

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Projekthintergrund

Das Forschungsprojekt des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Fachrichtung Tropenveterinärmedizin und -epidemiologie der Freien Universität Berlin „On-Farm Collaborative Research on Dairy Production in Transition in Rural Uganda“ wurde im März 1994 in Zusammenarbeit mit der National Agriculture Research Organisation (NARO) und der Makerere Universität Kampala ins Leben gerufen. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurden von 1994 bis Juni 1997 verschieden Studien durchgeführt. Aufbauend auf den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen, insbesondere von FISCHER et al. (1997) und von den BENKEN (1998) wurde der Komplex der durch Zecken übertragenen Erkrankungen ab September 1995 intensiver untersucht (Tab. 7). Von Juni 1996 bis Juni 1997 wurden insbesondere dazu auf 20 zufällig ausgewählten Milchviehbetrieben in Uganda Daten erhoben, um die zeitliche Dynamik von durch Zecken übertragenen Infektionen und Erkrankungsfällen, insbesondere von Ostküstenfieber (ECF), und deren Zusammenhänge mit Managementfaktoren zu untersuchen.

Tabelle 7: Chronologische Folge der vom Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin im Distrikt Rukungiri durchgeführten Untersuchungen zu durch Zecken übertragene Erkrankungen

Zeitraumen	Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße
Mai 1994	Orientierungserhebung mit „Schlüsselpersonen“ in 3/6 Milchsammelstellen zur Erstaufnahmen von Grundlagendaten zur Beschreibung der Tierpopulation und Erstabschätzung von Produktionscharakteristika (BAUMANN et al., 1998)	25 Farmer als Vertreter der 9 „farmer associations“
Mai bis Juli 1994	Querschnittsuntersuchung zur Identifizierung von Problembereichen sowie zum Erhalt von Basisinformationen zu Tiergesundheit und -haltung durch strukturierte Erhebungen in Einzelinterviews (FISCHER et al., 1997)	auf 81 der 276 Betriebe

23.9.1994 bis 13.9.1995	Untersuchung zum Einfluß von Management- und Umweltfaktoren auf Kälbermortalität und –morbidity (von den BENKEN, 1996)	auf 38 der 81 Betriebe
Sept. 1994 bis Sept. 1995	Untersuchung zu Zeckenkontrollstrategien und deren Durchführung (BAUMANN et al., 1996)	auf den 38 der 81 Betriebe
Sept. bis Nov. 1995	Querschnittsuntersuchung zur Abschätzung des serologischen Status von durch Zecken übertragenen Krankheiten in Kälbern und deren Mütter und des Zusammenhanges mit unterschiedlichen Zeckenkontrollstrategien (UNGER, 1996)	auf den 38 der 81 Betriebe
Juni 1996 bis Juni 1997	Vorliegende longitudinale Studie zur Dynamik der TBDs Infektionen und Erkrankungsfälle, insbesondere von ECF, und deren Beeinflussung durch Managementfaktoren, in Kälbern im Rukungiri Distrikt, Südwest Uganda	auf 20 der 81 Betriebe

1.1 Kenndaten zu geographischer Lage, Rinderpopulation und Milchsammlung im Untersuchungsgebiet

Der Rukungiri Distrikt liegt im Südwesten Ugandas südlich des Äquators auf einer Höhe zwischen 1300 und 1900 Metern über dem Meeresspiegel. Im Norden und Osten grenzt er an die Distrikte Bushenyi und Ntungamo, südlich an die Distrikte Kisoro und Kabale und westlich an den Nachbarstaat Zaire. Der Distrikt erstreckt sich auf 275.226 km² und hat 387.123 Einwohner (Ministry of Planning and Economy, Population Census 1991), die sich auf drei große Stämme verteilen: Banyankole, Bahororo und Rujiga. Dementsprechend werden außer der Amtssprache Englisch noch die drei Stammessprachen gesprochen. Administrativ ist der Distrikt in drei „Counties“ (entsprechen etwa Landkreisen) unterteilt, im Süden Rubabo (100.355 Einwohner), Rujumbura im Norden (125.160 Einwohner) und Kinkiizi im Westen (161.608 Einwohner). Im Rujumbura District befindet sich die Distrikt-Hauptstadt Rukungiri.

Nach einem Zensus von 1987 betrug die Rinderpopulation im Distrikt 95.000 Tiere (FISCHER et al., 1997).

