannot be regarded as being predictive for the ability of bovine blood PMNL to phagocytose bacteria.

Figures

Figure captions

Figure 1. Plasma concentrations of IGF-I in primiparous (n = 14 - 18/wk) and pluriparous cows (n = 30 - 40/wk) from wk - 3 to wk 4 (mean \pm SEM). Asterisks indicate significant differences between primiparous and pluriparous cows (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Different letters indicate significant differences among consecutive weeks.

Figure 2. Numbers of PMNL per μ L blood in primiparous and pluriparous cows from wk - 3 to wk 4 (mean \pm SEM). Asterisks indicate significant differences between primiparous (n = 14 - 18/wk) and pluriparous cows (n = 30 - 40/wk) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Different letters indicate significant differences among consecutive weeks.

Figure 3. Phagocytic activity (A) [defined as % of viable PMNL] and phagocytic capacity (B) [defined as mean fluorescence intensity of phagocytic PMNL] of PMNL from primiparous and pluriparous cows (mean \pm SEM). Asterisks indicate significant differences between primiparous (n = 12 - 18 per wk) and pluriparous cows (n = 19 - 30 per wk) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Different letters indicate significant differences among consecutive weeks.

Figure 4. Phagocytic power (A) [defined as phagocytic activity x phagocytic capacity] and phagocytic overall performance (B) [defined as phagocytic activity x phagocytic capacity x PMNL number] of bovine PMNL from primiparous and pluriparous cows (mean \pm SEM). Asterisks indicate significant differences between primiparous (n = 12 - 17 per wk) and pluriparous cows (n = 18 - 29 per wk) (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Different letters indicate significant differences among consecutive weeks.

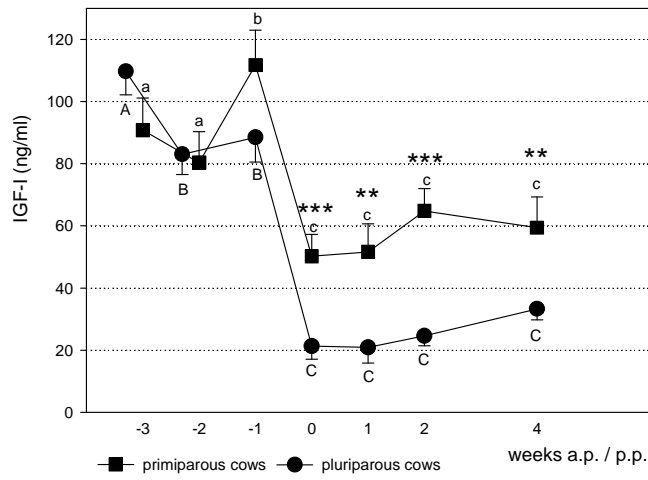


Fig. 1

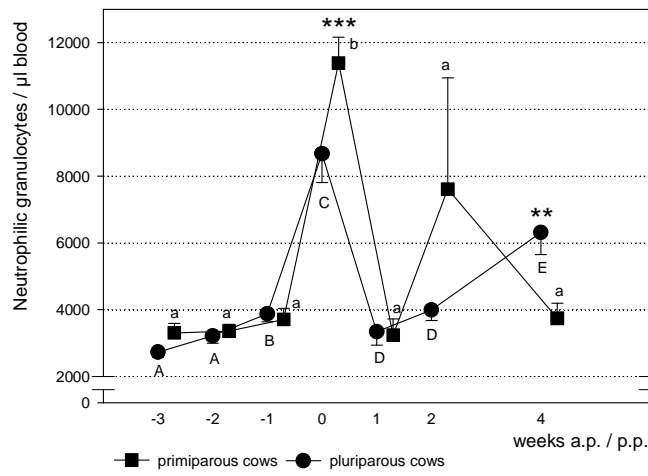


Fig. 2

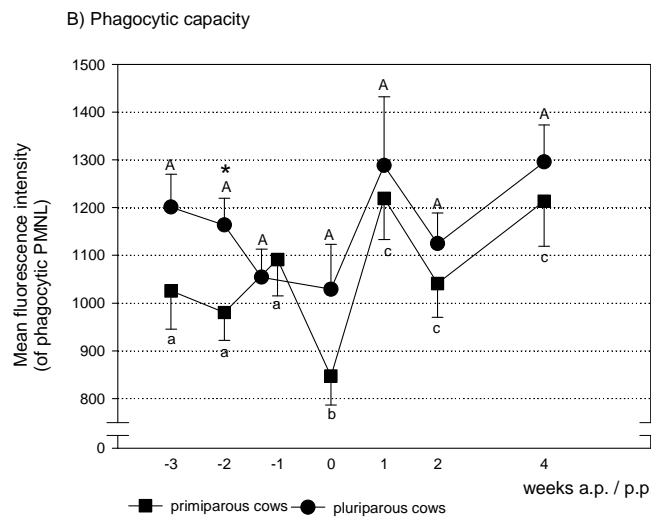
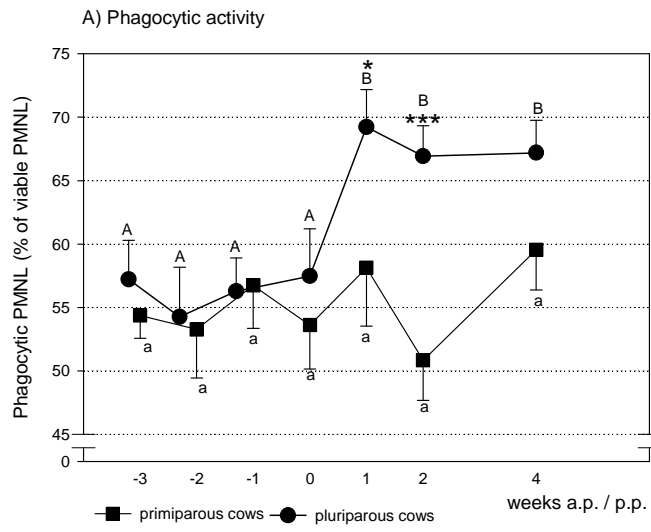


Fig. 3

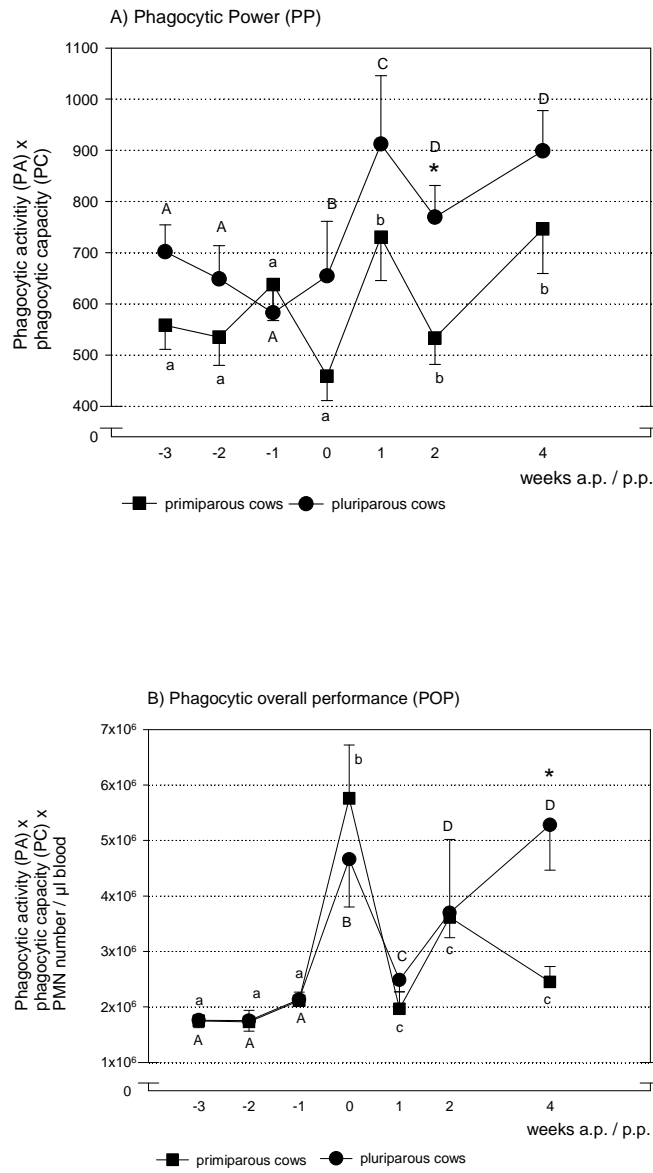


Fig. 4

Table 1: Number of clinically healthy primiparous and pluriparous cows during the transition period

wk	primiparous cows (n)	pluriparous cows (n)
-3	17	37
-2	18	40
-1	17	39
0	18	41
1	14	30
2	16	33
4	17	35

References

- Balteskard, L., K. Unneberg, D. Halvorsen, J.B. Hansen, A. Revhaug. 1998. Effects of insulin-like growth factor 1 on neutrophil and monocyte functions in normal and septic states. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 22:127-135.
- Bell, A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73:2804-2819.
- Bjerknes, R., D. Aarskog. 1995. Priming of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes by insulin-like growth factor I: increased phagocytic capacity, complement receptor expression, degranulation, and oxidative burst. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:1948-1955.
- Boisclair, Y.R., D.E. Bauman, A.W. Bell, F.R. Dunshea, M. Harkins. 1994. Nutrient utilization and protein turnover in the hindlimb of cattle treated with bovine somatotropin. *J. Nutr.* 124:664-673.
- Burvenich, C., D.D. Bannerman, J.D. Lippolis, L. Peelman, B.J. Nonnecke, M.E. Jr. Kehrl, M.J. Paape. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J. Dairy Sci.* 90(Suppl. 1):E39-54.
- Denley, A., L.J. Cosgrove, G.W. Booker, J.C. Wallace, B.E. Forbes. 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:421-439.
- Fu, Y.K., S. Arkins, B.S. Wang, K.W. Kelley. 1991. A novel role of growth hormone and insulin-like growth factor-I. Priming neutrophils for superoxide anion secretion. *J. Immunol.* 146:1602-1608.
- Hammon, D.S., I.M. Evjen, T.R. Dhiman, J.P. Goff, J.L. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113:21-29.
- Hoeben, D., E. Monfardini, G. Opsomer, C. Burvenich, H. Dosogne, A. De Kruif, J.F. Beckers. 2000. Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *J. Dairy Res.* 67:249-259.

- Inoue, T., H. Saito, T. Matsuda, K. Fukatsu, I. Han, S. Furukawa, S. Ikeda, T. Muto. 1998. Growth hormone and insulin-like growth factor I augment bactericidal capacity of human polymorphonuclear neutrophils. *Shock* 10:278-284.
- Kawashima, C., S. Fukihara, M. Maeda, E. Kaneko, C.A. Montoya, M. Matsui, T. Shimizu, N. Matsunaga, K. Kida, Y. Miyake, D. Schams, A. Miyamoto. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133:155-163.
- Kehrli, M.E., B.J. Nonnecke, J. A. Roth. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50:207-214.
- Kooijman, R., A. Coppens, E. Hooghe-Peters. 2002. Igf-I inhibits spontaneous apoptosis in human granulocytes. *Endocrinology* 143:1206-1212.
- Lucy, M.C.. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1635-1647.
- Madsen, S.A., P.S. Weber, J.L. Burton. 2002. Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86:159-175.
- Mallard, B.A., Wagter, L.C., Ireland, M.J., Dekkers, J.C., 1997, Effects of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and cortisol on periparturient antibody response profiles of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 61-76.
- Mehrzaad, J., L. Duchateau, C. Burvenich. 2009. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. *Vet. Microbiol.* 134:106-112.
- Mehrzaad, J., L. Duchateau, S. Pyorala, C. Burvenich, 2002. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J. Dairy Sci.* 85:3268-3276.

- Piepers, S., G. Opsomer, E. Meyer, K. Demeyere, H.W. Barkema, A. de Kruif, S. De Vliegher. 2009. Heifer and quarter characteristics associated with periparturient blood and milk neutrophil apoptosis in healthy heifers and in heifers with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 92:4330-4339.
- Sheldon, I.M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio, H.J. Schuberth. 2009. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biol. Reprod.*
- Smits, E., C. Burvenich, R. Heyneman. 1997. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56:259-269.
- Taylor, V.J., Z. Cheng, P.G. Pushpakumara, D.E. Beever, D.C. Wathes. 2004. Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. *Vet. Rec.* 155:583-588.
- Van Kampen, C., B.A. Mallard, 1997. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59:79-91.
- Wathes, D.C., Z. Cheng, W. Chowdhury, M.A. Fenwick, R. Fitzpatrick, D.G. Morris, J. Patton, J.J. Murphy. 2009. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol. Genomics* 39:1-13.
- Wegner, T.N., J.D. Schuh, F.E. Nelson, G.H. Stott. 1976. Effect of stress on blood leucocyte and milk somatic cell counts in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 59:949-956.
- Zerbe, H., N. Schneider, W. Leibold, T. Wensing, T.A. Kruip, H.J. Schuberth. 2000. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54:771-786.
- Zhao, J., N. Harada, K. Sobue, H. Katsuya, K. Okajima. 2009. Insulin-like growth factor-I reduces stress-induced gastric mucosal injury by inhibiting neutrophil activation in mice. *Res.* 19:136-145.

Publikation 2:

Calculation of the risk for postpartal diseases in dairy cows by blood parameters measured ante partum

A. K. Sander*, M. Piechotta*, H. J. Schuberth[†], M. Kaske*

* Clinic for Cattle, University of Veterinary Medicine, Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

† Immunology Unit, University of Veterinary Medicine, Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

1.) Corresponding author

Prof. Dr. Martin Kaske, Clinic for cattle, University of Veterinary Medicine, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover

Tel. ++49 511 856 7309, Fax ++49 511 856 7693

e-mail: martin.kaske@tiho-hannover.de

Early detection of cows endangered to develop a production disease during the transition period is crucial for dairy farmers to improve animal welfare and economics. Measurement of IGF-I concentrations two weeks before calving was proven to be a reliable tool to identify cows suffering from a production disease during the first three weeks of lactation.

2.1 Abstract

Peripartal production diseases occur frequently in dairy cows and result in high economic losses. Early recognition of cows at risk for peripartal health problems is crucial to improve herd health. The objective of this study was to investigate the options to predict the risk of postpartal production disease (ketosis, displacement of abomasum, retentio secundinarum, metritis, mastitis, hypocalcaemia) by antepartal

assessment of metabolic and endocrinological key parameters (BHBA, NEFA, total bilirubin, cholesterol, glucose, IGF-I, cortisol, insulin).

Blood was collected from 41 pluriparous cows and 18 primiparous heifers ante partum [a. p., wk -6, -4, -3, -2, -1], at the day of calving and post partum [p. p., wk 1, 2, 4, 8, 16]. Health status of the cows after calving was assessed systematically daily throughout 3 wk after calving; 25 cows (66 %) and 6 heifers (33 %) suffered from one or several production diseases (retained placenta, hypocalcemia, metritis, mastitis, ketosis, abomasal displacement) in this respective period.

In primiparous heifers antepartal differences between subsequently clinically healthy and diseased cows were exclusively found for IGF-I levels. Ante partum, plasma levels of IGF-I declined linearly until calving. Plasma IGF-I was significantly lower in pluriparous cows diseased subsequently compared to cows remaining clinically healthy; a cutoff of 100 ng/mL in wk -2 was found to differentiate most reliably between cows either healthy or diseased post partum (sensitivity 0.79, specificity 0.68). In pluriparous cows, serum concentrations of NEFA were significantly higher in wk -6, -4, -3 and BHBA serum concentration was significantly higher in wk -2 comparing cows either clinically healthy or suffering from ketosis and/or LDA post partum. It is concluded that IGF-I levels in wk -2 allow identifying the risk for subsequent unspecific production diseases. High NEFA-concentrations in wk -2 (> 600 $\mu\text{mol/L}$) were indicative for later metabolic disorders such as ketosis and/or LDA but were inappropriate to estimate the risk of any other production disease.

Key words: production disease, risk assessment, transition period, IGF-I, NEFA

2.2 Introduction

A successful transition from late pregnancy to early lactation is crucial for animal health, productivity and fertility (Grant and Albright, 1995; Drackley, 1999) and plays a key role for the economical output of dairy farms. The transition period requires several endocrine and metabolic adaptation mechanisms to facilitate distribution of nutrients towards fetal growth and milk synthesis (Bell, 1995; Grummer et al., 2004).

As increase of feed intake lags behind those of milk production in early lactation (Ingvartsen and Andersen, 2000; Ingvartsen et al., 2003; Mulligan and Doherty, 2008) a negative energy balance (NEB) is a common finding in high-yielding dairy cows during the first weeks of lactation. NEB represents a risk factor for increased susceptibility of dairy cows to infections and, in addition, for a variety of non-infectious production diseases (Grummer et al., 2004). The individual ability of cows to cope with a NEB by adaptations of homeostatic and homeorhetic regulation mechanisms varies, however, considerably (Herdt, 2000; Kaske et al., 2005; Kessel et al., 2008). These metabolic and endocrine adaptation mechanisms occur already before calving and are reflected by changes of antepartal metabolic key parameters (such as BHBA, cholesterol, total bilirubin, glucose, NEFA) as well as hormones involved in metabolic regulation (such as insulin, cortisol, and IGF-I). Especially the latter has been reported as a sensitive signal between metabolism, NEB and reproduction (Konigsson et al., 2008). The time sequence and magnitude of antepartal changes depends on dry matter intake, energy density of the ration fed, environmental stressors and individual factors (Grummer, 1993).

Simple blood sampling ante partum to identify cows at a high risk to suffer from postpartal production diseases may be one promising approach to optimize herd health by preventive and/or curative treatments as early as possible. For example, elevated NEFA serum concentrations (> 0.7 mM) during the last week before calving have been proven to indicate a fivefold increased risk for ketosis post partum (Duffield, 2004). It is unclear, however, whether further or even more appropriate

blood parameters can be used as predictors for subsequent production diseases in dairy cows in early lactation.

Thus, the objective of this study was to determine metabolic and hormonal blood parameters before and after calving in order to assess the most appropriate parameter and point of time to differentiate between cows remaining either clinically healthy or developing a production disease during the first three weeks after calving.

2.3 Materials and Methods

Animals and Management

A total of 59 dairy cows of the Hannover University Farm (48 Holstein Friesian [HF], 11 crossbreds of Brown-Swiss x HF) were included in the study, which was approved and in accordance with German legislation on animal rights and welfare (AZ 33.9-42502-04-08/1592).

All pluriparous cows were dried off approximately six weeks before the predicted calving date and were grouped together with the primiparous cows in a cubicle housing system fitted with slatted floor. Dry cows were fed a grass silage based partly mixed ration (PMR) blended with 5% chopped straw. About two to one weeks before the predicted calving day cows were grouped in the transition area and fed the PMR prepared for fresh cows. Additionally, cows got thrice daily 1 kg concentrate. Feeding places exceeded number of cows markedly in the transition area while for dry and lactating cows number of feeding places was 10 % lower than the number of cubicles. As soon as onset of calving was noticed, cows were transferred into straw-bedded maternity pens. Calving was uncomplicated in almost all cases; at least moderate obstetrical assistance was applied. Immediately after calving, cows were returned to the herd. After calving, the primiparous (18 HF, 2.2 ± 0.1 yr) and pluriparous cows (30 HF 11 Brown-Swiss x HF; 2nd – 5th lactation, 4.6 ± 1.4 yr) were housed either in a straw yard and milked in a milking parlour twice a day or in cubicle housing system fitted with slatted floors and milked by a milking robot. All lactating cows were fed a PMR (47.9 % corn silage, 39.7 % grass silage, 9.9 % soy, 2.5 % sugar beet crop) providing 6.9 MJ NEL/kg.

The PMR was formulated on the basis of a milk yield of 23 kg / d and was intended to provide ad libitum intake. Cows producing more than 23 kg / d were fed additionally concentrate in feeding stations (0.5 kg/kg milk).

Blood Sampling

Blood was collected once weekly on the same day between 06:00 and 10:00 A.M. in week [wk] -6, -4, -3, -2, -1 before the calculated day of calving, at the day of calving within 10 min after expulsion of the calf (wk 0) and in wk 1, 2, 4, 8, 16 wk after calving.

Samples from each cow were collected into 3 different tubes containing fluoride, potassium-EDTA or no anticoagulant (Sarstedt, Nürnberg, Germany) by jugular venipuncture using a 17-gauge needle. Samples were put on ice within 30 min and centrifuged (2000 x g, 4 °C). EDTA plasma samples for hormone analyses were kept frozen at -20°C until analyzed. Fluoride and serum samples were examined on the same day. Metabolic parameters (NEFA, BHBA, cholesterol and total bilirubin) were determined in serum except glucose, which was determined in fluoride plasma. The concentrations of all metabolic parameters were analyzed using a clinical chemistry benchtop analyzer (Pentra 400, Biotech, Basel); calibration and quality controls were done daily. Hormone profiles (cortisol, IGF-I, insulin) were analysed from EDTA-plasma.

Body condition score was assessed always by the same person (A. S.) after blood sampling.

Definition of clinical diseases

Each cow was presented to a veterinarian as soon as (a) milk yield was reduced by 20% compared to average milk yield of the last three days, (b) less than 70 % of the computed concentrate intake was consumed, (c) farm personnel became aware of any remarkable further sign of an impaired health status.

Respective cows were clinically investigated according to a fixed routine schedule (Rosenberger, 1991). Based on the results, the following clinical syndromes were differentiated:

Ketosis / LDA [K/DA]

Cows were classified as clinically ketotic if concentrate intake and/or milk yield were reduced, nitroprusside test for ketone bodies in urine was clearly positive (+++) and other diseases were not diagnosed (except a left-sided displacement of the abomasums [DA]). LDA was diagnosed by swinging auscultation and percussion in the left flank.

Hypocalcaemia [HC]

Cows were considered to be clinically hypocalcaemic if one or more of the following symptoms were found: tremor, cool body surface, gate instability, ataxia, recumbancy. Essential condition for diagnosis was a significant improvement of the clinical status directly after calcium infusion (10 g calcium as calcium borogluconate 25 %).

Retained fetal membranes / Metritis [RFM/M]

Retained placenta was diagnosed if fetal membranes were not successfully expelled within 12 hours after calving. Clinically metritis was defined by an abnormous vaginal discharge together with a flaccid uterus with fluctuation as detected by rectal palpation and verified by sonographic investigation.

Mastitis [MA]

Clinical mastitis was defined by a drastically elevated cell count detected by California mastitis test (+++) and/or either fibrin or pus clots in the milk, and a disturbance of general condition without further diagnoses.

All animals, which developed a production disease (ketosis, displacement of abomasums, metritis, Ret. sec., hypocalcaemia, mastitis) within the first three weeks of lactation (cows n=25, heifers n=6) were assigned to group Production Disease [PD].

Primiparous and pluriparous cows which were healthy within the first three weeks of lactation (cows n=16, heifers n=12) were assigned to group Healthy **[H]**.

Moreover, a group with diseased pluriparous cows except ketosis was built (n=19) **[PDEK]**.

Treatment of the cows was carried out using routine protocols.

One cow (535) was found lying dead in a cubicle in the morning of the third day after calving without any preceding signs indicating a clinical disease. Necropsy was performed but did not reveal a pathological diagnosis explaining the fatality. For the analysis of results, this cow was assigned as diseased without concrete diagnosis.

Table 1

Incidence of specific production diseases in heifers [H] and pluriparous cows [C] during the first three weeks of lactation. Diseases are listed in the table as follows: retained fetal membranes [RFM], metritis [M], hypocalcaemia [HC], ketosis [K], left displacement of the abomasums [DA], and mastitis [MA].

Cow	H / C	RFM	M	HC	K	DA	MA
465	C	X		X			X
541	C	X					
535 ¹	C						
556	C	X					
558	C			X			
565	C			X			
580	C	X					
587	C						X
588	C				X		
590	C		X				X
614	C			X			
617	C			X	X		X
623	C			X			
643	C			X	X	X	
654	C						X
661	C		X		X		
674	C	X					
678	C			X	X	X	
681	C	X					
695	C		X	X			
698	C						X
704	C	X					
715	C		X	X			
719	C				X	X	X
723	C		X				
739	H						X
753	H						X
755	H		X				
757	H						X
766	H		X				
767	H		X				

¹Cow number 535 died three days after calving.

Determination of IGF-I plasma concentrations

To assess the plasma concentration of total IGF-I, an ACTIVE Insulin-Like Growth Factor-I Coated Tube IRMA Kit (DSL-5600, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA) was used. Briefly, IGF-I was separated from its binding proteins by using an acid-ethanol extraction procedure and the concentrations were determined with a two-site immunoradiometric assay principle. The intra-assay coefficient of variation (CV %) was 1.5-3.5% and the inter-assay CV % was 1.5–8.5%.

Determination of cortisol plasma concentrations

Cortisol was determined using the Immulite system (Siemens Diagnostic, Deerfield, USA). The intra-assay CV % was 6.3-10.0% and the inter-assay CV % was 5.8-8.8%.

Determination of insulin plasma concentrations

An insulin radioimmunoassay was used (DSL-1600, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA). The intra-assay coefficient of variation (CV %) was 6.3 % and the inter-assay CV was 8.8%.

Tab. 2

Methods used to determine concentrations of total bilirubin, cholesterol, NEFA, and BHBA in serum, and glucose in fluoride plasma and the respective test reliability; CV – coefficient of variation.

Parameter	Method	Producer	CV [%]
Total Bilirubin	Jendrassik and Grof	Lehmann ¹ ART.LT-BR 0500	2,1
Cholesterol	Enzymatic colorimetric test	Mti ² Art. 553-124	2,0
Glucose	Hexokinase	ABX ³ ART. A11A00116	2,3
NEFA	Enzymatic colorimetric test	WAKO ⁴ ART. 999-75406	6,2
BHBA	Enzymatic UV- test	RANDOX ⁵ ART. RB 1007	7,1

¹ Labor + Technik, Eberhard Lehmann, Berlin, Germany

² mti diagnostics GmbH, Idstein, Germany

³ ABX Diagnostics, Montpellier, France

⁴ WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Germany

⁵ Randox Laboratories GmbH, Krefeld, Germany

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, Los Angeles) and $P < 0.05$ was considered to be significant. The Kolmogorov-Smirnov test was used to check whether results differed from a normal distribution. ANOVA and students' T-tests were used to identify differences between primiparous and pluriparous cows, healthy and diseased cows, and between weeks of the transition period. If data were found to differ significantly from a normal distribution, the rank sum test as a non-parametric test was used. Correlations between results of different weeks were tested using the Pearson product moment and the Spearman rank order test, respectively. Data are presented as means and standard errors.

2.4 Results

Comparison of blood parameters between primiparous heifers and pluriparous cows

For most parameters assessed, significant differences were found between pluriparous cows and primiparous heifers. In wk -1 and at time of calving (wk 0), serum concentrations of total bilirubin were significantly higher in pluriparous (n = 41) compared to primiparous cows (n = 18) ($p = 0.032$, $p = 0.005$). Accordingly, serum levels of BHBA were higher in pluriparous cows compared to primiparous cows in wk -6 ($p < 0.001$), wk -4 ($p = 0.007$), wk -2 ($p = 0.004$), and wk -1 ($p = 0.015$). Serum levels of NEFA were higher in pluriparous cows than in heifers only in wk -1 ($p = 0.002$); for serum levels of cholesterol a significant difference was found for wk - 6 ($p < 0.001$) and wk -4 ($p = 0.037$). Plasma glucose was 10% lower in pluriparous cows compared to heifers in wk -1 and 20% lower at time of calving ($p = 0.011$); this was accompanied by lower insulin concentrations (wk -1, $p = 0.004$, wk 0 $p = 0.003$) as well as IGF-I concentrations at time of calving ($p < 0.001$) (Fig.10).

No differences were obvious for glucagon and cortisol concentrations between primiparous and pluriparous cows ante partum.

Incidence of production diseases

61% of the pluriparous cows (25/41) and 33% of the primiparous heifers (6/18) developed at least one production disease in the first three weeks of lactation. In respect to the diseased pluriparous cows, 64% suffered from one, 16% from two, and 20% from three production diseases within three weeks after calving (Tab. 1).

Peripartal changes of blood parameters

Serum cholesterol concentrations decreased ante partum and were lowest at time of calving in all groups (Fig. 2). After calving, there was a continuous increase of cholesterol concentrations. Post partum, there was a tendency for lower concentrations in PD-cows compared to healthy cows. K/DA- and HC-cows tended to have lower concentrations during the whole period of investigation.

Plasma concentrations of glucose remained constant before and after calving. In all cows there was a significant peak at time of calving.

Plasma concentrations of IGF-I showed a considerably decrease before calving. Lowest concentrations were found at time of calving (K/DA, MA, RFM/M) or in wk +1 (PD, HC). After calving, there was a slight increase of IGF-I concentrations. There was a tendency obvious that pluriparous cows developing a disease, had lower IGF-I levels ante partum compared to clinically healthy ones (Fig. 3). From time of calving until wk +16, primiparous cows had significant higher concentrations than pluriparous cows ($p < 0.001$, wk +4 $p = 0.018$, wk +8 $p = 0.015$).

In H-cows, NEFA serum concentrations remained constant ante partum. In all other groups, NEFA levels increased between wk -6 and wk -3/ -2 (Fig. 4). There was a significant decrease in NEFA concentrations between wk -2 and wk -1 group PD- and PDEK-cows ($p < 0.01$) (Fig. 9); in K/DA-cows this decrease was only a statistical trend ($p = 0.09$). Peak NEFA concentrations were found at time of calving in all groups, followed by a slight decrease during the following weeks. Highest concentrations were found in K/DA-cows with K/DA (mean concentration ante partum 630 $\mu\text{mol/L}$ vs. 225 $\mu\text{mol/L}$ [H]) (Fig. 7). Peak concentrations of clinically healthy and diseased primiparous heifers did not differ. There was a statistical trend that PD-cows had higher NEFA concentrations a. p. (380 $\mu\text{mol/L}$) compared to H-cows (225 $\mu\text{mol/L}$) (Fig. 3).

Ante partum, highest serum levels of total bilirubin were found in K/DA -cows (peak in wk -3: 7.7 $\mu\text{mol/L}$) compared to the other groups (Fig. 5). Mean concentrations ante partum were higher in PD-cows (6.4 $\mu\text{mol/L}$) compared to H-cows (3.5 $\mu\text{mol/L}$) (Fig. 1). Peak concentrations were found at time of calving except in MA-cows (wk +2). There were significant differences in total bilirubin concentrations a. p. between H- and PD-cows ($p < 0.05$) and in particular in K/DA and H cows ($p = 0.05$ to $p < 0.001$).

Serum BHBA concentrations were almost constant ante partum. Highest concentrations were found in pluriparous cows with K/DA. Peak concentrations were found in wk +1 in group PD and K/DA, whereas in healthy cows (H), peak concentration was found in wk +2.

Concentrations of antepartal blood parameters in pluriparous and primiparous cows with or without clinical production disease during the first three weeks of lactation

Pluriparous cows

Cows that suffered from a PD ($n = 25$) exhibited significantly BHBA serum levels in wk -2 ($p = 0.042$), NEFA serum levels in wk -6 ($p = 0.029$), -4 ($p = 0.004$), and wk -3 ($p = 0.029$) (Fig. 4), and serum levels of total bilirubin in wk -6 ($p = 0.047$), -3 ($p = 0.028$), -2 ($p = 0.015$), and 0 ($p = 0.026$) compared to clinically healthy cows ($n = 16$) (Fig. 1). IGF-I concentrations were significantly lower in cows that suffered from a PD in wk -6 ($p = 0.017$), -3 ($p = 0.022$), and wk -2 ($p = 0.003$) compared to clinically healthy cows (Fig. 3).

Primiparous cows

IGF-I concentrations were significantly higher in clinically healthy primiparous cows ($n = 12$) compared to primiparous cows that suffered from a PD ($n = 6$) ($p = 0.039$).

There were no differences in primiparous or pluriparous cows between the groups PD and H in levels of cholesterol, glucose, cortisol, and insulin ante partum.

Differences in blood parameters between pluriparous cows suffering from a ketosis and/or left displacement of abomasums [K/DA] compared to clinically healthy cows [H] ante partum and at time of calving

K/DA cows (n = 6) exhibited H cows (n = 16) significantly in serum levels of total bilirubin in wk -6 (p = 0.035), -4 (p < 0.001), -3 (p < 0.001), -2 (p < 0.001), -1 (p = 0.004), and at time of calving (p = 0.003), in serum levels of NEFA in wk -6 (p = 0.024), -4 (p < 0.001), -3 (p < 0.001), -2 (p < 0.001), and at time of calving (p = 0.043) (Fig. 9), and in serum levels of BHBA in wk -3 (p = 0.006), -2 (p = 0.004) and at time of calving (p = 0.03), in wk -1 a statistical tendency was seen (p = 0.06).

There was a statistical tendency that clinically healthy cows had higher plasma concentrations of IGF-I in wk -2 (p = 0.051) and in wk -1 (p = 0.10) compared to K/DA cows (Fig. 8).

Differences in blood parameters regarding cows suffering from a production disease except ketosis (hypocalcaemia, retained fetal membranes, metritis, mastitis) in contrast to healthy cows ante partum and at time of calving

IGF-I concentrations were significantly higher in [H] cows (n = 16) in wk -6 (p = 0.006), -3 (p = 0.04), and -2 (p = 0.007), (wk 0, p=0.10), compared to PDEK cows (n = 19) (Fig. 8).

Differences in blood parameters regarding cows suffering from a production disease except ketosis (hypocalcaemia, retained fetal membranes, metritis, mastitis) in contrast to ketotic cows ante partum and at time of calving

K/DA cows (n = 6) exhibited PDEK cows (n = 19) significantly in serum levels of NEFA in wk -4 (p = 0.01), -3 (p < 0.001) and wk -2 (p < 0.001) (Fig. 9), in serum levels of total bilirubin in wk -4 (p = 0.007), -3 (p = 0.007), -2 (p = 0.006), wk -1 (p = 0.01) and at time of calving (p = 0.03), and in serum levels of BHBA in wk -1 (p =

0.03) and at calving ($p = 0.04$). There were no differences in IGF-I levels between these two groups.

Differences in blood parameters regarding cows suffering from a hypocalcaemia in contrast to healthy cows ante partum and at time of calving

Six of ten cows with HC developed a second production disease (metritis, $n = 3$, ketosis, $n = 3$) during the first three weeks of lactation.

HC cows ($n = 10$) exhibited clinically healthy cows ($n = 16$) significantly in serum concentrations of total bilirubin in wk -3 ($p = 0.03$), -2 ($p = 0.01$), -1 ($p = 0.006$) and at time of calving ($p = 0.03$), and in serum concentrations of NEFA in wk -4 ($p = 0.012$) and wk -2 ($p = 0.033$).

Plasma IGF-I concentrations were significantly lower in HC cows in wk -2 ($p = 0.02$) and at time of calving ($p = 0.01$) compared to clinically healthy cows.

Correlations of individually blood parameters among different weeks in primiparous and pluriparous cows independent from health status

In cows BHBA concentrations correlated only slightly. No correlation in BHBA concentrations was found in heifers.

There were high significant correlations of cholesterol concentrations ante partum, ante partum with calving, calving with postpartum, post partum and ante partum versus post partum in primiparous and pluriparous cows. With few exceptions p-value was < 0.001 .

Glucose concentrations did not correlate in primiparous or pluriparous cows.

IGF-I concentrations in pluriparous cows correlated considerably ante partum ($p < 0.001$ - $p = 0.02$), as well as concentrations of calving correlated with postpartal weeks ($p = 0.006$ - $p = 0.03$). Moreover, IGF-I concentrations in cows correlated

considerably post partum ($p < 0.001$ - $p = 0.03$), but no correlations were found in comparison of antepartal and postpartal weeks. In primiparous cows IGF-I concentrations correlated considerably only ante partum ($p < 0.001$ - $p = 0.01$).

NEFA concentrations in pluriparous cows correlated highly significant ante partum ($p < 0.01$ - $p < 0.001$) and slightly post partum. Antepartal concentrations correlated with concentrations of calving ($p < 0.001$ to $p = 0.3$), concentrations of calving correlated with postpartal concentrations ($p < 0.001$ to $p = 0.04$) There were no correlations between antepartal and postpartal concentrations. There were no correlations in NEFA concentrations post partum in primiparous cows.

In pluriparous cows there were slight correlations in concentrations of total bilirubin ante partum, and ante partum versus calving, as well as calving versus post partum, post partum and ante partum versus post partum. Total bilirubin concentrations of different wks did not correlate in primiparous cows.

There were slight correlations of insulin concentrations ante partum, post partum and ante partum versus post partum in pluriparous ($p < 0.5$ - < 0.001), but not in primiparous cows.

Tab. 3: Correlations between concentrations of blood parameters assessed in different weeks ante partum (wk -6, -4, -3, -2, -1, i.e. 10 combinations tested), at calving (wk 0; i.e. 5 combinations a.p., 5 combinations p.p.), post partum (wk 1, 2, 4, 8, 16; i.e. 10 combinations tested), and a.p. versus p.p. (25 combinations tested) in primiparous heifers (H) and pluriparous cows (C) irrespective of health status. P: proportion of statistical significant correlations ($p < 0.05$) of all correlations tested. R: range of correlation coefficients (minimal and maximal values).

		a.p.		a.p. vs. calving		calving vs. p.p.		p.p.		a.p. vs. p.p.	
		P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
BHBA	H	1/10	0.63	0/5		0/5		0/10		0/25	
	C	3/10	0.33-0.48	2/5	0.37-0.52	1/5	0.51	4/10	-0.41/ 0.43	1/25	0.42
Bilirubin	H	0/10		0/5		1/5	0.62	1/10	0.56	0/25	
	C	3/10	0.36-0.47	3/5	0.41-0.65	2/5	0.38-0.47	5/10	0.34-0.66	4/25	0.38-0.47
Cholesterol	H	8/10	0.54-0.91	5/5	0.54-0.91	5/5	0.60-0.79	10/10	0.59-0.91	19/25	0.49-0.79
	C	10/10	0.62-0.95	5/5	0.53-0.71	5/5	0.42-0.62	8/10	0.50-0.87	22/25	0.36-0.59
Glucose	H	1/10	0.56	0/5		1/5	0.55	0/10		2/25	-0.56/ 0.53
	C	0/10		0/5		0/5		2/10	-0.46-0.34	2/25	0.41-0.50
IGF-I	H	8/10	0.62-0.95	1/5	0.5	2/5	0.49-0.53	2/10	0.65-0.83	2/25	0.52-0.59
	C	8/10	0.33-0.7	1/5	0.34	3/5	0.34-0.43	7/10	0.37-0.62	1/25	0.45
Insulin	H	2/10	0.67-0.78	0/5		2/5	0.60-0.61	4/10	0.48-0.64	2/25	0.68-0.71
	C	3/10	0.47-0.52	1/5	0.38	2/5	0.40-0.54	6/10	0.34-0.58	8/25	0.36-0.67
NEFA	H	0/10		1/5	0.51	0/5		4/10	0.49-0.65	1/25	0.64
	C	7/10	0.45-0.75	4/5	0.35-0.57	3/5	0.33-0.64	2/10	0.59	4/25	0.37-0.70

Correlation of different blood parameters in primiparous and pluriparous cows irrespective of health status

Bilirubin-NEFA

In pluriparous cows, there were highly significant correlations between total bilirubin and NEFA concentrations ante partum ($p < 0.001$ to $p = 0.03$), post partum ($p < 0.001$ to $p = 0.01$) and at calving ($p < .001$). There were no correlations between antepartal and postpartal concentrations.

Tab. 4: Correlations between concentrations of different blood parameters assessed in different weeks ante partum (wk -6, -4, -3, -2, -1, i.e. 25 combinations tested), at calving (wk 0; i.e. 10 combinations) and post partum (wk 1, 2, 4, 8, 16; i.e. 25 combinations tested) in primiparous heifers (H) and pluriparous cows (C) irrespective of health status. P: proportion of statistical significant correlations ($p < 0.05$) of all correlations tested. R: range of correlation coefficients (minimal and maximal values).

		a.p.		a.p. vs. calving		calving vs. p.p.		p.p.		a.p. vs. p.p.		calving	
		P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
Bilirubin vs. NEFA	H	4/25	0.54-0.76	0/10		1/10	0.66	3/25	0.49-0.78	1/50	0.53	1/1	0.70
	C	15/25	0.34-0.86	5/10	0.36-0.77	5/10	0.34-0.77	12/25	0.42-0.79	7/50	0.36-0.57	1/1	0.78
Cholest. vs. NEFA	H	0/25		0/10		0/10		2/25	-0.48-0.50	0/50		0/1	
	C	3/25	0.36-0.39	0/10		4/10	-0.46-0.34	4/25	-0.47-0.37	6/50	-0.60-0.33	0/1	
Cholest. vs. IGF-I	H	0/25		0/10		1/10	0.63	2/25	0.49-0.53	8/50	-0.51-0.63	0/1	
	C	1/25	0.34	2/10	0.34-0.37	5/10	0.34-0.51	2/25	0.35-0.45	4/50	0.35-0.40	0/1	
IGF-I vs. NEFA	H	1/25	-0.6	0/10		0/10		6/25	-0.67-0.48	0/50		0/1	
	C	4/25	-0.45-0.35	0/10		1/10	0.51	6/25	-0.43	3/50	-0.41-0.53	0/1	
Insulin vs. Gluc.	H	2/25	-0.52-0.52	1/10	-0.53	0/10		2/25	-0.74-0.57	3/50	-0.74-0.53	0/1	
	C	1/25	-0.41	1/10	0.4	1/10	0.36	3/25	0.35-0.53	1/50	0.53	0/1	
Insulin vs. IGF-I	H	5/25	0.50-0.78	1/10	0.53	0/10		2/25	0.55-0.56	3/50	0.49-0.54	1/1	0.49
	C	4/24	0.35-0.43	2/10	0.38-0.44	2/10	0.34-0.53	3/25	0.40-0.46	0/50		0/1	

Test characteristics

Sensitivity, Specificity, positive [+PV] / negative predictive value [-PV]

Tab. 5

Sensitivity, specificity, positive, and negative predictive value computed from serum or plasma concentrations of total bilirubin, NEFA, and IGF-I in PD and H cows in wk -2.

	Sensitivity	Specificity	+ PV	- PV	Threshold	YoudenIndex
Bilirubin	0.75	0.69	0.78	0.65	3.65 µmol/l	0.44
NEFA	1	0.25	0.68	0.58	100 µmol/l	0.25
IGF-I	0.79	0.68	0.79	0.68	100 ng/ml	0.47

Tab. 6

Sensitivity, specificity, positive, and negative predictive value computed from serum or plasma concentrations of total bilirubin, NEFA, and IGF-I in K/DA and H cows in wk -2.

	Sensitivity	Specificity	+ PV	- PV	Threshold	Youden Index
Bilirubin	1	0.75	0.6	1	4.75 µmol/l	0.75
NEFA	0.83	0.94	0.83	0.94	550 µmol/l	0.77
IGF-I	0.83	0.75	0.56	0.92	70 ng/ml	0.58

Tab. 7

Sensitivity, specificity, positive, and negative predictive value computed from serum or plasma concentrations of total bilirubin, NEFA, and IGF-I in H-cows and PDEK-cows in wk -2

	Sensitivity	Specificity	+ PV	- PV	Threshold	Youden Index
Bilirubin	0.67	0.69	0.71	0.65	3.75 µmol/l	0.36
NEFA	1.00	0.25	0.60	1	100 µmol/l	0.25
IGF-I	0.78	0.69	0.74	0.73	100 ng/ml	0.47

Body condition scoring

No significant differences were found between the BCS neither of primiparous and pluriparous cows, nor between cows with or without production disease during the period tested. In respect to groups with specific production diseases, only one significant difference was found between H-cows (3.2 ± 0.4) and K/DA-cows in wk-6 (3.6 ± 0.5 ; $p = 0.049$).

Table 8: BCS \pm SEM of heifers and cows two weeks before calving. Cows are grouped according to the number of different diagnoses during the first three weeks of lactation.

number of different diagnoses		number of affected cows / total number	percentage of affected cows	BCS \pm SEM
0	heifers	12/18	66.6	3.54 ± 0.08
	cows	17/41	41.5	3.43 ± 0.09
1	heifers	6/18	33.3	3.33 ± 0.19
	cows	14/41	34.1	3.27 ± 0.14
2	heifers	0/18	0	
	cows	4/41	9.8	3.56 ± 0.21
3	heifers	0/18	0	
	cows	6/41	14.6	3.50 ± 0.13

Correlations of blood parameters and milk yield (21d/100d)

For almost all parameters assessed, no significant correlations were found between their concentration and milk yield either in the respective wk (a. p. as well as p.p.) or during the first 21 days of lactation or the first 100 days of lactation. The almost exclusive difference was the daily milk yield in wk +2 comparing H-cows (34.8 ± 7.8 kg/d) and K/DA-cows (25.4 ± 7.1 kg/d; $p = 0.01$).

2.5 Discussion

The objective of this study was to determine the most appropriate antepartal blood parameter for determining the risk of postpartal diseases in dairy cows. Therefore the health status of primiparous and pluriparous cows was consistently assessed during the peripartal period in this study. Weekly blood sampling and daily clinical investigation ensured a defined recognition of ante- and postpartal diseases in the study population. Determination of health status and treatment followed accurately defined pattern. Overall, a high incidence of production diseases was found in agreement with the literature (Fleischer et al. 2001; Reist et al., 2003). Thus, the power analysis revealed a sufficient number of animals per group to investigate seriously the objectives of the study.

Differences between primiparous and pluriparous cows

Antepartal measured blood parameters of primiparous heifers and pluriparous cows revealed significant differences for seven of nine parameters. Post partum, pluriparous cows experience a more extensive NEB than heifers (Marquardt et al. 1977). Results of this study show clearly that even antepartal concentrations of BHBA, total bilirubin, and NEFA in pluriparous exceed those of primiparous cows (Fig. 10). These higher concentrations are probably caused by enhanced lipomobilisation and ketogenesis during the last weeks prior to calving. Primiparous cows, by contrast, are still gaining empty body weight; their anabolic metabolic constellation is reflected by lower concentrations of NEFA and BHBA. In agreement with Taylor et al. (2004), IGF-I concentrations were found in this study being significantly higher in heifers than in pluriparous cows at calving and post partum; it remains unclear, however, that no significant differences depending on the lactation number were found before calving.

Higher glucose concentrations in wk -1 and at calving in heifers compared to pluriparous cows seem to reflect a more pronounced stress reaction, which fits nicely to corresponding higher cortisol levels around calving in heifers.

In accordance with others (Bobe et al., 2004), a higher percentage of pluriparous cows (61%) developed a production disease in the present study compared to heifers (33%). Thus, differences in encumbrance or adaptation of metabolism to negative energy balance point up, that production diseases are mainly a problem of pluriparous cows. Only pluriparous cows suffered from ketosis and hypocalcaemia in the present study. This is in agreement with studies which reported an increase of the risk of milk fever by 9% per lactation (Lean et al., 2006).

Above all, only one significant difference in comparison of blood parameters of clinically healthy heifers and heifers developing a production disease during the first three weeks after calving was found ante partum. Except IGF-I concentrations in wk - 1, there was no difference obvious ante partum, between blood concentrations of healthy and postpartal diseased heifers. Thus, the further evaluations were carried out for pluriparous cows exclusively.

Relevance of NEFA as predictive parameter

Regulation and coordination of lipid metabolism play a key role in adaptation to early lactation (Drackley, 1999). Increasing NEFA concentrations indicate an acute energy deficit (Fürl, 1992) and a concomitant mobilization of depot fat as a consequence of NEB (Reist et al., 2003). Moreover, a correlation between NEFA concentration and the incidence of production diseases has been reported previously (Grummer et al., 2004). NEFA concentrations in the last week before calving $> 550 \mu\text{mol/L}$ were accompanied by a 3.6-fold higher risk for development of LDA (LeBlanc et al., 2005). A corresponding result was found in the present study where antepartal NEFA concentrations were higher in K/DA-cows. It has been reported that mean concentrations of NEFA increase already 2 to 1 week before calving (de Boer et al., 1985). The NEFA concentrations of K/DA-cows were, however, already 6 wks before calving increased in the present study. In agreement with de Boer et al. (1985) we found a significant increase of NEFA serum concentrations between wk -1 and calving. In addition, NEFA and bilirubin concentrations were significantly higher ante

partum in HC-cows compared to H-cows. But this finding may also be explained by the fact, that six of ten hypocalcaemic cows developed a second production disease (metritis, $n = 3$, ketosis, $n = 3$) during the first three weeks of lactation. Hypocalcaemia around calving is known as a risk factor for many diseases occurring in the periparturient period (DeGaris and Lean, 2008).

NEFA concentrations were, however, specific indicators for subsequent ketosis/DA in early lactation. Our results are in accordance with this finding excepting time point of measurement. Measurement of NEFA concentration two weeks before calving had a high informative value concerning development of K/DA in this study. Defining a threshold of $550 \mu\text{mol/L}$, NEFA led to a sensitivity of 0.83 and to a specificity of 0.94. An important disadvantage is the fact that NEFA-levels can not be used to identify cows at risk to develop any further PD except K/DA.

There was a significant decrease of NEFA concentration one week before calving in PD- and PDEK-cows ($p < 0.01$), whereas in K/DA cows there was only a slight decrease ($p = 0.09$) (Fig. 9). Also in healthy cows mean NEFA concentration decreased somewhat between wk -2 and wk -1. This unexpected decrease may be explained by the fact that cows were housed in the transition area and got the ratio of high lactating cows preparative to calving from that time point. Additionally, there were higher numbers of feeding places. This demonstrates that increasing NEFA concentrations before calving have not to be considered as irrevocable; instead, management factors seem to have enormous impact.

Relevance of bilirubin as predictive parameter

Mean antepartal serum concentrations of total bilirubin were lowest in cows that kept well in early lactation [H] ($3.5 \mu\text{mol/L}$). Highest concentrations ($6.4 \mu\text{mol/L}$) before calving were found in K/DA-cows, which has to be considered as a well-known side-effect of increased NEFA-levels which compete against bilirubin for the transport system into the hepatocyte.