Tabelle 8: Geographische Lage der 20 Studienbetriebe im Distrikt Rukungiri und ihre Zugehörigkeit zu Milchsammelstellen

"County"	Standort der genutzten Milchsammelstelle	Betrieb (Name)	Betriebs ID	geographische Lage (UTM) ¹⁾		Höhe ü.d. Meeresspiegel in Metern
				*Zone 35 Osten	**Zone 36 Norden	
Rubabo	Bwanga	Rwakatare	20	173249	9895990 **	1575
Rubabo	Bwanga	Busesire	3	173392	9895655 **	1590
Rubabo	Bwanga	Ckerimere	5	170670	9896269 **	1610
Rubabo	Bwanga	Mashaisha	16	170914	9895558 **	1630
Rubabo	Keksioni	Katunguka	13	828851	9908973 *	1590
Rubabo	Keksioni	Kataribabo	12	168282	9902509 **	1560
Rubabo	Buyanja	Kazenduchi	14	830443	9908112 *	1520
Rubabo	Buyanja	Komunda	15	826943	9907491 *	1620
Rubabo	Buyanja	Mutabazi	17	829808	9906582 *	1670
Rubabo	Buyanja	Karibende	9	830650	9907933 *	1665
Rubabo	Buyanja	Kashaku	10	831412	9910080 *	1750
Rujumbura	Nyakageme	Rugatara	19	819675	9907253 *	1620
Rujumbura	Rukungiri	Bantariza	1	822867	9915821 *	1870
Rujumbura	Rukungiri	Kapiira	8	823434	9917125 *	1630
Rujumbura	Rukungiri	Bariomba	2	824452	9917724 *	1655
Rujumbura	Rukungiri	Byriabarema	4	826036	9911722 *	1660
Rujumbura	Rukungiri	Owenamba	18	823305	9910236 *	1640
Kikiizi	Kambuga	Katabaguza	11	811363	9907312 *	1595
Kikiizi	Kambuga	Bishop Comboni	6	811859	9911777 *	1505
Kikiizi	Kambuga	Kamuvyu	7	811567	9912535 *	1475

¹⁾UTM = „Universal Transverse Mercator“

Tabelle 8 zeigt die Verteilung der Studienbetriebe auf die drei Counties und die verschiedenen Milchsammelstellen. Weiterhin gehen die mittels eines "Geographic Position System" (GPS-II Magellan System Corporation[®]) und eines Höhenmessers (CASIO[®]) erfaßten Daten zur geographischer Lage der Studienfarmen in die Tabelle ein. Alle Studienbetriebe lieferten zu Beginn der Studie ihre Milch ein- bis zweimal täglich bei einer der sechs Milchsammelstellen, die jeweils mit gekühlten Milchtanks ausgestattet sind, ab. Die untersuchten Betriebe verteilen sich auf drei „Counties“: 11 der 20 beobachteten Betriebe befinden sich im Rubabo County, 6 im Rujumbura County und 3 Farmen befinden sich im Kinkiizi County.

Die bei den Milchsammelstellen abgelieferte Milch wird ein bis zweimal täglich in größeren Milchkannen mit Lkws der staatlichen Molkereiorganisation („Dairy Cooperation“) nach Mbarara befördert (ca. 100 km von Rukungiri entfernt), dort zwischengelagert, heruntergekühlt und schließlich in Kühlwagen in die Hauptstadt Kampala (Entfernung von Rukungiri ca. 450 km) zur Weiterverarbeitung gebracht. Die Abnahme der Milch durch die Milchsammelstellen ist nicht garantiert, so daß in Zeiten hoher Milchproduktion die Bauern oftmals nicht ihre gesamte Milchmenge abliefern können. Die Milch wird dann entweder direkt konsumiert, konserviert in einer Form von Butter („gee“), oder weggegossen. Allerdings ist seit Beginn des Jahres 1996 im Untersuchungsgebiet eine zunehmende private Konkurrenz zur staatlichen „Dairy Cooperation“ in Form von kleinen privaten Milchsammelstellen entstanden, die zum Teil wesentlich besser auf die Bedürfnisse der Farmer eingehen können. Dadurch sind einerseits die Aufkaufpreise für Milch um durchschnittlich 10 % gestiegen, andererseits gewährleisten die privaten Molkereien die Milchabholung in der Nähe der Erzeuger. Die aufgekaufte Milch wird, analog zur staatlichen Molkerei, in neuen großen privaten Molkereien in Mbarara zwischengelagert und gelangt schließlich zur weiteren Verarbeitung auch nach Kampala.

Die gesamte Milchproduktion im Distrikt Rukungiri betrug 1991 2.546.678 Liter, 1992 3.162.131 Liter und 1993 3.128.771 Liter (FISCHER et al., 1997).

1.2 Klima

Allgemein wird das Klima im Studiengebiet als semihumid, mit einer jährlichen bimodalen Niederschlagsverteilung, beschrieben. Es gibt eine lange Regenzeit von August bis Dezember, eine kurze von April bis Mai, eine lange Trockenzeit von Juni bis August und eine kurze von Januar bis März.