Correlation of BHBA and NEFA concentrations

Peak concentrations of BHBA lagged somewhat behind those of NEFA indicating that these two parameters do not necessarily correlate in contrast to statements in literature (Roberts et al., 1997). Increased BHBA concentration post partum are known to go along with an increased incidence of infectious diseases after calving (Duffield, 2000, Herdt, 2000). Our results indicate furthermore, that increased concentrations of BHBA are already obvious ante partum for those cows developing a production disease much later in early lactation.

IGF-I around calving and its relevance as predictive parameter

In all cows IGF-I concentrations decreased significantly around calving as described in previous studies (Nikolic et al., 2003, Taylor et al., 2004). Low IGF-I plasma levels in early lactation reflect a profound NEB (Reist et al., 2003); Mc Caffery et al. (2000) reported that IGF-I correlated directly with energy balance. The effects of the diet on circulating concentrations of IGF-I are discussed controversially, i. e. an effect was shown in one study (Roberts et al. 1997) but not by others. Additionally, the magnitude of decline and the time interval required for return of IGF-I levels to antepartal levels was greater in cows subjected to energy restriction (Ryan et al., 1994). Accordingly, dietary restriction seems to uncouple the ability of GH to increase circulating levels of IGF-I (Roberts et al., 1997).

In our study, IGF-I concentrations decreased continuously before calving. In contrast to NEFA, no difference was obvious between wk -2 and wk-1, when cows were housed in the transition area. Hence, there seems to be no influence of management factors upon IGF-I levels around time of calving, supporting the hypothesis of Grum et al. (1996) that IGF-I levels are independent from feed intake. Healthy cows had significantly higher IGF-I concentration ante partum compared to cows which developed a production disease post partum (Fig. 3). In contrast to other measured blood parameters, this finding was independent of the kind of disease that occurred (Fig. 6, Fig. 8). Thus, IGF-I seems to be the most suitable blood parameter to calculate the risk for developing a production disease in the first three weeks of

lactation. Assuming a threshold of 100 ng/mL, IGF-I in plasma led to a sensitivity of 0.79 and a specificity of 0.68 to identify cows with any PD after calving. However, determination of IGF-I in plasma is more cost-intensive than analysis of NEFA in serum. Moreover, due to the consecutive decline of IGF-I during the last weeks before calving, the point of time of blood sampling seems to be more decisive compared to NEFA.

Point in time

The most sensitive and specific point in time to calculate the risk of cows for developing a production disease post partum was wk -2 for NEFA, bilirubin, BHBA and IGF-I.

Neither the dairy farmer nor the veterinary can predict time of calving exactly. Hence, the risk was calculated additionally based on parameters measured in wk-3, which was only slightly less sensitive and specific. This led to the conclusion, that blood sampling between week -3 and -2 ante partum is appropriate to determine the risk of production diseases.

Correlations

Nearly in all cases no (or just a low) correlation was found in blood parameters measured before and after calving. This indicates that not an intrinsic attitude of the respective individual animal is decisive for the changes post partum but much more management factors.

Strong correlations between cholesterol concentrations at all time points indicated that this parameter was independent from management factors and seems to be characteristic for the individual cow. The implications remain unknown at present.

In conclusion NEFA concentrations have a high predictive value for ketosis and LDA. As a more unspecific indicator for any PD after calving, IGF-I is superior.

Figures

Figure captions

Fig. 1

Bilirubin serum concentrations in cows from wk -6 until wk +16. An asterisk indicates significant differences ($p < 0.05$) a.p. between healthy cows and cows developing a production disease during the first three weeks of lactation. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 2

Serum concentrations of cholesterol in healthy cows and cows developing a production disease during the first three weeks of lactation from wk -6 until wk +16. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 3

Plasma concentrations of IGF-I in cows from wk -6 until wk +16. An asterisk indicates significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) a.p. between healthy cows and cows developing a production disease during the first three weeks of lactation. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 4

Serum concentrations of NEFA in cows from wk -6 until wk +16. An asterisk indicates significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) ante partum between healthy cows and cows developing a production disease during the first three weeks of lactation. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 5

Serum concentrations of total bilirubin in cows from wk -6 until wk +16. An asterisk indicates significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) a.p. between healthy cows and cows developing a ketosis and/or left displacement of abomasum during the first three weeks of lactation. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 6

IGF-I concentrations in plasma in healthy cows and cows developing a ketosis and/or left displacement of abomasum during the first three weeks of lactation from wk -6 until wk +16. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 7

Serum concentrations of NEFA in cows from wk -6 until wk +16. An asterisk indicates significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) a.p. between healthy cows and cows developing a ketosis and/or left displacement of abomasum during the first three weeks of lactation. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 8

IGF-I concentrations in plasma in healthy cows, cows developing a ketosis or left displacement of abomasums and cows with other production diseases during the first three weeks of lactation from wk -6 until wk +16. A circuit indicates significant differences ($p < 0.05$, $^{\circ}p < 0.01$, $^{\circ\circ}p < 0.001$) a. p. between healthy cows and cows with other production diseases. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 9

Serum concentrations of NEFA in cows from wk -6 until wk +16. An asterisk indicates significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) a.p. between healthy cows and cows developing a ketosis and/or left displacement of abomasums, a circuit indicates significant differences ($p < 0.05$, $^{\circ}p < 0.001$) a.p. between cows developing a ketosis and/or left displacement of abomasums and cows with other production diseases during the first three weeks of lactation. Data presented as mean \pm SEM.

Fig. 10

Antepartal serum concentrations of total bilirubin, BHBA, NEFA and plasma concentrations of total IGF-I in primiparous (n = 18) and pluriparous cows (n = 41). Asterisks indicate significant differences between heifers and cows (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Different letters indicate significant differences among consecutive weeks.

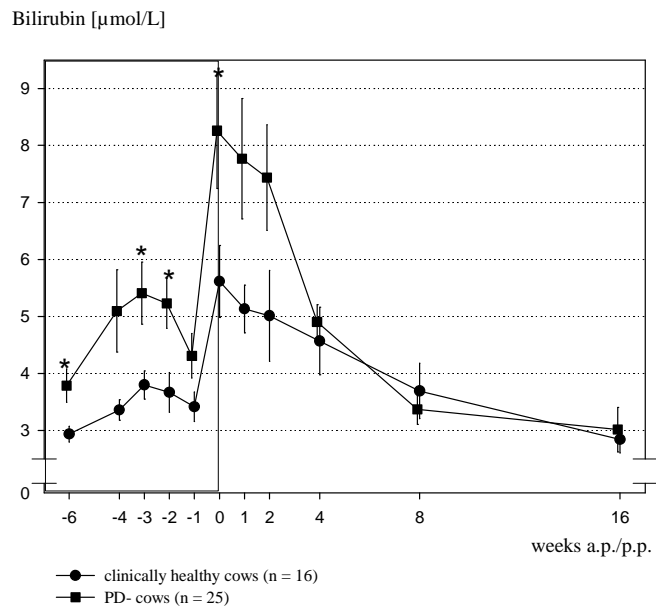


Fig. 1

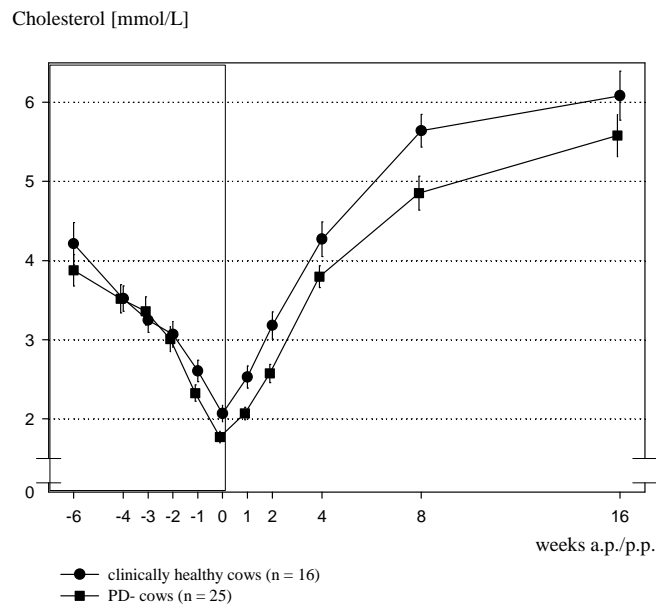


Fig. 2

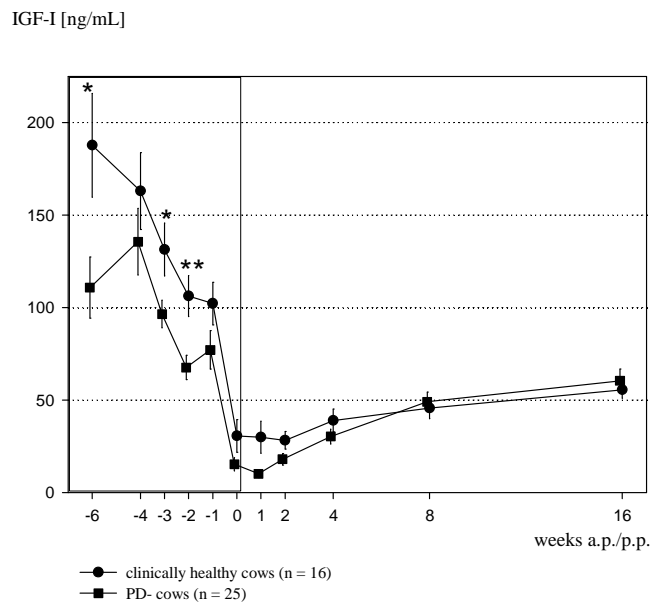


Fig. 3

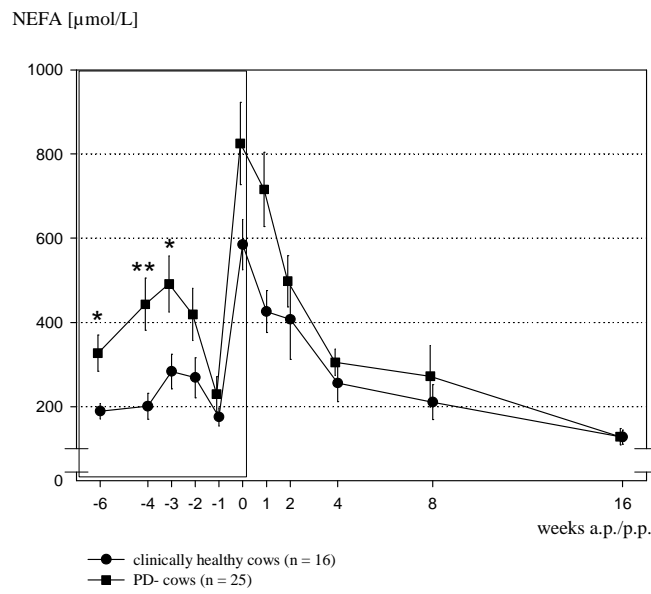


Fig. 4

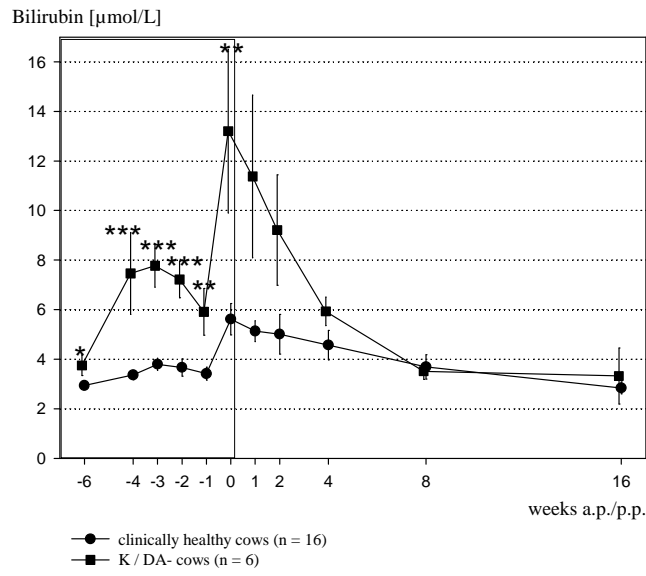


Fig. 5

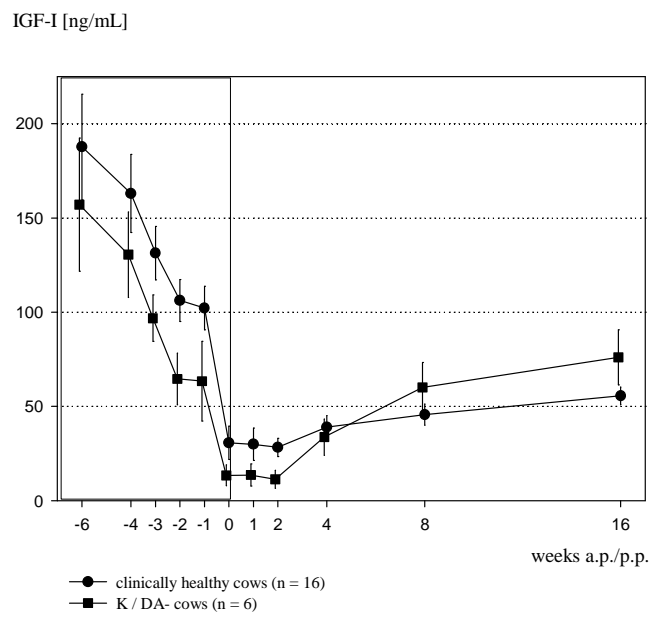


Fig. 6

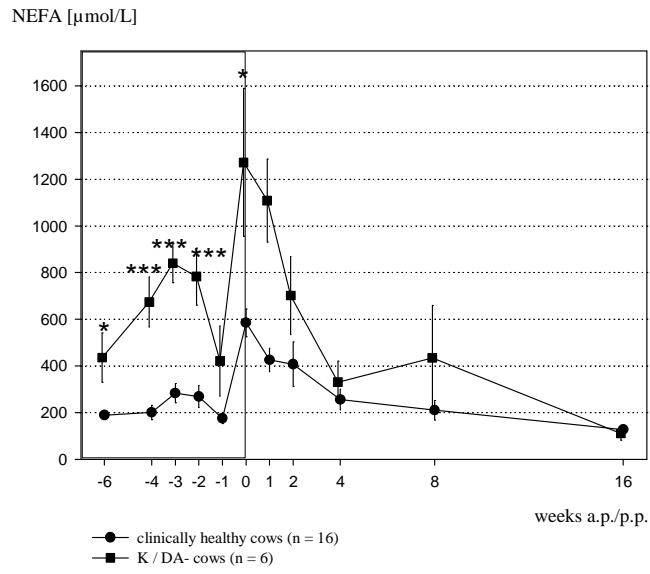


Fig. 7

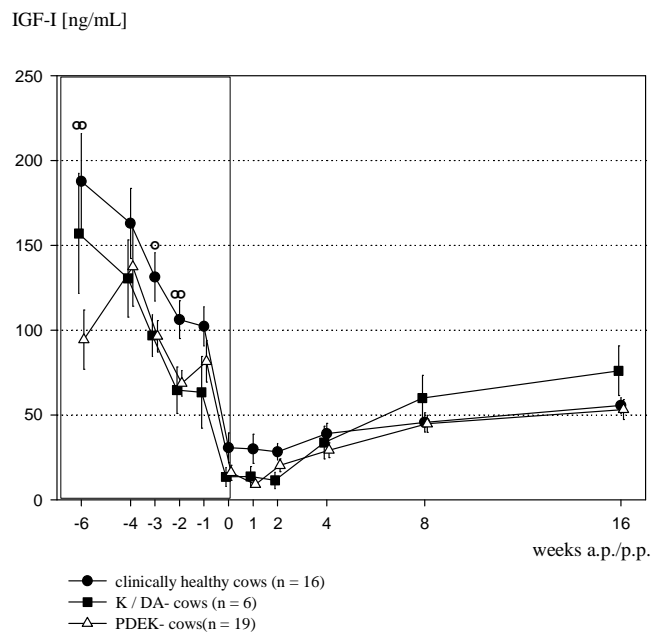


Fig. 8

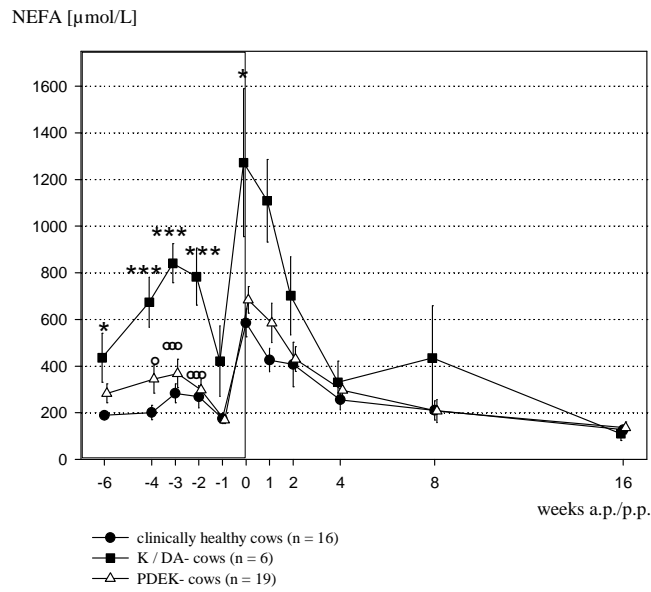


Fig. 9

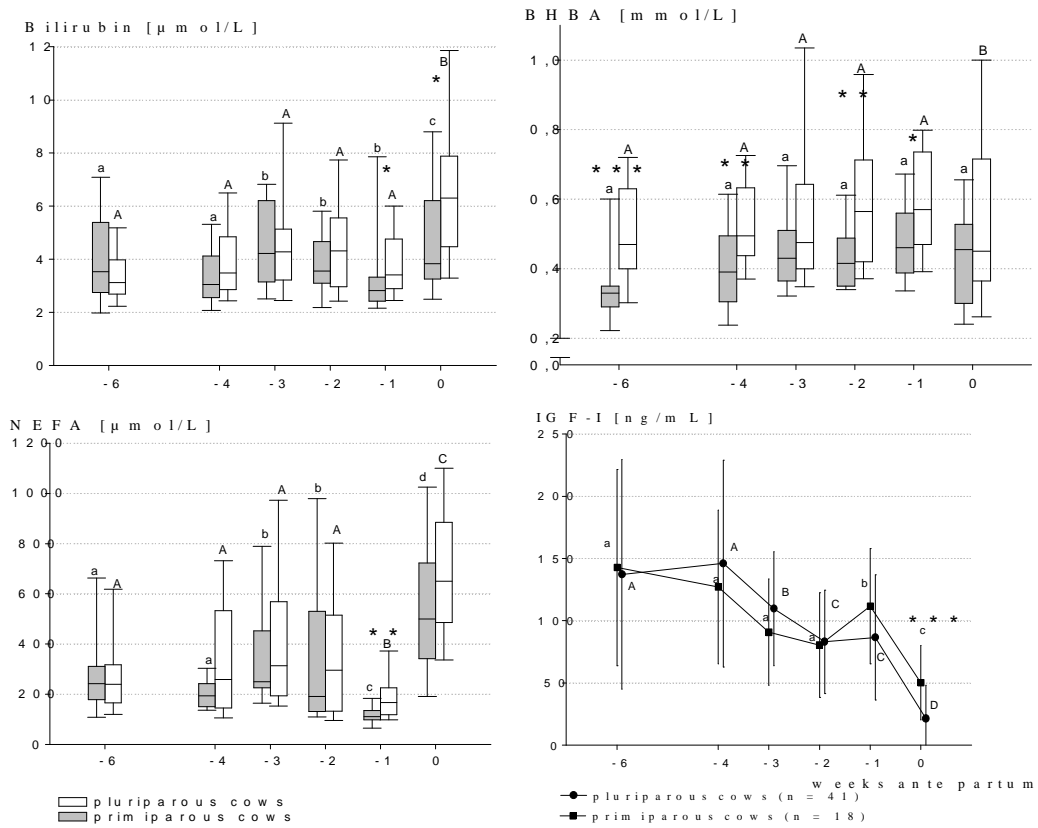


Fig. 10

References

- Bell, A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73:2804-2819.
- Bobe, G., J. W. Young, and D. C. Beitz. 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87(10):3105-3124.
- de Boer, G., A. Trenkle, and J. W. Young. 1985. Glucagon, insulin, growth hormone, and some blood metabolites during energy restriction ketonemia of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 68(2):326-337.
- DeGaris, P. J. and I. J. Lean. 2008. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176(1):58-69.
- Drackley, J. K. 1999. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J. Dairy Sci.* 82(11):2259-2273.
- Duffield, T. 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16(2):231-253.
- Fleischer, P., M. Metzner, M. Beyerbach, M. Hoedemaker, and W. Klee. 2001. The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84(9):2025-2035.
- Fürll, M. and M. Schäfer. 1992. Lipolyse und Hyperbilirubinämie – ein Beitrag zur Pathogenese des Ikterus. *Mh. Vet. Med.* 47:181-186.
- Grant, R. J. and J. L. Albright. 1995. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 73(9):2791-2803.
- Grum, D. E., J. K. Drackley, L. R. Hansen, and J. D. Cremin, Jr. 1996. Production, digestion, and hepatic lipid metabolism of dairy cows fed increased energy from fat or concentrate. *J. Dairy Sci.* 79(10):1836-1849.
- Grummer, R. R. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76(12):3882-3896.
- Grummer, R. R., D. G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20(3):447-470.

- Herd, T. H. 2000. Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16(2):387-403.
- Ingvartsen, K. L. and J. B. Andersen. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83(7):1573-1597.
- Ingvartsen, K. L., R. J. Dewhurst, and N. C. Friggens. 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science.* 83(2-3):277-308.
- Kessel, S., M. Stroehl, H. H. Meyer, S. Hiss, H. Sauerwein, F. J. Schwarz, and R. M. Bruckmaier. 2008. Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J. Anim. Sci.* 86(11):2903-2912.
- Konigsson, K., G. Savoini, N. Govoni, G. Invernizzi, A. Prandi, H. Kindahl, and M. C. Veronesi. 2008. Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma concentrations and resumption of post partum ovarian activity in Swedish Red and White breed cows. *Acta Vet. Scand.* 50:3.
- Kulcsar, M., S. Janosi, T. Lehtolainen, L. Katai, C. Delavaud, O. Balogh, Y. Chilliard, S. Pyorala, P. Rudas, and G. Huszenicza. 2005. Feeding-unrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29(1):214-226.
- Lean, I. J., P. J. DeGaris, D. M. McNeil, and E. Block. 2006. Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *J. Dairy Sci.* 89(2):669-684.
- LeBlanc, S. J., K. E. Leslie, and T. F. Duffield. 2005. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88(1):159-170.
- Marquardt, J. P., R. L. Horst, and N. A. Jorgensen. 1977. Effect of parity on dry matter intake at parturition in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 60(6):929-934.

- McCaffery, F. H., R. Leask, S. C. Riley, and E. E. Telfer. 2000. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol. Reprod.* 63(1):267-273.
- Mulligan, F. J. and M. L. Doherty. 2008. Production diseases of the transition cow. *Vet J.* 176(1):3-9.
- Nikolic, J. A., M. Kulcsar, L. Katai, O. Nedic, S. Janosi, and G. Huszenicza. 2003. Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50(1):22-29.
- Reist, M., D. Erdin, D. von Euw, K. Tschuemperlin, H. Leuenberger, C. Delavaud, Y. Chilliard, H. M. Hammon, N. Kuenzi, and J. W. Blum. 2003. Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin. *J. Dairy Sci.* 86(5):1690-1706.
- Roberts, A. J., R. A. Nugent, 3rd, J. Klindt, and T. G. Jenkins. 1997. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. *J. Anim. Sci.* 75(7):1909-1917.
- Rosenberger, G. (Hrsg.): G. Dirksen, H.-D. Gründer und M. Stöber (1991). Die klinische Untersuchung des Rindes. Verlag Parey, Berlin/Hamburg, 472–498.
- Ryan, D. P., R. A. Spoon, M. K. Griffith, and G. L. Williams. 1994. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-I relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11(2):161-174.
- Taylor, V. J., Z. Cheng, P. G. Pushpakumara, D. E. Beever, and D. C. Wathes. 2004. Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. *Vet. Rec.* 155(19):583-588.

Publikation 3:

Zur Prävention peripartaler Erkrankungen der Milchkühe: Effekte der unmittelbar postpartalen Flüssigkeitsaufnahme auf Futteraufnahme und metabolisch relevante Blutparameter

Anne Kathrin Sander¹, Martin Kaske¹, Uwe Andresen²

- 1 - Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, D - 30173 Hannover; Anne.Kathrin.Sander@tiho-hannover.de
- 2 - Tierärztliche Praxis Albersdorf, Bahnhofstraße 15, 25767 Albersdorf.

Zusammenfassung

Die postpartal negative Energiebilanz von Hochleistungskühen ist ein wichtiger Risikofaktor für Produktionskrankheiten in den ersten Laktationswochen. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es zu prüfen, ob eine hohe Flüssigkeitsaufnahme unmittelbar post partum die Futteraufnahme sowie stoffwechselrelevante Blutparameter beeinflusst. Insgesamt wurde 124 Kühen auf drei Betrieben unmittelbar post partum eine Roboranstränke angeboten. Die Akzeptanz des eingesetzten Präparates erwies sich als hoch; im Mittel wurden $35,8 \pm 11,7$ L aufgenommen. Die Trockenmasseaufnahme während der ersten 72 Stunden post partum wurde bei 13 Kühen quantitativ erfasst. Die Aufnahme der Teilmischration korrelierte bei diesen Kühen signifikant mit der Höhe der Tränkeaufnahme ($r=0,58$, $p=0,036$). Auswirkungen einer hohen Flüssigkeitsaufnahme unmittelbar post partum auf ausgewählte Blutparameter waren nicht nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass die empirisch nachgewiesenen positiven Effekte so genannter Spezialtränken auf die Tiergesundheit indirekt durch eine erhöhte Futteraufnahme zu erklären sind.

Schlüsselwörter: Abkalbung, Flüssigkeitsaufnahme, Produktionskrankheit, Kühe, Prophylaxe

Prevention of peripartal diseases in dairy cows: does fluid intake directly after calving affect feed intake and metabolic blood parameters?

Summary:

A pronounced negative energy balance increases the risk for production diseases in dairy cows in early lactation. The objective of this study was to investigate whether the fluid intake in cows directly after calving has an impact upon feed intake and metabolic blood parameters. Water supplemented with a mixture of roborants was offered to a total of 124 cows on three dairy farms. The acceptance of the supplement water was high (on average, 35.8 ± 11.7 L were drunk within 15 min). Quantitative dry matter intake during the first 72 hours after calving was recorded in 13 cows. A significant positive correlation between amount of fluid intake and intake of the partly mixed ration was found ($r=0.58$, $p=0.036$). Fluid intake did not, however, affect metabolic blood parameters in these cows. Results of this study indicate that the empirically reported positive results of a high fluid intake directly after calving on the health status of dairy cows seem to be caused indirectly by an enhanced dry matter intake.

Key words: calving, production disease, fluid intake, prevention

Einleitung

Die Futteraufnahme sinkt in den letzten Tagen ante partum unter dem Einfluss steigender Östrogenkonzentrationen um ca. 30 % gegenüber dem Beginn der Trockenstehzeit und steigt post partum trotz hoher Milchleistung nur langsam wieder an (Grummer, 2004). Die resultierende negative Energiebilanz post partum repräsentiert einen entscheidenden Risikofaktor für das Entstehen infektiöser wie nicht-infektiöser Produktionskrankheiten der Milchkühe (Fürll, 2000; Staufenberg, 2001; Klug et al., 2002; Rossow, 2004). Der Energiedichte von Futtermitteln sind im Rahmen einer wiederkäuergerechten Fütterung jedoch Grenzen gesetzt. Dies gilt explizit für die ersten Tage nach der Kalbung, in der eine Forcierung der Pansenfunktion durch einen relativ hohen Strukturanteil besondere Bedeutung hat. Entsprechend ist es ein zentrales Ziel des Fütterungsmanagements, nach der Kalbung so schnell wie möglich eine hohe Futteraufnahme zu erreichen. Dies ist umso wichtiger, als die Energie- und Trockensubstanzaufnahme in den ersten Wochen post partum eng mit der Aufnahme in den folgenden Monaten korreliert (Horstmann, 2004).

Wichtige Maßnahmen zur Maximierung der postpartalen Futteraufnahme sind u. a. eine wirksame Prophylaxe von Hypocalcämien, eine komplikationsfreie und möglichst stressarme Abkalbung und peripartal das Anbieten qualitativ hochwertigen, schmackhaften Grundfutters. Als weitere Option hat die unmittelbar postpartale Verabreichung größerer Wassermengen (üblicherweise 20-30 Liter), versetzt mit unterschiedlicher Substanzen wie Glucose, Elektrolyten und Vitaminen, positive Effekte im Hinblick auf die Inzidenz von Produktionskrankheiten und die Milchleistung (Geishauser, 2001; Gundelach, 2007). So wurde bei einmalig nach der Kalbung mit einer Elektrolyttränke gedrenchten Tieren eine Stabilisierung des Calciumstoffwechsels, eine Abnahme der Inzidenz von Labmagenverlagerungen und eine Zunahme der Milchleistung beobachtet (Schriever, 2004). Große-Uhlmann (2008) wies ebenfalls auf vergleichbare positive Effekte nach freiwilliger Aufnahme einer Glucose-Elektrolyttränke hin; zudem war die Milchleistung in den ersten 100 Tagen der Laktation um ca. 400 kg höher als die der Kontrolltiere. Eine enge

Korrelation zwischen der Höhe der Trockenmasseaufnahme und der Wasseraufnahme gilt ohnehin als gesichert (Murphy et al., 1983; Murphy et al. 1992). Kühe nehmen, sofern sie die Möglichkeit dazu haben, abwechselnd Futter und Wasser auf, so dass die Tageszeit mit der höchsten Wasseraufnahme mit der Zeit der höchsten Trockenmasseaufnahme korreliert („feed associated drinking“; Nocek und Braun, 1985). Beim Fehlen ausreichender Tränkemengen sinken Futteraufnahme, Milchleistung und Urinausscheidung schnell; ausgelöst wird der Rückgang der Futteraufnahme offenbar durch Änderungen der physiologischen Plasmakonzentrationen von Metaboliten und Nährstoffen. Die Pansenmotilität ist nach dreitägigem Futterentzug um etwa 50 % vermindert (Little et al., 1984).

Die Ursachen für die positiven Effekte einer hohen postpartalen Tränkeaufnahme sind bislang unklar. Am wahrscheinlichsten erscheint, dass die folgenden Faktoren – u. U. auch synergistisch additiv - für die positiven Effekte verantwortlich sind:

- Dehnungsreize auf die Pansenwand verursachen mit einer konsekutiv erhöhten Passagerate der Ingesta eine Stimulierung der Futteraufnahme (Allen et al., 1996),
- eine Verringerung des geburtsbedingten, oxidativen Stresses hat eine Verbesserung des allgemeinen Gesundheitsstatus zur Folge (Andresen, 2004),
- eine vermehrte Endotoxinausschwemmung vermindert die Anfälligkeit des Organismus gegenüber Stoffwechselerkrankungen (Fürl et al., 1998),
- die Flüssigkeitsaufnahme beeinflusst die mit der Abkalbung einhergehende Immunsuppression (Mansfeld et al., 2008; Nordlund, 2008),
- an der Regulation der Futteraufnahme beteiligte, parakrin und endokrin wirksame Faktoren wie Insulin, IGF-I und Leptin werden modifiziert (Bradford und Allan, 2008),
- die Tränkeaufnahme führt zu einem vergrößerten Pansenflüssigkeitsvolumen; dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass der Labmagen zwischen Pansen und Bauchwand aufsteigt (Geishauser, 1995).

Die vor allem empirisch ermittelten positiven Effekte einer hohen peripartalen Wasseraufnahme haben dazu geführt, dass inzwischen zahlreiche Rezepturen kommerziell verfügbar sind. Diese werden unter verschiedenen Bezeichnungen vertrieben („Energietrunk“, „Fitnesscocktail“, Fitness-Trunk“ u. a.). Hier gilt es allerdings hervorzuheben, dass es sich stets um sog. Ergänzungsfuttermittel handelt. Definitionsgemäß müssen Futtermittel aber freiwillig aufgenommen werden. Sobald als routinemäßige Applikationsform die Zwangseingabe (Drenchen) vorgesehen ist, handelt es sich formaljuristisch nicht um Ergänzungsfuttermittel. Hinzu kommt, dass die Zwangseingabe von Futtermitteln an klinisch gesunde Tiere schlicht unzulässig ist (Tierschutzgesetz vom 20.12.2005; § 3 Abs. 2). Notwendig sind deshalb zweifellos Energietränken, von denen möglichst große Volumina freiwillig aufgenommen werden.

Nachdem die angestrebte freiwillige Aufnahme großer Volumina einer sog. Roboranstränke bereits festgestellt wurde (Andresen und Kaske, 2008), war es das Ziel der vorliegenden Untersuchung zu prüfen, ob eine hohe postpartale Aufnahme der Roboranstränke eine höhere Futteraufnahme sowie Veränderungen des Elektrolythaushaltes und stoffwechselrelevanter Blutparameter zur Folge hat.

Material und Methoden

Auf drei Betrieben wurde geprüft, welche Mengen der Tränke unmittelbar postpartal aufgenommen wurden. Allen Kühen wurde lauwarmes Wasser mit 20 g Roborans¹ pro 10 Liter unmittelbar nach der Kalbung zur freiwilligen Aufnahme angeboten. Die Tränke stand den Kühen über 15 min zur Verfügung; die innerhalb dieses Zeitraums aufgenommene Menge wurde jeweils notiert.

Das eingesetzte Präparat¹ enthält Glucose und Lebendhefe zur Anregung des Wachstums der Pansenflora sowie Vitamin E und Selen als Antioxidantien. Das Calcium wirkt zudem beim Rind orexigen, d. h. die Futteraufnahme wird angeregt und die Motorik des Gastrointestinaltrakts stimuliert. Calciumcarbonat (CaCO₃) hat darüber hinaus eine puffernde Wirkung. Weitere, die Verdauungsprozesse stimulierende Wirkungen des Präparats ergeben sich durch den Zusatz von Ganzpflanzenextrakten. Letztere werden seit Jahrhunderten in der Tier- und Humanmedizin in Form von Gewürzmischungen (Kümmel, Anis u.a.), als pflanzliche Heilmittel und in Alkoholika (Enzian, Kümmel u. a.) als sogenannte Roborantien, Stomachika oder Digestiva eingesetzt.

Die Akzeptanzuntersuchung wurde zunächst in einem norddeutschen Milchviehbetrieb (Holstein-Friesian; ca. 10.000 kg Jahresleistung im Herdendurchschnitt) mit 82 Kühen (Betrieb 1) durchgeführt.

In einem weiteren Betrieb in Niedersachsen (Holstein-Friesian, ca. 9.000 kg Jahresleistung im Herdendurchschnitt) wurde die Aufnahme der Tränke bei 29 Kühen erfasst (Betrieb 2).

In einem dritten Betrieb in Süddeutschland (Red Holstein, 8.700 kg Jahresleistung im Herdendurchschnitt) wurden 13 Kühe in die Untersuchung einbezogen (Betrieb 3).

¹ Roborans-Konzentrat der Firma Bewital. Alleinvertrieb: Dr. med. vet. Peter Conrad e.K., Ostpreußenstraße 8, 30938 Burgwedel, Tel. 05135-412 oder 03583-60057

In Betrieb 1 wurde die Tränke durch den Besitzer angeboten, in Betrieb 2 und 3 erfolgte die Bereitstellung durch betriebsfremde Personen. In allen Betrieben hatten die kalbenden Tiere ungehinderten Zugang zu einer Schwimmertränke mit hohem Wasserzulauf sowohl vor als auch nach der Kalbung.

Auf dem Betrieb 3 wurden bei jedem kalbenden Tier zudem venöse Blutproben (V. jugularis) entnommen, und zwar 1, 6, 12 und 24 Stunden post partum. Das Blutserum wurde innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme abzentrifugiert (2.000 x g, 4 °C). Die Analyse der Serumkonzentrationen von Natrium, Chlorid, Glucose, nicht-veresterten Fettsäuren (NEFA), β -Hydroxybutyrat (BHB), Gesamt-Bilirubin (GB) und Cholesterin erfolgte mittels Analyseautomaten (Pentra 400, Biotech, Basel). Darüber hinaus wurde die Futteraufnahme der Tiere über 72 h quantitativ erfasst. Dazu wurden die Tiere während der drei Tage nach der Abkalbung weiter in Einzelhaltung in der Abkalbebox gehalten. Täglich zweimal wurden abgewogene Mengen von Heu (jeweils 2,5 kg) sowie eine Teilmischung (auf Trockensubstanz-Basis: 45 % Maissilage, 39 % Grassilage, 16 % Ausgleichsfutter [Sojaschrot, Weizen, Gerste, Viehsalz, Mineralstoffe]) angeboten. Die jeweilige Rückwaage bei der nächsten Futtervorlage wurde erfasst. Zusätzlich erhielt jede Kuh zweimal täglich jeweils 2 kg Kraftfutter. Die Kühe wurden zweimal täglich gemolken; die Milchmenge wurde jeweils mittels Lactocordern ermittelt.

Statistische Analysen wurden mit der Software SigmaStat 2.0 durchgeführt, ein P-Wert < 0.05 galt als signifikant. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov Test angewandt. Unterschiede zwischen Kühen, die unterschiedliche Mengen der Roboranstränke aufnahmen, wurden mit dem T-Test oder einer einfaktoriellen Varianzanalyse geprüft. Zur Prüfung der Abhängigkeit der Futter- von der Tränkeaufnahme wurden lineare Regressionen berechnet. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Ergebnisse

Im Betrieb 1 tranken die Färsen (N = 14) durchschnittlich $29,3 \pm 7,8$ L (Mittelwert \pm Standardabweichung), während die Kühe (N = 68) im Mittel $40,7 \pm 10,0$ L aufnahmen.

Im Betrieb 2 wurden im Durchschnitt $27,4 \pm 10,7$ L aufgenommen, wobei sich die Tränkemenge der Färsen (N = 9; $26,7 \pm 11,7$ L) und der Kühe (N = 20; $27,8 \pm 10,2$ L) nicht signifikant unterschied.

Im Betrieb 3 lag die Tränkeaufnahme der Färsen (N = 3) bei $16,3 \pm 17,3$ L, während die Kühe (N = 10) im Mittel $29,6 \pm 13,6$ L tranken.

Alle in die Studie aufgenommenen Tiere auf dem Betrieb 3 fraßen an jedem der drei Tage post partum das vorgelegte Krafffutter (4 kg/Tag) vollständig. Die Aufnahme des Heus unterschied sich zwischen den Tieren (minimal 1,2 kg, maximal 9 kg innerhalb von 3 Tagen), korrelierte jedoch nicht mit der Aufnahme der Tränke postpartal. Die Aufnahme der Teilmischration innerhalb der ersten drei Tage nach der Abkalbung korrelierte signifikant mit der Höhe der Tränkeaufnahme (Abb. 1).

Die Blutparameter zeigten keine signifikanten, gerichteten Veränderungen innerhalb der ersten 24 Stunden post partum (Tab. 1). Korrelationen zwischen den Blutparametern und der Höhe der unmittelbar postpartalen Tränkeaufnahme waren nicht nachweisbar.

Diskussion

Wasser ist von zentraler Bedeutung als unverzichtbares Lösungs- und Transportmedium für sämtliche zellulären Prozesse wie auch die intestinalen Verdauungs- und Resorptionsvorgänge. Zweifellos ist Wasser das wichtigste Futtermittel jedes Tieres – und dies gilt in besonderem Umfang unmittelbar nach der Abkalbung. Die Mehrzahl der Kühe hat in dieser Situation Durst. Diesen gilt es auszunutzen – ist dagegen eine Tränke nicht unmittelbar zugänglich, das Wasser sehr kalt oder verschmutzt, so ist eine hohe Aufnahme nicht gewährleistet. Viele Empfehlungen zur Anwendung spezieller Tränken basieren auf Beobachtungen aus der Praxis. Als wichtige Aspekte haben sich folgende Punkte erwiesen:

- die Spezialtränke sollte bereits dem noch liegenden Tier unmittelbar nach der Austreibungsphase angeboten werden – in diesem Moment scheint das Durstgefühl am intensivsten zu sein. Die Lebensäußerungen des Kalbes in den nächsten Minuten aktivieren anschließend offenbar die Mutterinstinkte der Kuh (Trockenlecken des Kalbes), so dass die Kuh deutlich abgelenkt ist und u. U. entsprechende Volumina nicht freiwillig trinkt,
- die Spezialtränken sollten mit handwarmem Wasser angemischt sein, da dies offenbar in größeren Volumina getrunken wird als kaltes Wasser,
- zulässig erscheint die Vermutung, dass höhere Mengen aufgenommen werden, wenn die Tränke durch eine dem Tier bekannte, vertraute Person angeboten wird; dies mag eine Erklärung sein für die höhere Tränkeaufnahme der Tiere auf dem Betrieb 1 verglichen mit den Betrieben 2 und 3.

Die kommerziell verfügbaren Produkte enthalten unterschiedliche Mengen an Glucose, Vitaminen, Molkenpulver und sonstigen Zusatzstoffen. Ein direkter Einfluss der Inhaltsstoffe ist jedoch bislang nicht nachgewiesen worden. Selbst Mengen von 1,5 kg Glucose hatten keinen messbaren Einfluss auf die Blutzuckerspiegel (Lachmann, 1983). Insofern erscheint es zweifelhaft, ob Spezialtränken - wie im Werbematerial angepriesen - direkt zum Ausgleich des Energiedefizits nach dem Kalben geeignet sind. Auch in der eigenen Studie waren keine signifikanten

Beziehungen zwischen der Höhe der Tränkeaufnahme und Blutparametern nachweisbar. Das Fehlen entsprechender Effekte lässt sich einerseits durch die zweifellos nur transienten Effekte der Flüssigkeitszufuhr erklären. Zudem ist die Konzentration vieler Blutparameter von komplexen Regulationssystemen abhängig, die der Aufrechterhaltung möglichst konstanter Blutspiegel trotz vielfältiger „Störfaktoren“ (Nahrungszufuhr oder –entzug, Klimaschwankungen u. ä.) dienen. Entsprechend werden nur drastische Maßnahmen die Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase signifikant beeinflussen. So führt ein um 10 % gegenüber dem Bedarf reduziertes Wasserangebot nicht zu signifikanten Änderungen der Harnstoffkonzentration im Serum von Milchkühen; erst bei Entzug von 50 % des Wasserbedarfs über eine Woche ergibt sich eine signifikante prärenale Azotämie (Sansom und Little, 1980).

Es ergibt sich die Vermutung, dass die offensichtlichen, positiven Effekte von Spezialtränken (Schriever, 2004) darauf zurückzuführen sind, dass das aufgenommene Flüssigkeitsvolumen sekundär eine erhöhte Futteraufnahme und damit eine verbesserte Energieversorgung provoziert. Tatsächlich sind die aus dieser Studie vorliegenden Ergebnisse als Hinweis zu werten, dass eine höhere Aufnahme der Roboranstränke zu einer höheren Futteraufnahme führt und damit den Gesundheitsstatus des Tieres positiv beeinflusst. Wegen des erheblichen Aufwandes, insbesondere der Einzelfütterung, musste im Rahmen der vorliegenden Untersuchung auf größere Tierzahlen verzichtet werden. Zudem gilt, dass die postpartale Futteraufnahme durch die Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst wird (Geburtsverlauf, Körperkondition ante partum, Wetterbedingungen, Haltungssystem u. a.). Die Ergebnisse sind deshalb zunächst nur als orientierende Tendenzen zu betrachten, die aber weitergehende Studien an größeren Tierzahlen sinnvoll erscheinen lassen. Zur Überprüfung und Ergänzung der ermittelten Befunde sollen in weiteren Untersuchungen hormonelle und immunologische Parameter ante und post partum erfasst und verglichen werden, um deren Beeinflussung durch Verabreichung größerer Tränkemengen näher zu charakterisieren.

Wichtigste Funktion der Komponenten der Spezialtränken ist es somit, die Aufnahme eines maximalen Volumens an Flüssigkeit zu provozieren. So wurden von der in dieser Studie eingesetzten Roboranstränke in ersten Untersuchungen mehr als doppelt so große Volumina aufgenommen als von angebotenem Trinkwasser (Andresen und Kaske, 2008). Ist das Ziel aber die Aufnahme von 40 L Flüssigkeit oder möglichst noch größerer Volumina, so ist eine relativ niedrige Konzentration der Inhaltsstoffe anzustreben – einerseits um den Preis des Präparats im Rahmen zu halten, andererseits um den Aufwand für den Landwirt bei dem Anmischen der Tränke zu minimieren. Das geprüfte Ergänzungsfuttermittel entsprach diesen Vorgaben und erwies sich in der Praxis als gut einsetzbar.

Literaturverzeichnis

1. **Allen M S (1996):** Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *J Anim Sci* 74(12): 3063-75.
2. **Andresen U (2004):** Akute-Phase-Protein Haptoglobin: ein Parameter zur Überwachung des Gesundheitsstatus von Hochleistungskühen? *Großtierpraxis* 5, 17-21.
3. **Andresen U, Kaske M (2008):** Zur Prophylaxe der peripartalen Erkrankungen der Milchkuhe - ist eine praktikable, unproblematische Lösung in Sicht? *Großtierpraxis* 9, 391-394.
4. **Bradford B J, Allen M S (2008):** Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 34, 196-203.
5. **Fürll M (2000):** Das Fettmobilisationssyndrom. *Großtierpraxis* 1, 24-34.
6. **Fürll M, Krüger M, Röpke M (1998):** Erkennung und Behandlung endotoxämischer Zustände. 3. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, Berlin.
7. **Geishauser T (1995):** Abomasal displacement in the bovine. A *review* on character, occurrence, aetiology and pathogenesis *J Vet Med A* 42, 229-251
8. **Geishauer T (2001):** Drenchen der Milchkuh: Wie und womit? *VETimpulse* 18, 14-15.
9. **Große-Uhlmann N (2008):** Stabilisierung des postpartalen Stoffwechsels bei Kühen mit dem Energietrunk Rindavit. Dissertation der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

10. **Grummer R R, Mashek D G, Hayirli A (2004):** Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20, 447-470.
11. **Gundelach Y, Hoedemaker M (2007):** Einfluss des postpartalen Drenchens mit Calciumpropionat auf die Stoffwechselfgesundheit, Milchleistung, Fertilität und Allgemeingesundheit hochleistender Milchkühe. *Tierärztliche Umschau* 291-299.
12. **Horstmann K (2004):** Inter- und intraindividuelle Varianz von Futteraufnahme, Energiebilanz sowie metabolisch-endokrinologischen Leitparametern im Blut von hochleistenden Kühen in der Früh-laktation. Dissertation der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
13. **Klug F, Wangler F, Rehbock F (2002):** Vorkommen und Diagnostik - Ketose der Milchkuh. *Großtierpraxis* 3, 13-22.
14. **Lachmann G (1983):** Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie und Prophylaxe der alimentären metabolischen Azidose des Rindes. Leipzig: Vet.-med. Habil.-Schrift.
15. **Little W, Sansom B F, Manston R, Allen W (1984):** Importance of water for the health and productivity of the dairy cow. *Res Vet Sci* 37, 283-289.
16. **Mansfeld R, Sauter-Louis C, Martin R (2008):** Steuerung des Metritis-/Endometritis Risikos bei Milchkühen. *Kompendium Nutztier*, Parey Verlag.
17. **Meyer H, Ahlswede L, Pferdekamp M (1975):** Untersuchungen über Magenentleerung und Zusammensetzung des Mageninhaltes beim Pferd. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 54-58.

18. **Murphy M R (1992):** Water metabolism of dairy cattle. J Dairy Sci 75, 326-333.
19. **Murphy M R, Davis C L, McCoy G C (1983):** Factors affecting water consumption by Holstein cows in early lactation. J Dairy Sci 66, 35-38.
20. **Nocek J E, Braun D G (1985):** Effect of feeding frequency on diurnal dry matter and water consumption, liquid dilution rate, and milk yield in first lactation. J Dairy Sci 68, 68:2238.
21. **Nordlund K (2008):** AABP Kongress, Charlotte/ North Carolina.
22. **Rossow N (2004):** Allgemeine Grundlagen des Fettstoffwechsels der Hochleistungskuh. Großtierpraxis 6-13.
23. **Sansom B F, Little W (1980):** Effects of reduced water intake in cows. Vet Rec 107, 138.
24. **Schriever U (2004):** Untersuchungen zum Drenchen am ersten Tag post partum bei Kühen und Färsen. Leipzig: Vet.-Med. Diss.
25. **Staufenbiel R (2001):** Labmagenverlagerung - Ansätze zur Prophylaxe. Großtierpraxis 2, 31-40.