1.3 Allgemeine Betriebscharakteristika

Das MAAIF (Ministry of Agriculture, Animal Industry and Fisheries, 1993) definierte auf der Basis der Bodennutzung, der Vegetation, des Klimas und der allgemeinen Flächennutzung sieben verschiedene Betriebssysteme in Uganda. Der Distrikt Rukungiri fällt darin unter das „Western-banana-coffee-cattle-system“, das westliche

Bananen-Kaffee-Viehhaltungssystem. Dieses „mixed crop-livestock farming system“ ist charakterisiert durch den Anbau von Nahrungs- und Genußmitteln wie Bananen, Mais, Bohnen, Cassava und Erdnüssen, den sogenannten „food crops“, den „cash crops“ wie Kaffee und Tabak und durch die Milchrinderhaltung (MEHLITZ, 1996).

Die Studienbetriebe existieren zum Teil schon seit Generationen als „mixed crop-livestock farms“. Im Durchschnitt besitzen die meisten Farmer seit 1959 Milchrinder. Der Medianwert des Gründungsjahres liegt im Jahr 1975. Die Betriebe erwirtschaften ihr Einkommen durchschnittlich zu 18,9% aus dem Ackerbau und zu 81,1% aus der Rinderhaltung. Der Ackerbau setzt sich zusammen aus dem Anbau der „food crops“, die entweder für den Eigenbedarf dienen oder auf lokalen Märkten veräußert werden sowie aus dem Anbau der „cash crops“. Der überwiegende Teil der Betriebe sind Familienbetriebe, von den auf einer Farm beschäftigten Personen waren allerdings etwa die Hälfte Fremdarbeiter, die zum Teil saisonal beschäftigt waren (FISCHER et al., 1997).

Im Hinblick auf die Milchproduktion handelt es sich überwiegend um noch traditionelle Subsistenzproduktion. Allerdings umfassen die beobachteten Betriebe dabei das ganze Spektrum von sehr traditionell orientierten Betrieben bis hin zu „modernerer“ Farmen. Letztere sind auf Grund der oben erwähnten veränderten Marktsituation im Zunehmen begriffen.

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Stichprobenauswahl

Der Stichprobenauswahl dieser Untersuchung lagen zwei vorangegangene Untersuchungen im Distrikt zu Grunde, die von Mai bis Juli 1994 durchgeführte Querschnittsuntersuchung zu Tierhaltung und Tiergesundheit (FISCHER et al., 1997) und die von September 1994 bis September 1995 durchgeführte Studie zur Kälbermortalität (von den BENKEN, 1998).

Die Grundgesamtheit für die Querschnittsuntersuchung bildeten alle kleinbäuerlichen Betriebe des Distrikts, die im April / Mai 1994 eine der 6 Milchsammelstellen mit einer täglichen Milchmenge von wenigstens 10 Litern belieferten (278 Farmer), wobei eine randomisierte Stichprobe von 81 Farmen, stratifiziert nach Milchsammelstelle und Milchmenge (10 bis <20; 20 bis <40; ≥ 40 Liter), gezogen wurde. Die sich daran anschließende Untersuchung der Kälbermortalität beschränkte sich auf 38 dieser 81 Betriebe.

Basierend auf den ersten Ergebnissen früherer Studien im Distrikt (UNGER, 1996; von den BENKEN, 1998) und der gegebenen Fragestellung wurde entschieden, die Studienpopulation auf die lokalen Rinderrassen (Ankole) und deren Kreuzungen zu beschränken. Der geringfügige Anteil reinrassiger exotischer Tiere von 6,5% (FISCHER et al., 1997) im Studiengebiet blieb unberücksichtigt (Holstein-Friesian [HF], Jersey, etc.).

Folgendes Auswahlverfahren wurde angewandt: Aus den Betrieben der Kälbermortalitätsstudie wurden die beiden reinen HF-Betriebe herausgenommen, so daß die Liste dieser Studienfarmen 36 Betriebe umfaßte. Von der zweiten Liste der Querschnittsstudie (reduziert um die Betriebe, die an der Kälbermortalitätsstudie teilnahmen), wurde der einzige reine HF-Betrieb ausgenommen; die Anzahl dieser Studienfarmen war demnach 42.

Weiterhin wurden die Herden, die oberhalb des 3. Quartils und unterhalb des 1. Quartils lagen, die Extreme darstellen, nicht berücksichtigt, sondern nur Herden im mittleren 50%-Bereich. Mit dieser Anpassung reduzierte sich die erste Liste auf 19 und die zweite auf 21 Betriebe. Aus jeder Liste wurden schließlich jeweils 10 Betriebe zufällig ausgewählt.