Legende der Tabellen und Abbildungen

Abbildung 1:

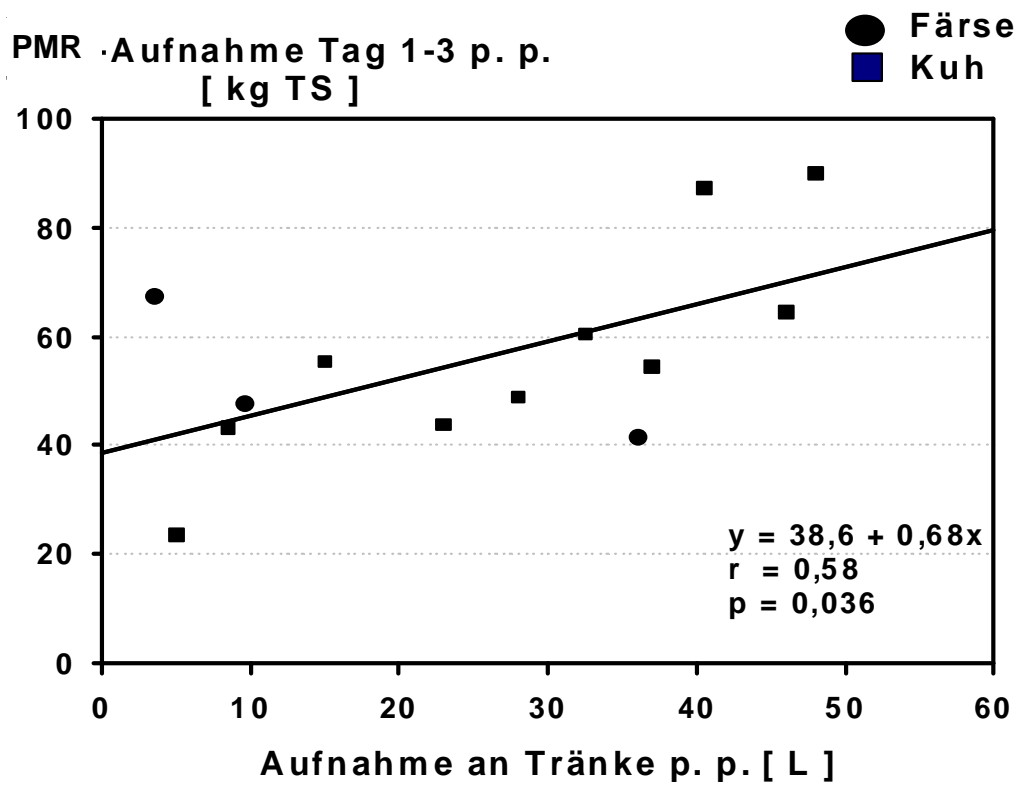
Gesamtaufnahme der Teilmischration [kg TS] während der ersten 72 Stunden nach der Kalbung (d 1-3 p.p.) in Abhängigkeit von der unmittelbar postpartal aufgenommenen Tränkemenge [L] bei Färsen (N=3) und Kühen (N=10).

Tabelle 1:

Konzentration von Blutparametern bei Färsen (N=3) und Kühen (N=10) während der ersten 24 Stunden post partum; die Konzentrationen wurden weder durch den zeitlichen Abstand zur Kalbung noch durch die Höhe der unmittelbar postpartalen Tränkeaufnahme signifikant beeinflusst.

Sander, Tabelle 1

Parameter	Kalbung	1 h p. p.	6 h p. p.	12 h p. p.	24 h p. p.
Gesamtprotein [g/L]	72.3 ± 3.8	71.5 ± 4.6	71.4 ± 3.3	70.8 ± 3.6	71.2 ± 3.6
Harnstoff [mmol/L]	4.3 ± 1.0	4.3 ± 0.9	4.5 ± 1.2	5.5 ± 1.7	4.9 ± 1.2
Calcium [mmol/L]	2.00 ± 0.36	1.99 ± 0.31	2.15 ± 0.23	2.04 ± 0.15	2.02 ± 0.19
Magnesium [mmol/L]	1.35 ± 0.14	1.35 ± 0.12	1.35 ± 0.12	1.30 ± 0.18	1.27 ± 0.13
Phosphor [mmol/L]	1.01 ± 0.26	0.91 ± 0.40	1.31 ± 0.30	1.29 ± 0.25	1.29 ± 0.26
Natrium [mmol/L]	142 ± 4	143 ± 3	144 ± 3	143 ± 3	144 ± 3
NEFA ¹ [µmol/L]	814 ± 257	622 ± 291	559 ± 227	662 ± 173	547 ± 162
BHB [mmol/L]	0.39 ± 0.11	0.50 ± 0.27	0.51 ± 0.13	0.39 ± 0.19	0.61 ± 0.08



Sander, Abb. 1

Publikation 4:

Zur Prophylaxe der peripartalen Erkrankungen der Milchkühe: Effekte der unmittelbar postpartalen Tränkeaufnahme auf die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten und ausgewählte Blutparameter

**A. K. Sander¹, U. Andresen², M. Kaske¹, M. Piechotta¹, K. Rubber³,
H. J. Schuberth⁴**

- 1 - Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, D - 30173 Hannover, Anne.Kathrin.Sander@tiho-hannover.de
- 2 - Tierärztliche Praxis Albersdorf, Bahnhofstraße 15, 25767 Albersdorf
- 3 - Tierärztliche Praxis Dr. K. Rummer, Humboldtstraße 10, 02763 Zittau
- 4 - Arbeitsgruppe Immunologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, D - 30173 Hannover

Zusammenfassung

Produktionserkrankungen treten gehäuft insbesondere in den ersten Laktationswochen auf und verursachen enorme wirtschaftliche Verluste. Eine peripartal eingeschränkte Funktion neutrophiler Granulozyten wird als eine der Ursachen für die peripartal erhöhte Krankheitsinzidenz angesehen. Folglich werden immer wieder Ansätze gesucht, den Gesundheitsstatus der Tiere in diesem Zeitraum zu verbessern. In dieser Studie wurde bei 41 mehrkalbigen und 18 erstkalbigen Kühen der Einfluss einer unmittelbar postpartalen Tränkeaufnahme auf die Phagozytoseaktivität und Phagozytosekapazität neutrophiler Granulozyten (erfasst mittels Durchflusszytometrie am Tag der Kalbung sowie eine Woche post partum) sowie stoffwechselrelevante Blutparameter geprüft. Die Phagozytoseaktivität der Granulozyten war bei Tieren nach Aufnahme von > 20 L Roboranstränke in der

ersten Woche post partum signifikant höher als bei Tieren, die unmittelbar nach der Geburt lediglich Zugang zu Wasser hatten. Positive Effekte zeigten sich ebenfalls im Hinblick auf stoffwechselrelevante Blutparameter. So sank die Konzentration nicht-veresterter Fettsäuren bei Tieren, die > 20 L des Roboransproduktes aufnahmen, zwischen der Geburt und Woche 1 post partum deutlich ab (-27,6 %), während sie bei den Kühen ohne Aufnahme der Roboranstränke um 9,7 % zunahmen. Zusammenfassend ergaben sich Hinweise, dass die unmittelbar postpartale Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen einen positiven Effekt auf die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten haben kann.

Prophylaxis of peripartal diseases in dairy cows:

Effects of fluid intake directly after parturition upon phagocytic activity of neutrophilic granulocytes and selected metabolic blood parameters

Summary

Production diseases occur with the highest frequency within the first weeks of lactation and cause high economic losses. A peripartal impaired function of neutrophilic granulocytes is considered as one of the explanations. Therefore, new approaches are required to improve the health status of dairy cows in this critical period of time. In this study, the effect of fluid intake supplemented with roborants directly after calving on activity and capacity of neutrophilic granulocytes (assessed by flow cytometry at the day of calving and 1 wk post partum) and metabolic key parameters was investigated in 41 pluriparous cows and 18 primiparous heifers. Phagocytic activity of granulocytes was significantly increased in cows after intake of > 20 L fluid with roborants compared to cows with access to water exclusively. Positive effects were also found in respect to blood parameters. Concentration of non-esterified fatty acids decreased in cows after intake of > 20 L fluid between calving and 1 wk post partum (- 27.6 %), while levels increased in cows consuming exclusively water (+ 9.7 %). It is concluded that the intake of high amounts of fluid seems to exhibit a positive effect on phagocytic activity and metabolic key parameters in blood.

Key words: Transition period, PMN, phagocytosis, fluid intake

Einleitung

Der Verlauf der Transit-Periode, definiert als das Zeitintervall drei Wochen vor bis drei Wochen nach der Kalbung, hat entscheidenden Einfluss auf die Produktivität, Gesundheit und Fruchtbarkeit von Milchkühen (Drackley, 1999). Das Immunsystem ist während des peripartalen Zeitraumes supprimiert (Van Kampen and Mallard, 1997). Dies geht einher mit einer erhöhten Anfälligkeit der Kühe für Infektionskrankheiten (Mehrzad et al., 2009). Die eingeschränkte Funktion der neutrophilen Granulozyten (PMN) spielt dabei eine wesentliche Rolle. So wurde bei Kühen in einer ausgeprägt negativen Energiebilanz eine herabgesetzte Phagozytoseaktivität der PMN nachgewiesen (Opsomer, 2007).

Die mit der Abkalbung einhergehende Immunsuppression kann durch eine hohe Tränkeaufnahme post partum beeinflusst werden (Mansfeld, 2008; Nordlung, 2008). Flüssigkeitsmengen von 20-30 Litern angereichert mit Glucose, Elektrolyten und Vitaminen wurden bislang überwiegend durch Drenchen verabreicht und hatten positive Effekte auf die Milchleistung, während die Inzidenz von Produktionskrankheiten verringert war (Geishauer, 2001; Gundelach, 2007). Von einer sog. Roboranstränke wurden noch größere Volumina freiwillig aufgenommen; damit einhergehend war eine tendenziell erhöhte Trockenmasseaufnahme in den ersten drei Tagen nach der Kalbung nachweisbar (Kapitel 3, Sander et al., 2010). Das eingesetzte Präparat¹ enthält Glucose und Lebendhefe zur Anregung des Wachstums der Pansenflora sowie Vitamin E und Selen als Antioxidantien. Das Calcium wirkt beim Rind orexigen, d. h. die Futteraufnahme wird angeregt und die Motorik des Gastrointestinaltrakts stimuliert. Calciumcarbonat (CaCO₃) hat darüber hinaus eine puffernde Wirkung. Weitere, die Verdauungsprozesse stimulierende Wirkungen des Präparats ergeben sich durch den Zusatz von Ganzpflanzenextrakten. Letztere werden seit Jahrhunderten in der Tier- und Humanmedizin in Form von Gewürzmischungen (Kümmel, Anis u.a.), als pflanzliche Heilmittel und in Alkoholika (Enzian, Wermuth, Löwenzahn, Pfefferminze u. a.) als sogenannte Roborantien, Stomachika oder Digestiva eingesetzt.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es zu prüfen, ob eine hohe postpartale Aufnahme dieser Roboranstränke die Funktion neutrophiler Granulozyten sowie stoffwechselrelevante Blutparameter beeinflusst.

Material und Methoden

Auf dem Lehr- und Forschungsgut Ruthe der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurde zunächst geprüft, welche Mengen der Roborans-Tränke unmittelbar post partum aufgenommen wurden. Am Tag der Abkalbung wurden die Versuchstiere (18 Färsen, 41 mehrkalbige Kühe) nach dem Zufallsprinzip einer von zwei Versuchsgruppen zugeordnet.

In dem Versuchsbetrieb hatten die Tiere sowohl vor als auch nach der Kalbung ungehinderten Zugang zu einer Schwimmertränke mit hohem Wasserzulauf. Die Kontrollgruppe (N = 30) hatte lediglich Zugang zu dieser Tränke, die Tiere der Versuchsgruppe (Roborans-Tränke; N = 29) erhielt zusätzlich unmittelbar nach Austreibung des Kalbes lauwarmes Wasser mit 20 g Roborans² pro 10 Liter in Eimern zur freiwilligen Aufnahme angeboten. Die „Roborans-Tränke“ stand den Kühen über 15 min zur Verfügung; die innerhalb dieses Zeitraums aufgenommene Menge wurde jeweils notiert.

Zur Blutprobenentnahme wurden die Tiere für maximal 5 min mit einem Kettenhalfter am Fressgitter fixiert. Venöse Blutproben wurden stets aus der V. jugularis entnommen (17 G, Neoject, Gelnhausen), und zwar 3, 2, 1 Wochen ante partum, am Tag der Kalbung, sowie 1, 2 und 4 Wochen post partum. Die Blutprobenentnahme erfolgte morgens zwischen 06.00 und 10.00 Uhr, mit Ausnahme der Blutprobenentnahme am Tag der Kalbung, die stets innerhalb von 10 min nach Austreibung des Kalbes vorgenommen wurde.

Aufgrund des Einsatzes der Roboranstränke waren die Blutprobenentnahmen am Tag der Kalbung und eine Woche post partum von besonderem Interesse für diese Studie.

¹ Roborans-Konzentrat der Firma Bewital. Vertrieb: Dr. med. vet. Peter Conrad e.K., Ostpreußenstraße 8, 30938 Burgwedel, Tel. 05135-412 oder 03583-60057

Pro Tier wurden eine EDTA-, eine Serum- und eine Fluoridprobe (Sarstedt, Nürnberg) zur Bestimmung der klinischen Parameter entnommen. Zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten wurde ein mit Natrium-Heparin versetztes Röhrchen (Becton & Dickinson, Heidelberg) verwendet.

Die Blutproben wurden bis zur Zentrifugation (1700 x g, 10 min) auf Trockeneis gelagert, mit Ausnahme der Natrium-Heparin-Röhrchen, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Anschließend wurde das Serum bzw. Plasma abpipettiert und in Eppendorf-Cups (2 ml, Sarstedt, Nürnberg) überführt. Die Proben wurden im Klinischen Labor der Klinik für Rinder an der Tierärztlichen Hochschule Hannover mittels Analyseautomaten (Pentra 400, Biotech, Basel) zur Bestimmung der Konzentrationen von Glucose, nicht-veresterten Fettsäuren, β -Hydroxybutyrat, Gesamtbilirubin und Cholesterin untersucht. Außerdem wurde ein Differentialblutbild erstellt.

Das EDTA-Plasma wurde bei -20°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Konzentration an Insulin-like growth factor I (IGF-I) ermittelt. Die Analytik der Konzentration von IGF-I erfolgte mittels eines immunradiometrischen Assays. Die Untersuchung des Vollblutes am Institut für Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover erfolgte innerhalb von zwei Stunden nach der Probennahme.

Bezüglich des Status der zellulären Immunität wurde im Durchflusszytometer ermittelt:

- (a) der Prozentsatz neutrophiler Granulozyten, die mit Fluoresceinisothiocyanat-markierte Staphylococcen phagozytierten [Phagozytoseaktivität],
- (b) die Anzahl der von PMN phagozytierten Bakterien über die mittlere Fluoreszenzintensität [Phagozytosekapazität].

Details zu der Methode sind ausführlich bei Sander et al. (2010) beschrieben.

Zur Auswertung wurden die Tiere in folgende drei Gruppen eingeteilt:

- Gruppe I: Tiere, denen nur Wasser über ihre Tränke zur Verfügung stand (9 Färsen, 21 Kühe).
- Gruppe II: Tiere, die weniger als 20 Liter der Roboranstränke aufnahmen (4 Färsen, 7 Kühe).
- Gruppe III: Tiere, die mehr als 20 Liter der Roboranstränke aufnahmen (5 Färsen, 13 Kühe).

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit SigmaStat 2.0. Ein P-Wert von $p < 0.05$ wurde als signifikanter Unterschied betrachtet. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Die Prüfung auf Unterschiede zwischen den Gruppen und zwischen den Untersuchungszeiträumen erfolgte mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und T-test. Wichen die Ergebnisse eines Parameters von einer Normalverteilung ab, so wurde der Rank Sum Test verwendet. Die Überprüfung des Einflusses der Tränkeaufnahme auf ermittelte Parameter erfolgte durch Berechnung der linearen Regression. Die relativen Änderungen [%] ausgewählter Blutparameter zwischen der Woche der Abkalbung und Woche 1 p. p. wurden zunächst für jedes einzelne Tier berechnet; anschließend wurde die mittlere relative Abweichung für die Tiere der betreffenden Gruppe als Mittelwert berechnet.

Ergebnisse

Phagozytoseaktivität

Kühe:

Der Anteil phagozytischer PMN stieg bei allen Tieren zwischen Kalbung und erster Woche post partum an. Der Anteil phagozytischer PMN in der ersten Woche nach der Kalbung lag bei Kühen, die mehr als 20 L der Roboranstränke aufgenommen haben (Gruppe III), signifikant über dem Mittelwert der Tiere, die nur Wasser bekamen (Gruppe I) (78 ± 8 vs. 63 ± 16 %; $p=0,03$). In Woche 4 p. p. lag die Phagozytoseaktivität der Tiere der Gruppe III ebenfalls signifikant über der Gruppe I ($p=0,04$). (Abb. 1A).

Färsen:

In Woche eins post partum unterschieden sich die Tiere der drei Gruppen nicht signifikant voneinander. Während die Phagozytoseaktivität bei Tieren, die nur Wasser aufnahmen (Gruppe I) zwischen Kalbung und Woche 1 p. p. tendenziell abnahm (57 bzw. 53 %), wurde bei den Tieren, die Roboranstränke erhielten, ein leichter Anstieg nachgewiesen (Gruppe II: 45 vs. 62%, Gruppe III: 48 vs. 57%). (Abb. 1B).

Phagozytosekapazität

Kühe:

Es bestand ein signifikanter Anstieg zwischen der Woche der Geburt (d0-d7) (MFI: 758 ± 131) und Woche 1 post partum (d7-d14)(MFI: 1069 ± 202) bei Tieren der Gruppe II ($p=0,03$). (Abb. 2A).

Färsen:

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Woche der Abkalbung und Woche 1 post partum. (Abb. 2B).

NEFA Konzentrationen im Serum

Kühe:

Tiere der Gruppe III (> 20 L Roboranstränke) zeigten prozentual den deutlichsten Abfall in der Konzentration freier Fettsäuren zwischen Geburt und Woche 1 p.p. (-27,6 %), in Gruppe II (< 20 L Roboranstränke) sank die Konzentration um 23,8 %, während sie in Gruppe I (Wasser) um 9,7 % anstieg.

Färsen:

In Woche 1 p. p. war der Mittelwert der Konzentration der NEFA im Serum bei den Tieren der Gruppe I (Wasser) am höchsten (421 $\mu\text{mol/l}$), während bei Tieren, die Roboranstränke aufgenommen hatten, niedrigere Mittelwerte nachgewiesen wurden (Gruppe II: 349 $\mu\text{mol/l}$, Gruppe III: 255 $\mu\text{mol/l}$). Die Unterschiede erwiesen sich jedoch nicht als signifikant. Tiere der Gruppe III (> 20 L Roboranstränke) zeigten einen signifikanten Abfall der Konzentration der NEFA zwischen dem Tag der Geburt (573 $\mu\text{mol/l}$) und der Probenentnahme in Woche 1 p. p. (255 $\mu\text{mol/l}$; $p=0,005$). (Tab. 1).

Cholesterin/Glucose:

Es waren keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Tränkeaufnahme nachweisbar.

Insulin-like growth factor-I (IGF-I)

In der Gruppe III (> 20 L Roboranstränke) war bei Färsen zwischen Geburt (60 ng/ml) und Woche 1 (81 ng/ml) ein signifikanter Anstieg feststellbar ($p=0,05$). Bei Kühen bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen. (Tab. 2).

Bilirubin:

Kühe:

Die Bilirubinkonzentration erhöhte sich bei Tieren der Gruppe I (Wasser) zwischen der Geburt und Woche 1 post partum um 6,4 %, während sie bei Kühen, die Roboranstränke aufnahmen, um 5,9 % (Gruppe II) bzw. um 9,4 % (Gruppe III) abnahm. (Tab. 3).

Färsen:

Die Bilirubinkonzentration im Serum stieg bei Tieren der Gruppe I (Wasser) zwischen der Geburt und Woche 1 p. p. um 22,3 % an, während die Konzentration bei Tieren der Gruppe II (< 20 L Roboranstränke) nahezu konstant blieb und bei Tieren der Gruppe III (> 20 L Roboranstränke) um 5 % anstieg.

Diskussion

Ziel dieser orientierenden Studie war es, Hinweise auf die Ursachen für die empirisch belegten positiven Zusammenhänge zwischen der Aufnahme von größeren Mengen an sog. Energietränken unmittelbar post partum und der Tiergesundheit in der Früh lactation zu finden.

Eine größere Tierzahl und kürzere Intervalle bzgl. der Probenentnahme wären dabei wünschenswert gewesen; die Bedingungen auf dem Versuchsbetrieb ließen eine wesentlich engmaschigere Beprobung der Tiere jedoch nicht zu. Umso bemerkenswerter ist es, dass trotz dieser Limitierungen signifikante Effekte der Verabreichung von größeren Volumina Roborans-Tränke nachweisbar waren.

Der Umstand, dass in Gruppe II (< 20 L) nur marginale Effekte beobachtet wurden, lässt den Schluss zu, dass geringe Mengen an Tränke die Tiergesundheit offenbar nicht oder nicht wesentlich beeinflussen. Hier ist hervorzuheben, dass von warmem Wasser deutlich geringere Volumina getrunken werden als von supplementierter Tränke (Andresen und Kaske 2008). Die Verabreichung von Roborans-Tränke erscheint insofern aus zwei Gründen sinnvoll: zum einen ist die Wahrscheinlichkeit einer hohen Tränkeaufnahme erhöht, zum anderen haben die Supplemente selbst potentiell positive Effekte auf die Tiergesundheit.

Trächtigkeit und frühe Laktation sind bei Kühen häufig mit einer funktionellen Beeinträchtigung der neutrophilen Granulozyten assoziiert (Kehrli et al., 1989). Eine der wichtigsten Funktionen der PMN besteht in der Phagozytose von Bakterien. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich ein signifikanter Unterschied bzgl. des Anteils phagozytischer PMN zwischen Tieren, die ausschließlich Wasser tranken und Tieren, die mehr als 20 L der Roboranstränke aufnahmen. Dieses Ergebnis kann als Hinweis betrachtet werden, dass die unmittelbar postpartale Aufnahme großer Tränkemengen einen positiven Einfluss auf die Aktivität von PMN haben kann. Eine mögliche Erklärung ist die Beeinflussung des geburtsbedingten oxidativen Stresses

(Andresen, 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass IGF-I immunmodulatorische Wirkungen hat (Clark, 1997). Es ist offen, ob es sich dabei um einen direkten oder einen indirekten Effekt handelt, da die Futtermittelaufnahme einerseits die IGF-I-Konzentration beeinflusst und diese wiederum als Determinante für die Funktionalität des Immunsystems diskutiert wird. Die positive Wirkung von IGF-I auf neutrophile Granulozyten konnte bislang nur *in vitro* gezeigt werden (Auernhammer und Strasburger, 1995).

Die Serumkonzentration der NEFA ist bei Kühen generell negativ korreliert mit der Verfügbarkeit an Kohlenhydraten zur Deckung des Energiebedarfs (Veenhuizen et al., 1991). Sinkt die Trockenmasseaufnahme in der letzten Woche vor der Kalbung, steigt die Konzentration der NEFA an (Grummer et al., 2004). Kühe mit geringer Futtermittelaufnahme und hoher NEFA-Konzentration sind somit besonders disponiert für Produktionskrankheiten (Grum et al., 1996b). Mit steigender Futtermittelaufnahme wird einer negativen Energiebilanz bzw. einem Lipomobilisationssyndrom entgegengewirkt. Folglich sinkt die NEFA-Konzentration. In der vorliegenden Studie war die NEFA-Konzentration bei Färsen in der Gruppe III, d. h. der höchsten Tränkeaufnahme, eine Woche *post partum* niedriger als bei Tieren, die nur Wasser aufgenommen hatten. Auch die Kühe dieser Gruppe zeigten einen signifikanten Abfall der Konzentration an freien Fettsäuren von der Woche der Geburt bis zur ersten Woche *post partum*. Diese Ergebnisse sind als ein Hinweis auf eine positive Beeinflussung der metabolischen Leitparameter durch die Aufnahme der Roborans-Tränke zu werten; vermutlich sind diese durch eine erhöhte Futtermittelaufnahme bei den Tieren mit unmittelbar *postpartal* hoher Tränkeaufnahme zu erklären.

Bei Pferden korreliert die IGF-I Konzentration im Plasma positiv mit der Futtermittelaufnahme (Sticker et al., 1995). Unterstellt man, dass die Färsen der Gruppe III (höchste Tränkeaufnahme *post partum*) in den folgenden Tagen vermehrt Futter aufnahmen, wäre damit der Anstieg in der IGF-I Konzentration zwischen der Geburt und der ersten Woche *post partum* in dieser Gruppe erklärbar.

Die IGF-I Konzentrationen im Plasma von Färsen liegen, vor allem bedingt durch das noch nicht abgeschlossene Wachstum, deutlich höher als die der Kühe (Taylor et al., 2004). Dies könnte die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Kühen und Färsen mit hoher Aufnahme der Roboranstränke erklären.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser orientierenden Studie Hinweise, dass durch die Aufnahme größerer Flüssigkeitsmengen der Roboranstränke positive Effekte auf den Gesundheitsstatus von Milchkühen durch eine Beeinflussung der Immunitäts- und Stoffwechselfparameter unmittelbar nach der Geburt erreicht werden können. Inwieweit das Auswirkungen auf das Auftreten von Gesundheitsstörungen und Milchleistung im Laktationsverlauf hat, ist das Ziel weiterer Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

1. **Andresen U (2004):** Akute-Phase-Protein Haptoglobin: ein Parameter zur Überwachung des Gesundheitsstatus von Hochleistungskühen? *Großtierpraxis* 5: 17-21.
2. **Auernhammer C, Strasburger C J (1995):** Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. *Eur J Endocrinol* 133: 635-645.
3. **Bradford B J, Allen M S (2008):** Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 34: 196-203.
4. **Clark R (1997):** The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 18: 157-179.
5. **Drackley J K (1999):** ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci* 82: 2259-2273.
6. **Geishauer T (2001):** Drenchen der Milchkuh: Wie und womit? *VETimpulse* 18: 14-15.
7. **Grum D E, Drackley J K, Younker R S, Lacount D W, Veenhuizen J J (1996):** Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 79: 1850-1864.
8. **Grummer R R, Mashek D G, Hayirli A (2004):** Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20: 447-470.

9. **Gundelach Y, Hoedemaker M (2007):** Einfluss des postpartalen Drenchens mit Calciumpropionat auf die Stoffwechselfgesundheit, Milchleistung, Fertilität und Allgemeingesundheit hochleistender Milchkühe. Tierärztliche Umschau 291-299.
10. **Kehrli M E, Nonnecke B J, Roth J A (1989):** Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. Am J Vet Res 50: 207-214.
11. **Mansfeld R (2008):** Steuerung des Metritis-/ Endometritis Risikos bei Milchkühen. Kompendium Nutztier, Parey Verlag.
12. **Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C (2009):** Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against Staphylococcus aureus in primiparous and multiparous cows during early lactation. Vet Microbiol 134: 106-112.
13. **Nordlung K. (2008):** AABP Kongress, Charlotte/ North Carolina.
14. **Opsomer G, Bossaert P, Cools S, De Kruif A (2007):** Reduced fertility in modern high yielding dairy cows: etiology and prevention. Reproductive health 13: 391-401.
15. **Sticker L S, Thompson D L JR, Fernandez J M, Bunting L D. Depew C L (1995):** Dietary protein and(or) energy restriction in mares: plasma growth hormone, IGF-I, prolactin, cortisol, and thyroid hormone responses to feeding, glucose, and epinephrine. J Anim Sci 73: 1424-1432.
16. **Taylor V J, Cheng Z, Pushpakumara P G, Beever D E, Wathes D C (2004):** Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. Vet Rec 155: 583-588.

17. **Van Kampen C, Mallard B A (1997):** Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 79-91.

18. **Veenhuizen J J, Drackley J K, Richard M J, Sanderson T P, Miller L D, Young J W (1991):** Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *J Dairy Sci* 74: 4238-4253.

Legende der Tabellen und Abbildungen:

Abb. 1

Durchflusszytometrische Bestimmung des Prozentsatzes neutrophiler Granulozyten bei Kühen [A] und Färsen [B], die FITC-markierte Bakterien phagozytierten [Phagozytoseaktivität]. Untersuchungszeitraum von drei Wochen ante partum bis vier Wochen post partum, wobei der hinterlegte Zeitraum (w 0 - 1) von besonderem Interesse ist. Differenzierung der Gruppen nach Art und Menge der aufgenommenen Flüssigkeit unmittelbar post partum. Ein Stern zeigt signifikante Unterschiede zwischen Gruppe I (Wasser) und Gruppe III (>20 Liter) an.

Abb. 2

Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität neutrophiler Granulozyten [Phagozytosekapazität] bei Kühen [A] und Färsen [B], die mit FITC-markierte Bakterien phagozytiert haben. Untersuchungszeitraum von drei Wochen ante partum bis vier Wochen post partum, wobei der hinterlegte Zeitraum (w 0 - 1) von besonderem Interesse ist. Differenzierung der Gruppen nach Art und Menge der aufgenommenen Flüssigkeit unmittelbar post partum.

Tab. 1

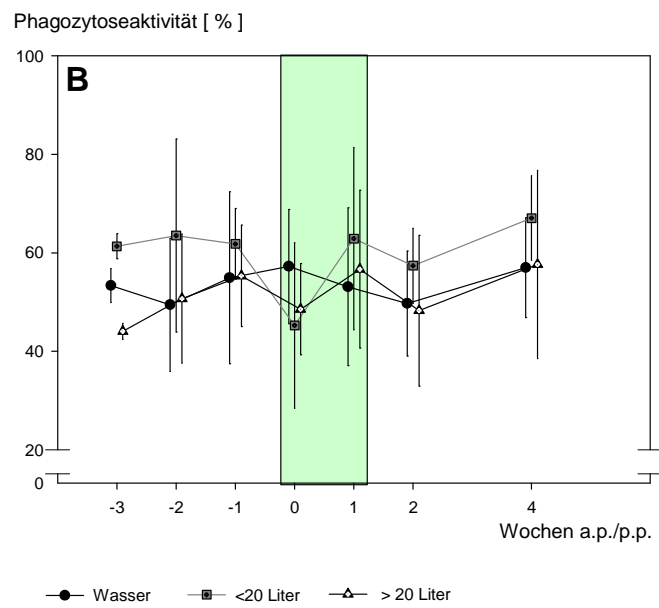
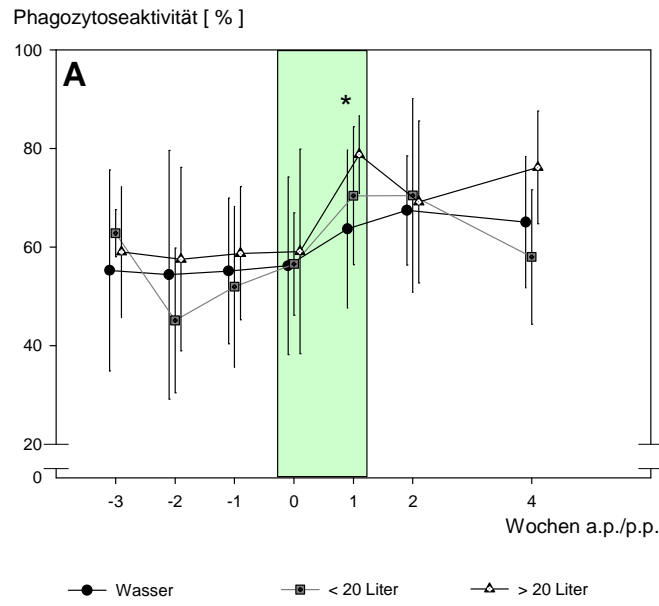
Konzentrationen freier Fettsäuren im Serum [$\mu\text{mol/L}$] in der Woche der Abkalbung und Woche 1 post partum, sowie die relative Änderung in Prozent. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

Tab. 2

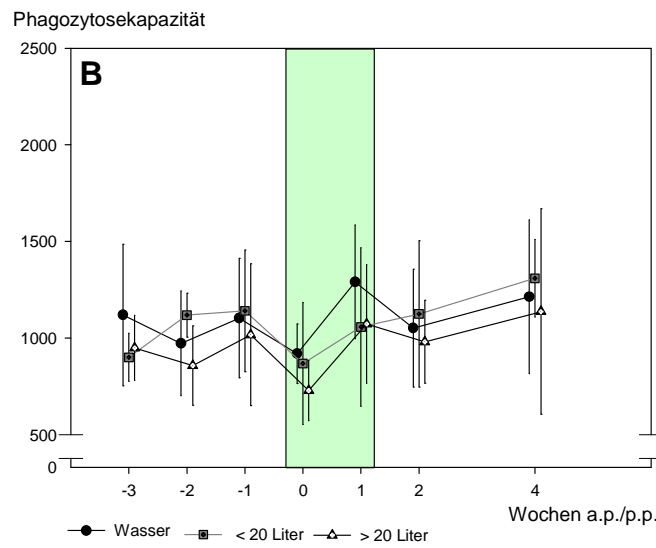
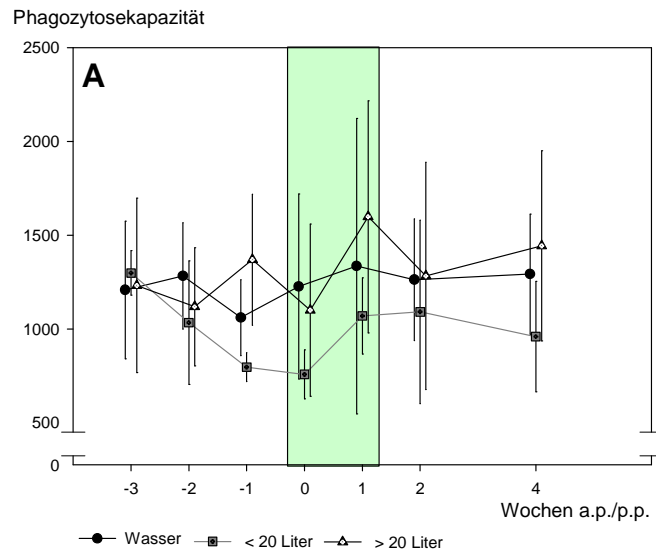
Konzentrationen von Gesamt- IGF-I im Plasma [ng/mL] in der Woche der Abkalbung und Woche 1 post partum, sowie die relative Änderung in Prozent. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

Tab. 3

Gesamt- Bilirubinkonzentrationen im Serum [$\mu\text{mol/L}$] in der Woche der Abkalbung und Woche 1 post partum, sowie die relative Änderung in Prozent. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



Sander, Abb. 1



Sander, Abb. 2

Sander, Tab. 1

		Abkalbung	Woche 1	rel. Änderung [%]
Wasser	Färsen	535 ± 285	421 ± 346	- 5,8
	Kühe	591 ± 272	577 ± 388	+ 9,7
< 20 Liter	Färsen	561 ± 454	349 ± 118	- 1,4
	Kühe	712 ± 187	499 ± 204	- 23,8
> 20 Liter	Färsen	573 ± 145	255 ± 121	- 52,3
	Kühe	1067 ± 658	745 ± 492	- 27,6

Sander, Tab. 2

		Abkalbung	Woche 1	rel. Änderung [%]
Wasser	Färsen	39,1 ± 15,1	48,9 ± 33,5	+ 38,6
	Kühe	24,8 ± 25,9	23,7 ± 31,6	- 18
< 20 Liter	Färsen	63,5 ± 45,9	36,1 ± 27,1	- 38,1
	Kühe	11,6 ± 8,1	13,5 ± 12,4	+ 27,2
> 20 Liter	Färsen	59,7 ± 34,6	81,2 ± 38,4	+ 61,7
	Kühe	12,4 ± 10,2	10,7 ± 10,2	- 1,3

Sander, Tab. 3

		Abkalbung	Woche 1	rel. Änderung [%]
Wasser	Färsen	5,1 ± 3,8	5,1 ± 3,4	+ 22,3
	Kühe	6 ± 2,4	5,5 ± 2,2	+ 6,4
< 20 Liter	Färsen	5,4 ± 2,3	4,8 ± 1,9	- 0,2
	Kühe	6,9 ± 2,9	6,5 ± 4,1	- 5,9
> 20 Liter	Färsen	4,1 ± 0,6	4,2 ± 0,8	+ 5
	Kühe	10,5 ± 7,2	9,2 ± 7	- 9,4

Übergreifende Diskussion

Inhaltlicher Schwerpunkt

Im Fokus der Dissertation stand die Transitperiode von Färsen und Kühen, da diese verglichen mit anderen Abschnitten des Reproduktionszyklus von Milchkühen einen für die Tiergesundheit besonders kritischen Zeitraum repräsentiert (DRACKLEY 1999). Der Verlauf der Transitperiode beeinflusst erheblich die Produktivität, die Gesundheit und die Fruchtbarkeit der Milchkuh. So bilden eine verlängerte Trockenstehzeit, Gesundheitsprobleme im ersten Monat der Laktation oder laborklinische wie auch klinische Parameter, die auf eine ausgeprägte negative Energiebilanz (NEB) hinweisen, wesentliche Risikofaktoren für ein verzögertes Einsetzen des Zyklus (OPSOMER 2007). Eine hohe Inzidenz von Produktionserkrankungen sowie deren negative Auswirkungen auf Fruchtbarkeitsparameter führen zudem zu enormen wirtschaftlichen Verlusten. Im Fokus dieser Arbeit standen infektiöse und nicht infektiöse Produktionskrankheiten. Dazu zählten Hypocalcämie, Nachgeburtsverhaltung, Metritis, Ketose, Labmagenverlagerung und Mastitis mit jeweils hoher Inzidenz in der Transitperiode (FLEISCHER et al. 2001). Der Anteil der im Rahmen dieser Dissertation befundeten Kühe, die mindestens eine Produktionserkrankung innerhalb der ersten drei Wochen der Laktation entwickelten, lag bei 61%.

Diese Problematik war der Hintergrund für die Zielsetzung der vorliegenden Studien, mittels antepartal erfasster Parameter die Risiken für das Auftreten von Produktionserkrankungen in den ersten drei Wochen der Laktation abzuschätzen. Zusätzlich wurde die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten im Zeitraum von drei Wochen ante partum bis vier Wochen post partum bestimmt, um damit einen weiteren potentiell wichtigen Risikofaktor für Produktionserkrankungen in diesem Zeitraum zu charakterisieren. Darüber hinaus erhielt die Hälfte der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Kalbung lauwarmes, mit einem Roboranspräparat angereichertes Wasser zur freien Aufnahme angeboten; die Auswirkungen auf postpartal wichtige

Parameter wurden erfasst, um das Potential von derartigen Energietränken zur Prävention von Gesundheitsstörungen besser einschätzen zu können.

Im Folgenden werden die aus den Ergebnissen der verschiedenen Teilstudien abgeleiteten Schlussfolgerungen im Kontext mit den übergeordneten Problemfeldern dargestellt und erläutert.

Vergleich von Erstkalbinnen mit pluriparen Kühen

1. Der Stoffwechsel pluriparer Kühe ist peripartal größeren Belastungen ausgesetzt als derjenige von Färsen.

Zweifelsohne unterscheidet sich der antepartale Stoffwechselstatus einer Färse, d. h. eines noch im Wachstum befindlichen und bislang nicht laktierenden Tieres von dem einer trockenstehenden, mehrkalbigen Kuh. Der Stoffwechsel einer Färse scheint antepartal weniger belastet zu sein als derjenige einer Kuh, da die Konzentrationen der metabolischen Leitparameter (BHBS, NEFA und Bilirubin) antepartal bei Färsen signifikant niedriger lagen als bei Kühen und als Indikatoren für eine Stoffwechselbelastung und eine negative Energiebilanz gelten (GRUMMER et al. 2004). Die Cholesterinkonzentrationen im Serum von Kühen sanken in dieser Studie auf ein niedrigeres Niveau als diejenigen der Färsen, was wiederum einen Hinweis auf eine unterschiedliche Stoffwechselbelastung zwischen Kühen und Färsen gibt.

2. Antepartal bestehen keine Unterschiede in den IGF-I Konzentrationen von Färsen und Kühen

In einer Studie von Taylor et al. (2004) waren Plasmakonzentration an IGF-I bei primiparen Kühen stets höher als bei pluriparen Kühen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten diese signifikanten Unterschiede in der IGF-I Konzentration zwischen Färsen und Kühen ab dem Zeitpunkt der Kalbung bis zur Woche +16 post partum. In vorliegender Arbeit konnten jedoch ante partum im Gegensatz zu den Ergebnissen von Taylor et. al. (2004) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3. Produktionserkrankungen stellen primär ein Problem pluriparer Kühe dar

In Übereinstimmung mit BOBE et al. (2004) war in der vorliegenden Studie die Inzidenz von Produktionskrankheiten bei Kühen in den ersten drei Wochen der Laktation nahezu doppelt so hoch (61%) wie bei Erstkalbinnen (Färsen) (33%). Die erhöhte peripartale Inzidenz von Produktionserkrankungen ist bei mehrkalbigen Kühen vorwiegend auf die ausgeprägtere negative Energiebilanz (NEB) zurückzuführen. Allgemein gesichert ist die positive Korrelation zwischen unmittelbar antepartaler Trockenmasseaufnahme und Tiergesundheit, Milchleistung und postpartaler Trockenmasseaufnahme (OETZEL 2004). Die Trockenmasseaufnahme bei Kühen ist vor der ersten oder zweiten Kalbung um 25%, bei Kühen ab der dritten Kalbung aber um 52% während der letzten 14 Tage der Trächtigkeit reduziert (MARQUARDT et al. 1977); folglich scheinen Kühe unter einer deutlicher ausgeprägten negativen Energiebilanz zu leiden als Färsen.

In Übereinstimmung mit Literaturangaben war das Risiko einer klinischen Ketose zudem bei den Färsen deutlich niedriger als bei Kühen (MARQUARDT et al. 1977); so erkrankte keine Färse in dieser Studie an einer klinischen Ketose. Auch die Inzidenz von Hypocalcämien ist bei Färsen außerordentlich gering (GOFF u. HORST

1997); das Risiko für das Auftreten von Milchfieber steigt von Laktation zu Laktation um jeweils 9% (LEAN et al. 2006) und prädisponiert darüber hinaus für Folgeerkrankungen (DEGARIS u. LEAN 2008).

Aufgrund der dargelegten Unterschiede zwischen primiparen und pluriparen Kühen wurden diese in der vorliegenden Studie getrennt ausgewertet.

4. Die Phagozytosegesamtleistung in der Transitperiode ist nicht ursächlich für die höhere Krankheitsinzidenz bei Färsen

Die Phagozytosegesamtleistung unterschied sich nicht zwischen primi- und pluriparen Kühen und war also augenscheinlich nicht ursächlich für eine erhöhte Krankheitsinzidenz bei pluriparen Kühen.

Metabolische Entgleisungen in der Transitperiode

Die Regulation und Koordination des Fettstoffwechsels gilt als eine Schlüsselkomponente der Anpassung an die Laktation (DRACKLEY 1999). Ist bei Kühen die Trockenmasseaufnahme reduziert, steigt die NEFA Konzentration im Serum an (GRUM et al. 1996b). Eine ansteigende Konzentration von NEFA im Serum kann sowohl durch vermehrte Lipolyse als auch durch verminderte Liponeogenese entstehen (HERDT 2000). GRUMMER et al. (2004) beschrieben, dass eine plötzliche Veränderung in der Futteraufnahmemenge das wichtigste, die Lipolyse initiierende Signal darstellt. DE BOER et al. (1985) stellten fest, dass die NEFA-Konzentration infolge einer reduzierten Futteraufnahme ein bis zwei Wochen vor der Kalbung ansteigt. Dieser Anstieg wird darüber hinaus durch Stressoren begünstigt (GRUMMER 1993). Sinkt die Trockenmasseaufnahme in der letzten Woche vor der Kalbung auf einen Wert von unter 11 kg pro Tag, steigt die Konzentration der NEFA im Serum deutlich an (GRUMMER et al. 2004). Eine

Akkumulation von Triglyceriden in der Leber und konstant hohe Werte von NEFA im Serum zeigen also eine inadäquate Adaptation an die Energienachfrage der ersten Laktationswochen an; auch erniedrigte Blutglucose- und Insulinkonzentrationen deuten darauf hin (JORRITSMA et al. 2003). Eine erhöhte NEFA Konzentration bedingt eine weitere Reduktion der Futtermittelaufnahme (GRUMMER 1995). Bei einem Glucosemangel steigt der Gehalt an NEFA (DE BOER et al. 1985). Acetyl-CoA unterdrückt den Glucoseverbrauch und stimuliert die Gluconeogenese. Auch das bei der Lipolyse im Fettgewebe aus Speichertriglyceriden freigesetzte Glycerol kann zur Gluconeogenese beitragen.

Grundvoraussetzungen für die Ketogenese sind eine gesteigerte Lipolyse, ein geringes Verhältnis von Insulin zu Glucagon, sowie eine geringe Konzentration an Malonyl-CoA (HERDT 2000). Die Anfälligkeit für eine Ketose ist folglich besonders hoch bei einer hohen Milchleistung, niedrigen Insulinkonzentrationen und einer Hypoglykämie (DUFFIELD et al. 1997), und zudem abhängig von metabolischen Faktoren wie der Trockenmasseaufnahme während der ersten Tage nach der Kalbung (GRUMMER 1993). Der Triglyceridgehalt des Leberparenchyms ist erhöht (DRACKLEY 1999). Nach VEENHUIZEN et al. (1991) steigen Insulin- und Glucosekonzentrationen im Gegensatz zu Ergebnissen früherer Arbeiten bei Kühen mit einer klinischen Ketose an, es kommt aber zu einer Abnahme der Insulinansprechbarkeit, d. h. einer Insulinresistenz in der frühen Laktation.

5. Die Einteilung der Ketose-Typen nach Holtenius und Holtenius (1996) konnte in der vorliegenden Studie nur teilweise bestätigt werden

In der zweiten Laktationswoche besteht eine erhöhte Inzidenz von Hyperketonämien bei Kühen (HOLTENIUS u. HOLTENIUS 1996). Demzufolge sind zwei unterschiedliche Ätiopathogenesen der bovinen Ketose zu unterscheiden: Die „Ketose der Armen“ (Typ I) tritt spontan vor allem zwischen der dritten und sechsten Laktationswoche auf und wird durch die ungenügende Verfügbarkeit von

Vorläufersubstanzen der Gluconeogenese (Propionat, Glycerin, Laktat, glucoplastische Aminosäuren) verursacht; entsprechend ist laborklinisch eine Hypoglycämie sowie eine Hypoinsulinämie bei maximaler Gluconeogeneserate nachweisbar. Die BHBS-Serumkonzentrationen sind erhöht, die Leber erscheint jedoch nicht massiv verfettet. Demgegenüber entsteht die „Ketose der Reichen“ (Typ II) durch eine Überkonditionierung in der Trockenstehperiode und tritt bereits zwischen der ersten und dritten Laktationswoche gehäuft auf. Vorläufersubstanzen für die Gluconeogenese sind bei Typ II ausreichend vorhanden. Im Blutserum sind eine Hyperglycämie und Hyperinsulinämie gekoppelt mit einer Insulinresistenz bei verminderter Gluconeogenese nachweisbar. Die Serumkonzentrationen des BHB sind erhöht und die Leber ist auffällig verfettet. Typ II ist außerdem häufig mit anderen Erkrankungen assoziiert.

Entsprechend dieser Einteilung müssten in der eigenen Studie ausschließlich Ketosen vom Typ II aufgetreten sein, denn Erkrankungen wurden lediglich in den ersten drei Wochen der Laktation erfasst. Übereinstimmend mit HOLTENIUS und HOLTENIUS (1996) waren die Konzentrationen an BHB und NEFA bei in der frühen Laktation ketotischen Tieren teilweise signifikant höher als bei klinisch gesunden Kühen. Eine Hyperinsulinämie wurde jedoch bei den Kühen, die eine Ketose entwickelten, nicht festgestellt. In Woche eins und zwei post partum lag die Plasmakonzentration des Insulins ketotischer Kühe sogar niedriger als diejenige klinisch gesunder Kühe. Darüber hinaus zeigten sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede in Serumkonzentrationen von Glucose zwischen ketotischen und klinisch gesunden Kühen, was ebenfalls gegensätzlich zu den Ergebnissen von BUTLER und SMITH (1989) ist; diese beschrieben, dass die Blutglucosekonzentration bei Kühen mit Hyperketonämie während des Überganges der Trockenstehperiode zur frühen Laktation sehr deutlich sinkt. Die Glucosekonzentrationen waren in der vorliegenden Studie an allen antepartal und postpartal gemessenen Zeitpunkten konstant. Ein Peak bestand lediglich stressbedingt zum Zeitpunkt der Kalbung.

Mit Einsetzen der Laktation werden bei vielen Tieren neben sinkenden Konzentrationen von Glucose und Insulin auch erhöhte BHB-Konzentrationen im Serum nachgewiesen (NIKOLIC et al. 2003). Ketonkörper haben in vielen Geweben eine wichtige Funktion als alternatives energiereiches Substrat und als Signalsubstanz in der Regulation des Energiemetabolismus (DE BOER et al. 1985). So ist das Lebertriglycerid: Glycogen-Verhältnis signifikant und positiv mit der Serumkonzentration des BHB korreliert (REIST et al. 2000). BHB ist zudem auch Substrat für die Milchfettsynthese (VEENHUIZEN et al. 1991).

Insulin ist der Schlüsselregulator für die Nährstoffverteilung aus dem Körpergewebe in Richtung Milchdrüse während der Transitperiode, und ist darüber hinaus als ein Signalgeber des Energiestatus im zentralen Nervensystem bekannt (VAN KNEGSEL et al. 2007). Insulin bewirkt eine erhöhte Glucoseaufnahme in den Muskel, eine verminderte hepatische Gluconeogenese, inhibiert die Lipolyse, stimuliert die Liponeogenese, damit die hepatische Triglycerid-Konzentration (GRUMMER 1993) und reduziert die Ketogenese über die Beeinflussung der Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT-1).

In dieser Studie wurden die niedrigsten Insulinkonzentrationen je nach auftretendem Erkrankungsbild zum Zeitpunkt der Kalbung oder in der ersten Laktationswoche gemessen; in den folgenden Wochen wurde eine konsekutive Zunahme nachgewiesen. Dieser Verlauf der Insulinkonzentration wurde auch von BUTLER et al. (2004) beschrieben. Ein relativer Mangel an Insulin fördert die Lipolyse peripheren Fettgewebes getriggert durch Glucagon (GONG et al. 2002) und dieser Effekt kann sich bei nahender Geburt verstärken (HOLTENIUS et al. 1993). Die im Zusammenhang mit einer Insulinresistenz erhöhte Ansprechbarkeit des Fettgewebes auf lipolytische Signale zu reagieren, resultiert in erhöhten NEFA-Konzentrationen im Serum. Die Konzentration von NEFA im Serum ist somit negativ mit der Insulinkonzentration korreliert (BIGNER et al. 1996). In dieser Studie zeigten sich niedrigste NEFA und höchste Insulinkonzentrationen in Woche -1 ante partum, eine signifikante Korrelation war jedoch nicht nachweisbar. Eine Behandlung mit Insulin

führte in einer Studie von BUTLER et al. (2004) zu einer Verminderung der Serumkonzentration von NEFA und erhöhte die Konzentration von totalem und freiem IGF-I. In dieser Studie zeigten sich geringfügige Korrelationen zwischen Insulin- und IGF-I-Konzentrationen bei Kühen und Färsen ante partum. Postpartal zeigte sich allerdings keine Korrelation.

In einer experimentellen Studie von NICOLIC et al. (2003) wurde durch Applikation eines Endotoxins bzw. TNF- α die Konzentration an Insulin im Plasma erhöht und eine Insulinresistenz im Organismus induziert; bei keiner der von uns untersuchten klinischen Erkrankungsbilder zeigten sich signifikante Unterschiede in Plasmakonzentrationen von Insulin verglichen mit klinisch gesunden Tieren. Glucose und Insulinkonzentrationen korrelieren positiv (BIGNER et al. 1996), was in dieser Studie allerdings nicht belegt werden konnte.

Übereinstimmend mit SCHWALM und SCHULTZ (1976) zeigte sich in dieser Studie ein abnehmender Verlauf der Cholesterinkonzentrationen im Serum bis zur Kalbung bei Färsen und Kühen.

Bedeutung und Verlauf der Plasmakonzentration von IGF-I im peripartalen Zeitraum

6. Peripartal hat die Futteraufnahme keinen Einfluss auf die IGF-I Plasmakonzentration

Bei Kühen bestehen unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Abhängigkeit der IGF-I Plasma Gesamtkonzentrationen von der Futteraufnahme. In einer Studie von GRUM et al. (1996a) zeigten unterschiedliche antepartal gefütterte Diäten bei Kühen keinen Einfluss auf die IGF-I Konzentration im Plasma. Auch VAN KNEGSEL et al. (2007) beschrieben, dass durch Fütterung einer lipo- oder glucogenen Diät keine Unterschiede in der Konzentration von IGF-I bestanden. Im Gegensatz dazu

erkannten JORRITSMA et al. (2003) aber eine enge Assoziation zwischen IGF-I und dem metabolischen Status von Kühen. BEAM and BUTLER (1999) postulierten eine positive Korrelation zwischen IGF-I Konzentrationen und Futteraufnahme sowie der Körperkondition. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Schilddrüsenhormon-Achse und der GH/IGF Achse (SVANBERG et al. 2001). Folglich kann der Schilddrüsenhormonstatus die Futteraufnahme beeinflussen, was nachfolgend durch Effekte auf die GH-Sekretion oder auf Rezeptorlevel Auswirkungen auf IGF-I Konzentrationen zeigen kann (NIKOLIC et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Trockenmasseaufnahme der Versuchstiere nicht bestimmt. Dennoch kann von einer vergleichsweise hohen Futteraufnahme in Woche -1 ausgegangen werden, da minimale NEFA Konzentrationen ante partum die vergleichsweise gute Energieversorgung zu diesem Zeitpunkt widerspiegeln, die durch eine Rationsänderung sowie uneingeschränkten Zugang zum Futter erreicht wurde. Es erfolgte jedoch kein Anstieg der IGF-I Plasma Konzentrationen eine Woche ante partum. Diese Tatsache zeigt, dass zumindest in diesem Zeitraum kein direkter Zusammenhang zwischen Futteraufnahme und IGF-I Konzentrationen im Plasma bestand.

7. Die GH /IGF /IGF-Bindungsprotein -Achse wird peripartal entkoppelt

GH spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiemetabolismus. Es gilt als contra-Insulin Hormon und vermindert die Liponeogenese (DE BOER et al. 1985). Die durchschnittliche GH Konzentration steigt im Übergang von der Trockenstehperiode zur frühen Laktation, sowie bei Vorliegen einer Ketose (THISSEN et al. 1994) oder negativen Energiebilanz an (RABINOWITZ et al. 1966). Auch DE BOER et al. (1985) beschreiben einen Anstieg der GH Konzentrationen als direkte Folge einer reduzierten Futteraufnahme und einer ketotischen Stoffwechsellage. GH stimuliert bei Kühen die systemische IGF-I Produktion (JORRITSMA et al. 2003), folglich müsste die IGF-I Konzentration zu diesem Zeitpunkt ansteigen. Während der Transitperiode besteht aber eine Resistenz der

Leber auf GH, die stimulatorische Wirkung auf die Synthese von IGF-I wird entkoppelt (WOOK KIM et al. 2004), was die niedrigen IGF-I Konzentrationen peripartal erklärt. MC GUIRE et al. (1991) sehen ernährungsbedingte Imbalancen als ursächlich für Veränderungen in der GH /IGF Achse an. Es bestehen hohe inter-individuelle Unterschiede in der GH Rezeptoren mRNA Expression um den Zeitraum der Geburt und folglich in IGF-I Konzentrationen einzelner Kühe (JIANG et al. 2005). Darüber hinaus zeigte eine Studie von NICOLIC et al. (2003), dass Endotoxin und TNF-alpha die Plasma Konzentrationen von GH; IGF-I und IGFBP-3 reduzierten.

8. IGF-I hat durch den Einfluss auf Reproduktionsparameter eine große wirtschaftliche Bedeutung

Der im Folgenden dargestellte Einfluss von IGF-I auf Reproduktionsparameter wurde in dieser Studie nicht überprüft, soll aber aufgrund seiner potentiell wirtschaftlichen Relevanz dennoch Erwähnung finden. GH, Insulin und IGF-I spielen eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der ovariellen Funktion bei Milchvieh (BUTLER et al. 2004). IGF-I und Insulin repräsentieren metabolische Signale der Wiederaufnahme der ovariellen Funktion post partum (GONG et al. 1993). Geringe Konzentrationen an IGF-I vor und nach der Kalbung sind assoziiert mit einem verlängerten postpartalen anöstrischen Intervall (TAYLOR et al. 2004, BEAM u. BUTLER 1999) und mit dem Ausbleiben der Konzeption (KAWASHIMA et al. 2007). Pluripare Kühe, die in der Woche nach der Kalbung eine Konzentration von mehr als 25ng/ml IGF-I im Plasma aufweisen, nehmen häufiger während des ersten Zyklus auf, als Kühe mit geringeren Konzentrationen (ROBERTS et al. 1997). Das IGF-I System beeinflusst die Etablierung und die Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit (TAYLOR et al. 2004). Ohne ein funktionierendes IGF-I System ist FSH unfähig die normalen follikulären Funktionen aufrecht zu erhalten, darüber hinaus beeinflusst IGF-I direkt das Wachstum des Embryos (TAYLOR et al. 2004). Hohe IGF-I Konzentrationen sind förderlich für die ovarielle Steroidgenese. Insulin und IGF-I stimulieren die Proliferation, die Progesteron- und die Östradiolproduktion von

Granulosazellen, sowie die Androgenproduktion in Thecazellen. Es besteht ein synergistischer Effekt zwischen IGF-I und LH sowie FSH (JORRITSMA et al. 2003). IGF-I ist ein sehr potenter Stimulator der Progesteron- und Oxytocinfreisetzung in Granulosazellen (SCHAMS et al. 1999).

Antepartale Risikokalkulation des Auftretens von Produktionskrankheiten

In dieser Studie sollte untersucht werden ob bereits ante partum, also vor Auftreten des klinischen Bildes einer Produktionserkrankung, Unterschiede in Laborparametern zwischen postpartal erkrankten und klinisch gesunden Kühen festzustellen sind, die eine antepartale Risikokalkulation zulassen.

9. Den in der frühen Laktation auftretenden Produktionskrankheiten gehen bereits antepartal Veränderungen in Blutparametern voraus

Von erhöhten NEFA-Konzentrationen während der letzten sieben Tage vor dem Kalben ist bekannt, dass sie direkt mit einem höheren Risiko für das Auftreten einer Ketose, einer Labmagenverlagerung und einer Nachgeburtsverhaltung assoziiert sind (DYK 1995). Eine exzessive Fettmobilisation geht mit einer erhöhten Inzidenz peripartaler Gesundheitsstörungen einher (DRACKLEY 1999). Darüber hinaus wurde in einer in vitro Studie von SCALIA et al. (2006) dargestellt, dass NEFA Konzentrationen einen negativen Einfluss auf Funktionen von neutrophilen Granulozyten, z. B. die ROS (reactive oxygen species)-Produktion sowie ihre Lebensfähigkeit hatten.

Bei den Versuchstieren dieser Studie, die in den ersten drei Wochen der Laktation eine Erkrankung (Ketose, Labmagenverlagerung, Metritis, Ret. Sec., Mastitis, Hypocalcämie) entwickelten, zeigte sich ein Anstieg der NEFA Konzentration im Serum bereits sechs Wochen ante partum (Kapitel 1, Abb. 4). Kühe dieser Studie,

die während der ersten drei Laktationswochen gesund blieben, zeigten antepartal konstant niedrige NEFA-Konzentration im Serum. Diese Kühe nahmen folglich vor der Kalbung eine für ihren Bedarf ausreichende Menge an Trockenmasse auf.

10.IGF-I ist der einzige zur antepartalen Risikokalkulation geeignete Parameter, der sich als unabhängig von der Art der in der frühen Laktation auftretenden Erkrankung erweist

IGF-I erwies sich in den von uns untersuchten Blutparametern, als am besten geeignet für die antepartale Einschätzung des postpartalen Gesundheitsstatus. Verglichen mit klinisch gesunden Kühen erwiesen sich erniedrigte IGF-I Konzentrationen ante partum als unabhängig von der Art der postpartal auftretenden Produktionserkrankung, sowie als indikativ für das Auftreten einer postpartalen Produktionserkrankung. Hierfür ergaben sich eine Sensitivität und ein positiver prädiktiver Wert von 79%, sowie eine Spezifität und ein negativer prädiktiver Wert von 68%. Offen bleibt, ob erniedrigte IGF-I Konzentrationen ante partum ursächlich für Erkrankungen in den ersten drei Wochen der Laktation sind, oder die Folge von einer bereits in dieser Zeit im Vergleich zu gesunden Tieren reduzierten Futteraufnahme.

11.NEFA- und Bilirubin- Konzentrationen erweisen sich bereits antepartal als prädiktiv für das Auftreten einer Ketose und/oder Labmagenverlagerung

Die Konzentration an NEFA im Serum erwies sich als der am besten geeignete Parameter, um bereits ante partum das Risiko für eine Ketose und/oder Labmagenverlagerung in den ersten drei Wochen der Laktation abzuschätzen. Hierfür ergaben sich eine Sensitivität und ein positiver prädiktiver Wert von 83%, sowie eine Spezifität und ein negativer prädiktiver Wert von 94%.

WEST (1990) beschrieb eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Ausmaß einer Fettinfiltration der Leber bei Kühen mit klinischer Ketose oder einem Fat-cow-Syndrom und der Konzentration von Gesamtbilirubin im Plasma. In dieser Studie zeigten sich bereits an allen antepartal erfassten Zeiträumen signifikant höhere Bilirubinkonzentrationen bei Kühen, die in der frühen Laktation eine Ketose entwickelten verglichen mit klinisch gesunden Kühen. Bilirubin erwies sich damit als gut geeigneter Parameter um bereits ante partum das Risiko für das Auftreten einer Ketose und/oder Labmagenverlagerung zu kalkulieren. Hierfür ergaben sich eine Sensitivität von 100%, ein positiver prädiktiver Wert von 60%, eine Spezifität von 75% und ein negativer prädiktiver Wert von 100%.

12. Antepartale BHB Konzentrationen weisen auf eine Produktionserkrankung in der frühen Laktation hin, sind aber vor allem für die Risikokalkulation im Hinblick auf eine Ketose/Labmagenverlagerung geeignet

Das Risiko an einer klinischen Ketose oder eine Labmagenverlagerung zu erkranken war in einer Studie von DUFFIELD et al. (1997) bei Kühen mit BHB Konzentrationen über 1,44 mmol/l um das Dreifache erhöht verglichen mit normoketonämischen Serumkonzentrationen. Höchstwerte zeigten sich eine Woche bevor klinische Zeichen einer Ketose auftraten. In dieser Studie waren bereits zwei Wochen ante partum signifikante Unterschiede festzustellen, die eine antepartale Risikokalkulation im Hinblick auf die Entwicklung einer Ketose oder/und Labmagenverlagerung zuließen, wenn auch weniger zuverlässig als durch NEFA- oder Bilirubin- Konzentrationen. In dieser Studie zeigte sich zwar in Woche 2 ante partum, dass die Tiere, die in den ersten drei Wochen der Transitperiode erkrankten, signifikant höhere Konzentrationen an BHB im Plasma aufwiesen als klinisch gesunde Tiere, bei differenzierter Betrachtung der Erkrankungsbilder erwiesen sich die BHB Konzentrationen jedoch als indikativ für das Auftreten einer Ketose und/oder Labmagenverlagerung.

13. Eine Produktionskrankheit prädisponiert für das Auftreten weiterer Produktionskrankheiten

Entwickelt ein Tier eine Produktionskrankheit (wie Pansenacidose, Ketose, Hypocalcämie), so erhöht sich das Risiko für das Auftreten anderer klinischer Erkrankungen wie z.B. Labmagenverlagerungen (DANN u. DRACKLEY 2005). Von allen erkrankten pluriparen Kühen entwickelten 16% zwei und 20% drei Produktionskrankheiten in den ersten drei Wochen der Laktation. Sechs von zehn Kühen dieser Studie, die unter einer Hypocalcämie litten, entwickelten eine weitere Produktionskrankheit. Da in dieser Studie ausschließlich klinisch manifeste Erkrankungen erfasst und ausgewertet wurden, kann keine Aussage zu Implikationen von subakuten Pansenacidosen oder subklinischen Ketosen getroffen werden, deren besondere Bedeutung von vielen Autoren betont wird (DUFFIELD et al. 1997; WALSH et al. 2007).

Veränderungen im Immunsystem zum Zeitpunkt der Kalbung und peripartal

Im peripartalen Zeitraum erreichen endokrinologische Anpassungsreaktionen ihr Maximum (GRUMMER et al. 2004). Hohe Konzentrationen an zirkulierenden Hormonen wie Östrogen, Progesteron und Glucocorticoiden können wichtige Funktionen der Lymphozyten unterdrücken (KIMURA et al. 2002). Kalbende Kühe sind in der Transitperiode einem größeren Risiko ausgesetzt an Infektionen zu erkranken (BERTOK 1998). Die zelluläre Immunantwort ist peripartal vermindert (OHTSUKA et al. 2004) und führt zu einer höheren Anfälligkeit der Kuh für Erkrankungen (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997). Darüber hinaus besteht eine signifikante Variation aller T-Zell Teilmengen um den Geburtszeitraum, insbesondere zum Zeitpunkt der Kalbung (OHTSUKA et al. 2004). Veränderungen bestehen sowohl in der Anzahl als auch in der Funktion bestimmter Subpopulationen (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997). SHAFER-WEAVER et al. (1999) sehen Trächtigkeit

und Laktation als ursächlich hierfür an, nicht etwa bestehende Gesundheitsprobleme. Eine Abnahme der T-Zellen zum Kalbezeitpunkt ist vermutlich mit einer systemischen Immunsuppression verbunden und führt zum Auftreten von Infektionskrankheiten (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997). Auch von Ketonkörpern ist ein potentiell inhibitorischer Effekt auf weiße Blutzellen bekannt (WHITE, 1968). T-Zell Teilmengen sind um den Geburtszeitraum herum signifikant erniedrigt (OHTSUKA et al. 2004). Bei gesunden Kühen erfolgt eine Abnahme von CD3+, CD4+ and CD8+ T Zellen um den Kalbezeitraum herum (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997). Reduzierte prozentuale Anteile an CD2+, CD4+ und CD8+ Teilmengen und begleitend an Monozyten wurden postpartal nachgewiesen (KIMURA et al. 2002). Es bestehen signifikant geringere Werte für CD2+ und CD4+ Zellen zwischen drei Wochen vor der Kalbung und drei Wochen nach der Kalbung (SHAFER-WEAVER et al. 1999). Die größten Variationen der Lymphozytensubpopulationen, nämlich CD2+, CD4+ und CD8+ T Zellen treten zwischen drei Wochen vor der Kalbung und der Woche nach der Kalbung auf (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997). Bis nach der Kalbung bleiben B-Zell und MHCII+ Populationen relativ konstant, um dann signifikant abzunehmen (VAN KAMPEN u. MALLARD 1997).

Neutrophile Granulozyten

OPSOMER (2007) beschrieb, dass Kühe in einer negativen Energiebilanz, bedingt durch eingeschränkte Funktionen neutrophiler Granulozyten, unter einer Immunsuppression leiden, was sie anfälliger für Puerperalinfektionen machte. Eine eingeschränkte Funktion neutrophiler Granulozyten wird von SHAFER-WEAVER et al. (1999) als der bestimmende Faktor für die Entwicklung von Nachgeburtsverhaltungen angesehen. Die chemotaktische Aktivität neutrophiler Granulozyten war bei Kühen mit einer Nachgeburtsverhaltung eine Woche ante partum bis einen Tag post partum im Vergleich zu gesunden Tieren signifikant erniedrigt (KIMURA et al. 2002). Aus dem Blut von Kühen mit einer Nachgeburtsverhaltung isolierte neutrophile Granulozyten zeigten eine deutlich eingeschränkte Funktion beginnend ante partum und anhaltend bis etwa zwei Wochen post partum (KIMURA et al. 2002).

Ziel dieser Studie war es zu prüfen, ob übereinstimmend die Phagozytoseaktivität und –kapazität neutrophiler Granulozyten in der Transitperiode vermindert ist. Im Hinblick auf die unterschiedliche Krankheitsinzidenz wurde überprüft, ob sich Phagozytoseleistungen zwischen Färsen und Kühen unterscheiden. Darüber hinaus wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Gesamt-IGF-I im Plasma mit Phagozytoseaktivität und –kapazität neutrophiler Granulozyten besteht, da bei humanen neutrophilen Granulozyten beschrieben wurde, dass durch IGF-I Phagozytoseleistungen in vitro gesteigert wurden (AUERNHAMMER u. STRASBURGER 1995). Außerdem erwies sich IGF-I als der am besten geeignete Parameter bezüglich der antepartalen Risikoabschätzung für eine Produktionskrankheit in der frühen Laktation.

14. Die Phagozytosekapazität von Färsen ist zum Zeitpunkt der Kalbung auf einem minimalen Level

Jede gesunde Kuh weist bei Einsetzen der Geburt einen erhöhten Wert für Cortisol auf (NIKOLIC et al. 2003). Ein erhöhter Cortisol- und im Zusammenhang damit ein erhöhter Glucosewert war in dieser Studie bei der Kalbung festzustellen und ist in einer Stressreaktion begründet (MOSTL u. PALME 2002). Glucocorticoide sind als immunsuppressiv wirkende Substanzen bekannt, und niedrigste Phagozytoseleistungen zeigten sich übereinstimmend hiermit zum Zeitpunkt der Kalbung.

15. Die Phagozytosegesamtleistung unterscheidet sich nicht zwischen primi- und pluriparen Kühen

Bei Berechnung der Phagozytosegesamtleistung als Produkt aus Phagozytoseaktivität, Phagozytosekapazität und der Anzahl neutrophiler Granulozyten, zeigte sich, dass keine Unterschiede zwischen Färsen und Kühen

bestehen. Die geringere Phagozytosekapazität von Färsen zum Zeitpunkt der Geburt wird mutmaßlich durch eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten kompensiert.

16. Die Phagozytoseleistungen und die Anzahl neutrophiler Granulozyten sind nicht mit der IGF-I Plasmakonzentration korreliert

In dieser Studie ergaben sich keine Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen an Gesamt-IGF-I und der Phagozytoseaktivität, der Phagozytosekapazität oder der Anzahl neutrophiler Granulozyten bei Kühen. Bisher wurden direkte stimulatorische Effekte von IGF-I auf neutrophile Granulozyten allerdings nur in vitro untersucht und belegt. Unterschiedliche Ergebnisse dieser Arbeit verglichen mit AUERNHAMMER und STRASBURGER (1995) können darin begründet sein, dass in vitro deutlich höhere Konzentrationen an IGF-I eingesetzt wurden als physiologisch gefunden werden. Außerdem ist lediglich das freie IGF-I biologisch aktiv. Der Anteil der an Bindungsproteine gebunden vorliegt macht 95% des gesamten IGF-I aus. In vorliegender Arbeit wurde das Gesamt-IGF-I bestimmt, was zusätzlich differierende Ergebnisse begründen kann. HOEBEN et al. (2000) fanden in einer in vivo Studie einen förderlichen Effekt von injiziertem Somatotropin auf die Diapedese und Chemilumineszenz von PMN. Außerdem zeigten Kühe, denen Somatotropin injiziert wurde höhere Zellzahlen an PMN verglichen mit einer Kontrollgruppe. Ob dieser Effekt direkt durch das Somatotropin, oder aber durch im Folgenden erhöhte IGF-I Konzentrationen zustande kam, bleibt offen.

Bei den Ergebnissen zu Phagozytoseleistungen von neutrophilen Granulozyten peripartal bleibt zu beachten, dass die Leistungsparameter an aus dem Vollblut stammenden Zellen bestimmt wurden. Ob eine Übertragung auf deren Funktionen im peripheren Gewebe möglich ist, muss offen bleiben. In einer weiterführenden Studie sollten außerdem weitere Funktionsmerkmale neutrophiler Granulozyten miteinbezogen werden

Managementfaktoren

17. Managementfaktoren haben entscheidenden Einfluss auf den Verlauf antepartaler NEFA- Konzentrationen

Die NEFA-Konzentrationen begannen in dieser Studie bereits in der Woche -6 ante partum anzusteigen. Ein bis zwei Wochen a. p. erfolgte jedoch ein signifikanter Abfall der NEFA Konzentrationen mit minimalen antepartalen Konzentrationen in Woche -1 im Gegensatz zu Angaben in der Literatur. Diese vergleichsweise geringe Konzentration an NEFA ergab sich offenbar aus dem Haltungs- und Fütterungsmanagement auf dem Versuchsbetrieb. Während im Aufstallungsbereich für trockenstehende Tiere auch eine Ration für trockenstehende Tiere gefüttert wurde und die Zahl der Tiere die Zahl der Fressplätze überstieg, waren die Kühe ab Woche -2 in einem Transitbereich untergebracht und erhielten hier dieselbe Ration wie hochlaktierende Tiere; die Zahl der Fressplätze war höher als die der in diesem Bereich aufgestellten Tiere. Ein uneingeschränkter Zugang zum Futter war in diesem Bereich also jederzeit gewährleistet. Bei allen Tieren zeigte sich ein positiver Effekt des Managements auf die NEFA Konzentration im Serum, wenn auch die später erkrankenden Tiere nicht den Level der Tiere, die gesund blieben, erreichten. Entsprechend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass durch ein optimiertes Management in den letzten Wochen ante partum ein weiterer Anstieg der NEFA im Serum vermieden werden kann.

18. Die Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen unmittelbar nach der Kalbung hat einen positiven Einfluss auf die Futteraufnahme sowie auf die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten

Beide Untersuchungen zum Einsatz eines Roboranspräparates direkt nach der Kalbung hatten lediglich orientierenden Charakter. Dennoch konnte sowohl eine erhöhte Trockenmasseaufnahme nach Aufnahme großer Tränkemengen, als auch ein positiver Effekt auf die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten bei Kühen festgestellt und statistisch gesichert werden. Hiermit ergibt sich ein weiterer potentieller Einflussfaktor auf den Verlauf der Transitperiode durch Managementfaktoren.

Literatur

AUERNHAMMER, C. J. u. C. J. STRASBURGER (1995):

Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system.

Eur J Endocrinol 133, 635-645

BEAM, S. W. u. W. R. BUTLER (1999):

Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows.

J Reprod Fertil Suppl 54, 411-424

BERTOK, L. (1998):

Endotoxins and endocrine system.

Domest Anim Endocrinol 15, 305-308

BIGNER, D. R., J. P. GOFF, M. A. FAUST, J. L. BURTON, H. D. TYLER u. R. L.

HORST (1996):

Acidosis effects on insulin response during glucose tolerance tests in Jersey cows.

J Dairy Sci 79, 2182-2188

BOBE, G., J. W. YOUNG u. D. C. BEITZ (2004):

Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows.

J Dairy Sci 87, 3105-3124

BUTLER, S. T., S. H. PELTON u. W. R. BUTLER (2004):

Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows.

Reproduction 127, 537-545

BUTLER, W. R. u. R. D. SMITH (1989):

Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle.

J Dairy Sci 72, 767-783

DANN, H. M. u. J. K. DRACKLEY (2005):

Carnitine palmitoyltransferase I in liver of periparturient dairy cows: effects of prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders.

J Dairy Sci 88, 3851-3859

DE BOER, G., A. TRENKLE u. J. W. YOUNG (1985):

Glucagon, insulin, growth hormone, and some blood metabolites during energy restriction ketonemia of lactating cows.

J Dairy Sci 68, 326-337

DEGARIS, P. J. u. I. J. LEAN (2008):

Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles.

Vet J 176, 58-69

DRACKLEY, J. K. (1999):

ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?

J Dairy Sci 82, 2259-2273

DUFFIELD, T. F., D. F. KELTON, K. E. LESLIE, K. D. LISSEMORE u. J. H.

LUMSDEN (1997):

Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario.

Can Vet J 38, 713-718

DYK (1995):

Prepartum nonsterified fatty acids in plasma are higher in cows developing periparturient health problems.

J Dairy Sci 78, 264

FLEISCHER, P., M. METZNER, M. BEYERBACH, M. HOEDEMAKER u. W. KLEE (2001):

The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows.

J Dairy Sci 84, 2025-2035

GOFF, J. P. u. R. L. HORST (1997):

Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders.

J Dairy Sci 80, 1260-1268

GONG, J. G., T. A. BRAMLEY u. R. WEBB (1993):

The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers.

J Reprod Fertil 97, 247-254

GONG, J. G., W. J. LEE, P. C. GARNSWORTHY u. R. WEBB (2002):

Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows.

Reproduction 123, 419-427

GRUM, D. E., J. K. DRACKLEY, L. R. HANSEN u. J. D. CREMIN, JR. (1996a):

Production, digestion, and hepatic lipid metabolism of dairy cows fed increased energy from fat or concentrate.

J Dairy Sci 79, 1836-1849

GRUM, D. E., J. K. DRACKLEY, R. S. YOUNKER, D. W. LACOUNT u. J. J. VEENHUIZEN (1996b):
Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows.
J Dairy Sci 79, 1850-1864

GRUMMER, R. R. (1993):
Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows.
J Dairy Sci 76, 3882-3896

GRUMMER, R. R. (1995):
Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow.
J Anim Sci 73, 2820-2833

GRUMMER, R. R., D. G. MASHEK u. A. HAYIRLI (2004):
Dry matter intake and energy balance in the transition period.
Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 447-470

HERDT, T. H. (2000):
Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing.
Vet Clin North Am Food Anim Pract 16, 387-403

HOEBEN, D., E. MONFARDINI, G. OPSOMER, C. BURVENICH, H. DOSOGNE, A. DE KRUIF u. J. F. BECKERS (2000):
Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein.
J Dairy Res 67, 249-259

HOLTENIUS, P. u. K. HOLTENIUS (1996):

New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review.

Zentralbl Veterinarmed A 43, 579-587

HOLTENIUS, P., G. OLSSON u. C. BJORKMAN (1993):

Periparturient concentrations of insulin glucagon and ketone bodies in dairy cows fed two different levels of nutrition and varying concentrate/roughage ratios.

Zentralbl Veterinarmed A 40, 118-127

JIANG, H., M. C. LUCY, B. A. CROOKER u. W. E. BEAL (2005):

Expression of growth hormone receptor 1A mRNA is decreased in dairy cows but not in beef cows at parturition.

J Dairy Sci 88, 1370-1377

JORRITSMA, R., T. WENSING, T. A. KRUIP, P. L. VOS u. J. P. NOORDHUIZEN (2003):

Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows.

Vet Res 34, 11-26

KAWASHIMA, C., S. FUKIHARA, M. MAEDA, E. KANEKO, C. A. MONTOYA, M. MATSUI, T. SHIMIZU, N. MATSUNAGA, K. KIDA, Y. MIYAKE, D. SCHAMS u. A. MIYAMOTO (2007):

Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows.

Reproduction 133, 155-163

KIMURA, K., J. P. GOFF, M. E. KEHRLI, JR. u. T. A. REINHARDT (2002):

Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle.

J Dairy Sci 85, 544-550

LEAN, I. J., P. J. DEGARIS, D. M. MCNEIL u. E. BLOCK (2006):

Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited.

J Dairy Sci 89, 669-684

MARQUARDT, J. P., R. L. HORST u. N. A. JORGENSEN (1977):

Effect of parity on dry matter intake at parturition in dairy cattle.

J Dairy Sci 60, 929-934

MCGUIRE, M. A., D. K. BEEDE, R. J. COLLIER, F. C. BUONOMO, M. A.

DELORENZO, C. J. WILCOX, G. B. HUNTINGTON u. C. K. REYNOLDS (1991):

Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows.

J Anim Sci 69, 2050-2056

MOSTL, E. u. R. PALME (2002):

Hormones as indicators of stress.

Domest Anim Endocrinol 23, 67-74

NIKOLIC, J. A., M. KULCSAR, L. KATAI, O. NEDIC, S. JANOSI u. G. HUSZENICZA (2003):

Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis.

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 50, 22-29

OETZEL, G. R. (2004):

Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease.

Vet Clin North Am Food Anim Pract 20, 651-674

OHTSUKA, H., M. KOIWA, S. FUKUDA, Y. SATOH, T. HAYASHI, F. HOSHI, T. O. YOSHINO u. S. KAWAMURA (2004):

Changes in peripheral leukocyte subsets in dairy cows with inflammatory diseases after calving.

J Vet Med Sci 66, 905-909

OPSOMER, G., BOSSAERT, P., COOLS, S., DE KRUIF, A. (2007):

Reduced fertility in modern high yielding dairy cows: etiology and prevention.

Reproductive health 13, 391-401

RABINOWITZ, D., T. J. MERIMEE u. J. A. BURGESS (1966):

Growth hormone-insulin interaction. Fact and speculation.

Diabetes 15, 905-910

REIST, M., A. KOLLER, A. BUSATO, U. KUPFER u. J. W. BLUM (2000):

First ovulation and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows.

Theriogenology 54, 685-701

ROBERTS, A. J., R. A. NUGENT, 3RD, J. KLINDT u. T. G. JENKINS (1997):

Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction.

J Anim Sci 75, 1909-1917

SCALIA, D., N. LACETERA, U. BERNABUCCI, K. DEMEYERE, L. DUCHATEAU u. C. BURVENICH (2006):

In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability.

J Dairy Sci 89, 147-154

SCHAMS, D., B. BERISHA, M. KOSMANN, R. EINSPANIER u. W. M.

AMSELGRUBER (1999):

Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals.

Domest Anim Endocrinol 17, 279-285

SCHWALM, J. W. u. L. H. SCHULTZ (1976):

Relationship of insulin concentration to blood metabolites in the dairy cow.

J Dairy Sci 59, 255-261

SHAFER-WEAVER, K. A., C. M. CORL u. L. M. SORDILLO (1999):

Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period.

J Dairy Sci 82, 1696-1706

SVANBERG, E., J. HEALEY u. D. MASCARENHAS (2001):

Anabolic effects of rhIGF-I/IGFBP-3 in vivo are influenced by thyroid status.

Eur J Clin Invest 31, 329-336

TAYLOR, V. J., Z. CHENG, P. G. PUSHPAKUMARA, D. E. BEEVER u. D. C.

WATHES (2004):

Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield.

Vet Rec 155, 583-588

THISSEN, J. P., J. M. KETELSLEGERS u. L. E. UNDERWOOD (1994):

Nutritional regulation of the insulin-like growth factors.

Endocr Rev 15, 80-101

VAN KAMPEN, C. u. B. A. MALLARD (1997):

Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets.

Vet Immunol Immunopathol 59, 79-91

VAN KNEGSEL, A. T., H. VAN DEN BRAND, E. A. GRAAT, J. DIJKSTRA, R.

JORRITSMA, E. DECUYPERE, S. TAMMINGA u. B. KEMP (2007):

Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones.

J Dairy Sci 90, 1477-1485

VEENHUIZEN, J. J., J. K. DRACKLEY, M. J. RICHARD, T. P. SANDERSON, L. D.

MILLER u. J. W. YOUNG (1991):

Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows.

J Dairy Sci 74, 4238-4253

WALSH, R. B., J. S. WALTON, D. F. KELTON, S. J. LEBLANC, K. E. LESLIE u. T. F.

DUFFIELD (2007):

The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows.

J Dairy Sci 90, 2788-2796

WEST, H. J. (1990):

Effect on liver function of acetonemia and the fat cow syndrome in cattle.

Res Vet Sci 48, 221-227

WOOK KIM, J., R. P. RHOADS, S. S. BLOCK, T. R. OVERTON, S. J. FRANK u. Y.

R. BOISCLAIR (2004):

Dairy cows experience selective reduction of the hepatic growth hormone receptor during the periparturient period.

J Endocrinol 181, 281-290

Anne Kathrin Sander

Antepartale Einschätzung des Risikos postpartaler Produktionserkrankungen anhand metabolischer, endokrinologischer und immunologischer Blutparameter bei Milchkühen

Zusammenfassung

Die Transitperiode ist der Zeitraum mit der höchsten Inzidenz von Erkrankungen bei Milchkühen. Ziel der vorliegenden Studie war es zu prüfen, ob den in den ersten drei Laktationswochen auftretenden Produktionskrankheiten Veränderungen von metabolischen oder endokrinologischen Blutparametern vorausgehen, die bereits ante partum eine Beurteilung des postpartalen Krankheitsrisikos zulassen. Da eine reduzierte Funktionsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten (PMN) als eine Ursache für eine erhöhte Inzidenz von Erkrankungen in der Transitperiode angesehen wird, wurde zudem die Phagozytoseleistung von PMN und deren Abhängigkeit von dem Hormon Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in diesem Zeitraum geprüft. Als präventiver Ansatz für die Verbesserung des Gesundheitsstatus in der Transitperiode wurde in einer weiteren Studie der Einfluss eines unmittelbar nach der Kalbung verabreichten Roboranspräparates auf Futteraufnahme, metabolische Leitparameter und die Phagozytose-Aktivität und -Kapazität von PMN untersucht.

Die Untersuchungen wurden an 41 pluriparen (3,2 – 8,8 Jahre, 2. – 5. Laktation) und 18 primiparen (2,0 – 3,2 Jahre) Kühen der Rasse Holstein-Friesian durchgeführt. Die Blutprobenentnahmen erfolgten in den Wochen -6, -4, -3, -2 und -1 ante partum, am Tag der Kalbung sowie in den Wochen 1, 2, 4, 8, 16 post partum. Die immunologischen Parameter wurden zwischen der Woche 3 ante partum und Woche 4 post partum mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Eine Roborans-Tränke wurde einem Teil der Kühe unmittelbar nach der Abkalbung ad libitum angeboten. Die klinische Untersuchung der Tiere erfolgte wöchentlich und zusätzlich bei Auffälligkeiten im klinischen Status.

Es bestanden signifikante Differenzen bei sieben der neun antepartal bestimmten metabolischen und endokrinologischen Blutparametern zwischen primi- und pluriparen Tieren. Produktionserkrankungen waren dabei vor allem ein Problem pluriparer Kühe (Inzidenz in den ersten drei Laktationswochen 61% gegenüber 33% bei Erstkalbinnen). Die Serumkonzentrationen von Bilirubin, BHBS und NEFA, sowie die Plasmakonzentrationen von IGF-I zeigten bereits antepartal signifikante Unterschiede zwischen Kühen, die in den ersten drei Wochen der Laktation gesund blieben, und Kühen, die in diesem Zeitraum unter einer Produktionserkrankung litten. Bei differenzierter Betrachtung der einzelnen Krankheitsbilder ergab sich, dass antepartal erhöhte Konzentrationen von Bilirubin, BHBS und NEFA spezifisch und indikativ für das Auftreten einer Ketose und/oder Labmagenverlagerung post partum waren. Die Bestimmung von NEFA-Konzentrationen im Serum erwies sich als der am besten geeignete Parameter für die antepartale Abschätzung des Risikos einer postpartalen Ketose und/oder Labmagenverlagerung. Hierfür ergaben sich bei Probennahme in der Woche 2 ante partum eine Sensitivität und ein positiv prädiktiver Wert von 83% sowie eine Spezifität und ein negativ prädiktiver Wert von 94%. Für die antepartale Abschätzung des Risikos anderer Produktionserkrankungen (Metritis, Retentio secundinarum, Hypocalcämie und Mastitis) erwies sich die Bestimmung der NEFA Konzentration im Serum als nicht geeignet.

IGF-I erwies sich als einziger der in dieser Studie antepartal bestimmten Parameter als unabhängig von der Art der in den ersten drei Laktationswochen auftretenden Produktionskrankheit. Bei Kühen, die eine Erkrankung entwickelten, ergaben sich antepartal niedrigere Plasmakonzentrationen verglichen mit Kühen, die postpartal gesund blieben. Die Plasma-Gesamtkonzentration des IGF-I in der zweiten Woche vor der Kalbung (gesunde Kühe: $106,2 \pm 11,1$ ng/ml, kranke Kühe $67,6 \pm 6,5$ ng/ml) konnte zur Abschätzung des Risikos für eine Produktionserkrankung herangezogen werden. Hierfür ergaben sich eine Sensitivität und ein positiv prädiktiver Wert von 79%, sowie eine Spezifität und ein negativ prädiktiver Wert von 68%. IGF-I Konzentrationen zeigten bei primiparen und pluriparen Kühen einen abfallenden Verlauf bis zum Zeitpunkt der Kalbung, ohne sich signifikant voneinander zu

unterscheiden. Die in der Literatur beschriebenen, signifikant höheren Konzentrationen an IGF-I bei primiparen verglichen mit pluriparen Kühen, zeigten sich ab dem Zeitpunkt der Geburt. Die Berechnung linearer Regressionen zeigte weder Zusammenhänge zwischen den im Plasma bestimmten IGF-I Konzentrationen und der Phagozytoseaktivität, der Phagozytosekapazität und der Anzahl neutrophiler Granulozyten, noch zwischen IGF-I Konzentrationen und Phagozytosepotential oder der Gesamtleistung von PMN. Der an humanen neutrophilen Granulozyten in vitro festgestellte positive Einfluss von IGF-I auf neutrophile Granulozyten wurde ex vivo bei Kühen nicht belegt.

Der Prozentsatz phagozytierender PMN (Phagozytoseaktivität) unterschied sich antepartal nicht zwischen primiparen und pluriparen Kühen. In Woche eins und zwei post partum wurde bei pluriparen Kühen verglichen mit primiparen Kühen eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität, in Woche 2 vor der Kalbung eine signifikant höhere mittlere Fluoreszenzintensität der PMN (Phagozytosekapazität), als Ausdruck der Anzahl phagozytierter Bakterien pro Zelle, festgestellt. Die Anzahl von PMN stieg zum Zeitpunkt der Geburt deutlich an und zeigte signifikant höhere Werte bei primiparen verglichen mit pluriparen Kühen. Das Phagozytosepotential von pluriparen Kühen, ein aus der Phagozytoseaktivität und der Phagozytosekapazität gebildetes Produkt, schien dasjenige von primiparen Kühen tendenziell zu übertreffen, ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich in Woche 2 post partum. Die Phagozytosegesamtleistung wurde als ein Produkt aus dem Phagozytosepotential und der Anzahl von PMN berechnet und unterschied sich nicht zwischen primiparen und pluriparen Kühen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine geringere Phagozytoseaktivität primiparer Kühe verglichen mit pluriparen Kühen nicht zwangsläufig zu einer schlechteren Abwehrlage führen muss, sondern es scheint, dass durch eine höhere Anzahl an PMN die schlechtere Phagozytoseaktivität kompensiert wird. Eine Bestimmung der Phagozytoseaktivität und Phagozytosekapazität ohne Einbeziehung der Anzahl von PMN ist folglich unzureichend, und führt zu einer falschen Einschätzung im Vergleich primiparer und pluriparer Kühe. Die Ursache für eine erhöhte Krankheitsinzidenz von pluriparen,

verglichen mit primiparen Kühen, konnte nicht in der Phagozytoseleistung von PMN gefunden werden.

Die Aufnahme großer Flüssigkeitsmengen unmittelbar post partum ($35,8 \pm 11,7$ L), erreicht durch eine hohe Akzeptanz des eingesetzten Roboranspräparates, korrelierte positiv mit der in den ersten drei Tagen nach der Kalbung aufgenommenen Menge einer Teil-TMR. Übereinstimmend hiermit zeigte sich bei Kühen, die mehr als 20 Liter der eingesetzten Roboranstränke aufnahmen, ein signifikanter Abfall der Serumkonzentrationen an NEFA zwischen dem Tag der Kalbung und Woche eins post partum ($p=0.005$). Darüber hinaus zeigte sich in Woche eins post partum bei diesen Kühen eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität der PMN, verglichen mit Tieren, die reines Wasser aufnahmen. Die Ergebnisse zum Einsatz des Roboranspräparates hatten lediglich orientierenden Charakter, dennoch konnten positive Effekte statistisch gesichert werden und zeigen, dass sich der Einsatz des verwendeten Roboranspräparates möglicherweise positiv auf die Inzidenz von Produktionserkrankungen in der Transitperiode auswirken könnte.

Anhand der in dieser Studie ermittelten Daten ist die Erkennung von Risikotieren bereits antepartal möglich. Dies erlaubt eine gezielte Beobachtung und frühest mögliche Behandlung betroffener Tiere mit dem Ziel die Inzidenz oder die Ausprägung von Produktionserkrankungen in der Transitperiode zu senken. Darüber hinaus wurden präventive Ansätze zur Beeinflussung des Gesundheitsstatus bei Kühen deutlich.

Anne Kathrin Sander

Antepartal calculation of the risk of developing postpartal diseases by metabolic, endocrinological, and immunological blood parameters in dairy cows

Summary

In dairy cows, the transition period is typically accompanied with the highest incidence of production diseases. The objective of this study was to examine whether parameters assessed ante partum can be predictive for the development of production disease during the first three weeks of lactation. Subsequently, the most applicable antepartal blood parameter for assessment of the postpartal health status was determined. Impaired function of neutrophilic granulocytes (PMN) during the peripartal period is reported to be one of the major reasons for increased susceptibility of dairy cows to infection and additionally plays a role in development of retained fetal membranes. In vitro studies suggested that Insulin-like-growth factor-I (IGF-I) enhances PMN function. Therefore, another aim of this study was to determine the effects of pregnancy, parturition, and early lactation on PMN phagocytic activity and capacity. Moreover, we tested the hypothesis that differences in IGF-I plasma concentrations affect PMN function. Finally, the influence of a roborant drink upon these parameters was investigated.

In total, 41 pluriparous (3.2 – 8.8 yr, 2nd – 5th lactation) and 18 primiparous (2.0 – 3.2 yr) Holstein Friesian cows were used as blood donors in this study. Blood sampling was carried out once weekly on the same day between 6:00 and 10:00 A.M. (6, 4, 3, 2, 1 wk before the day of predicted calving (wk 0) and 1, 2, 4, 8, 16 wk post partum), except for the samples of calving, which were taken within ten minutes after calving. Immunological parameters were determined with flow cytometry between week 3 ante partum and week 4 post partum. Water supplemented with a mixture of roborants was offered to one group of cows directly after calving. Clinical examination was performed once weekly and additionally if perceptible deviations from physiological state became apparent.

Significant differences in seven of nine antepartal measured blood parameters led to a differentiated consideration of primiparous and pluriparous cows. Moreover, in accordance with previous publications it was affirmed that production diseases are primarily a problem of pluriparous, not primiparous cows. The percentage of primiparous cows suffering from a production disease during the first three weeks of lactation was exceeded twice by pluriparous cows. Ante partum, serum concentrations of total bilirubin, BHBA, and NEFA, as well as plasma concentrations of IGF-I significantly differed between cows that were healthy during the first three weeks of lactation compared to cows suffering from a production disease. On considering production diseases separately, increased concentrations of total bilirubin, BHBA and NEFA determined ante partum were found to be specific and indicative for the post partal development of ketosis and/or a left displacement of abomasum. Nevertheless, NEFA serum concentrations ante partum were highly suited for calculating the risk for developing ketosis and displacement of abomasum post partum. Regarding concentrations in week two ante partum, a sensitivity and a positive predictive value of 83% as well as a specificity and a negative predictive value of 94% were detected. It was moreover found that determining antepartal NEFA concentrations was unsuitable for calculation of the risk of occurrence of other production diseases (metritis, retained fetal membranes, hypocalcaemia, mastitis).

IGF-I was the only antepartal measured blood parameter in this study, which was independent of the nature of the disease, occurring during the first three weeks of lactation. Antepartal IGF-I plasma concentrations of cows suffering from a production disease (67.6 ± 6.5 ng/ml) were lower compared to healthy cows (106.2 ± 11.1 ng/ml). Thus, IGF-I was the most appropriate antepartal blood parameter for the assessment of the postpartal health status. Regarding concentrations in week two ante partum, led to a sensitivity and a positive predictive value of 79% as well as a specificity and a negative predictive value of 68%. IGF-I concentrations decreased significantly around parturition and, starting from the point of calving, displayed significantly higher IGF-I concentrations in primi- than in pluriparous cows. Ante partum no differences between primiparous and pluriparous cows were detected in

IGF-I concentrations. Based on the integration of phagocytic activity (percentage of phagocytic PMN), phagocytic capacity (mean fluorescence intensity), and total number of neutrophilic granulocytes, neither the phagocytic power (phagocytic activity x phagocytic capacity) nor phagocytic overall performance (phagocytic power x number of PMN) of primiparous and pluriparous cows was influenced by IGF-I plasma concentrations. Results of in vitro studies, indicating that IGF-I enhances human PMN function, could not be confirmed by ex vivo results of bovine PMN.

Phagocytic activity was similar between primi- and pluriparous cows ante partum, but phagocytic capacity was significantly higher in pluriparous cows in week two ante partum compared to primiparous cows. Moreover, during the first two weeks postpartum, phagocytic activity in pluriparous cows exceeded that of primiparous cows significantly. In contrast, blood PMN count was significantly higher in primiparous compared to pluriparous cows at time of calving. Phagocytic power tended to be higher in pluriparous cows compared to primiparous cows, whereby a significant difference was found in week two post partum. Phagocytic overall performance expressed similar values in primi- and pluriparous cows. These results indicated that primiparous cows compensated their impaired PMN function by a higher number of PMN. Thus, we can not suggest a suppression of the immune system on the whole in primiparous cows without comprising the total number of neutrophilic granulocytes at present.

High liquid intake (35.8 ± 11.7 L) directly after calving, attained by high acceptability of the used supplement, correlated positively with quantitative intake of a partly mixed ration during the first three days of lactation. Proportionally to increased feed intake, serum NEFA concentrations decreased significantly in cows whose liquid intake was above 20 litres between calving and week one post partum. Furthermore, phagocytic activity in these cows was significantly higher compared to cows which only had access to water. Even though the analyses concerning use of a roborant drink had only exploratory character, the derived results were statistically sound and may provide an opportunity to reduce the incidence of production diseases.

Present results demonstrated that already ante partum, there is a possibility to recognize cows at risk of developing production diseases. This allows treatment at the earliest possible and offers an approach in reducing the incidence or severity of production diseases.

Danksagungen

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Kaske für die Überlassung dieser spannenden Thematik, die gute Betreuung, seine Ideen und besonderes Verständnis, das er mir in außergewöhnlichen Situationen entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Schuberth danke ich für die stetige und gute Unterstützung, Beratung und Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. U. Andresen danke ich für die gute Zusammenarbeit und schöne Tage in Albersdorf.

Frau Dr. Marion Piechotta danke ich für ihre kontinuierliche Präsenz und ihren unermüdlichen Einsatz.

Den Mitarbeitern des Lehr- und Forschungsgutes Ruthe, insbesondere Frau Stallbaum, Herrn Minx und Herrn Mohwinkel, danke ich für ihre Verlässlichkeit, ihren Einsatz zu allen erdenklichen Tages- und Nachtzeiten sowie ihre tatkräftige Unterstützung.

Den „Freunden der doppelten Sohle“ sowie der „Tanzgruppe Nelson“ danke ich für viele abwechslungsreiche und schöne Stunden in den letzten Jahren.

Sonja Degen und Christiane von Münchhausen danke ich für ihre spontane Einsatzbereitschaft und Hilfe in Ruthe.

Meiner Freundin Jenny Offinger danke ich für ihr wirklich jederzeit offenes Ohr, kulinarische Genüsse, ihr Vertrauen, oder kurz gesagt für ihre Freundschaft.

Janine Baumgarte und Britta Götting danke ich für ihre Unterstützung und Hilfe in jeglicher Beziehung und seit vielen Jahren.

Christina und Konrad Bode für ihre Verlässlichkeit, viele schöne Abende und ihre liebe Fürsorge in den letzten Jahren.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Sicherheit und Rückendeckung.

Meiner Mutter danke ich für ihre Liebe und das Vorleben von Mut, Zielstrebigkeit und Ausdauer, mit immerzu klarem Blick für die wesentlichen Dinge des Lebens.

Mein größter Dank gilt aber meinem Vater, der mich immer und in jeder Hinsicht während der letzten Jahre liebevoll unterstützt hat, und ohne den die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