Untersuchungsgegenstand waren alle Kälber einer Herde bis zu einem Alter von einschließlich 9 Monaten, die am ersten Untersuchungstag anwesend waren sowie alle Kälber, die über den Studienzeitraum von 13 Monaten geboren wurden. Aus Gründen, die sich aus der zeitlichen Abfolge der Betriebsbesuche ergaben, wurde ein erheblicher Teil der Studienkälber auch noch mit 10 Monaten Alter einbezogen. Basierend auf der aus früheren Studien durchschnittlich zu erwartenden Kälberzahl

bis zum 9. Lebensmonat pro Betrieb (UNGER, 1996; FISCHER et al., 1997; von den BENKEN, 1998), basierte der Stichprobenplan bei 20 Betrieben auf einer Gesamtstichprobenzahl von ca. 300 Kälbern, ca. 150 Kälber bis zu einem Alter von 9 Monaten, erfaßt am ersten Besuchstag, und ca. 150 Kälber, geboren über den Studienzeitraum. Darüber hinaus war die logistische Durchführbarkeit der Untersuchungen, bei 14-tägigen Besuchsintervallen auf maximal 20 Betrieben, ein weiteres Kriterium für die Größe des zu untersuchenden Tierstapels.

2.2 Untersuchungszeitraum

Der ursprüngliche geplante Untersuchungszeitraum von 12 Monaten (Juni 1996 - Mai 1997) wurde aus praktischen Gründen um einen weiteren Monat, bis einschließlich Juni 1997, verlängert. Hintergrund dieser Entscheidung war, für den Großteil der Farmen ein möglichst vollständiges Datenset über mindestens 12 Untersuchungsmonate zu garantieren.

2.3 Kooperationsbereitschaft der teilnehmenden Farmer („Compliance“)

Alle 20 zufällig ausgewählten Milchviehbetriebe nahmen an der Untersuchung über den Zeitraum von mindestens einem Jahr teil. Ein Betrieb (Nr. 13) schied nach 12 Monaten aus (Mai 97) aus und wurde nicht ersetzt.

2.4 Datenerhebung

2.4.1 Methode, Intervall und Anzahl der Farmbesuche

Alle Farmen wurden in einem festgelegten Intervall von durchschnittlich 14 Tagen besucht. Dabei wurde pro Monat jeweils ein Hauptbesuch und ein klinischer Untersuchungsbesuch durchgeführt. Die 20 Betriebe wurden somit über die Zeitspanne von einem Jahr 24 mal routinemäßig besucht. Nach Ausscheiden des Betriebes Nr. 13 erfolgten zwei zusätzliche Besuche (je ein Hauptbesuch und eine klinische Untersuchungsrunde) auf den restlichen 19 Betrieben. Somit erhöhte sich die Gesamtzahl der Besuche auf diesen Betrieben auf insgesamt 26. Tabelle 9

enthält Angaben über zeitlichen Ablauf und Methode der Farmbesuche (Details siehe 2.4.2 – 2.4.12).

Tabelle 9: Überblick über Methodik und Ablauf der Farmbesuche

	Monatlicher Hauptbesuch	Klinische Untersuchungsrunde
A.) Einzeltierebene		
Zeitlicher Ablauf	Tage 1 – 15 Des Monats	Tage 16 – 30/31 des Monats
Serologische Probenentnahme (Vollblut und Serum)	alle Kälber ≤ 9 Monate	Nur bei klinisch ECF kranken Kälbern
Klinische Untersuchung	alle Kälber ≤ 9 Monate	alle Kälber ≤ 9 Monate
Aufnahme des Körpergewichtes	alle Kälber ≤ 9 Monate	alle Kälber ≤ 9 Monate
Lymphknotenpunktat/ Blutausstrich	Nur bei klinisch ECF kranken Kälbern	Nur bei klinisch ECF kranken Kälbern
Datenerhebung zur Zeckenkontrolle/Kälbermanagement	alle Kälber ≤ 9 Monate	alle Kälber ≤ 9 Monate
B.) Betriebsebene		
Zeitlicher Ablauf	Erster monatlicher Hauptbesuch (Juni 96)	Letzter monatlicher Hauptbesuch (Juni 97)
Allgemeine Betriebsparameter (siehe 2.4.11)	auf Betriebsebene	auf Betriebsebene

2.4.2 Erstbesuch und Erfassung der Primärdaten

Beim Erstbesuch der Betriebe wurde jedes Kalb bis zu einem Alter von 9 Monaten erfaßt und mittels Ohrmarke für die nachfolgenden Untersuchungen markiert; das Alter der Kälber wurde durch Aufzeichnungen oder Erinnerungen des Besitzers bestimmt. Bei 20 von 282 Kälbern wurde das Alter auf Grund fehlender Angaben anhand des Körpergewichtes geschätzt. Bei den weiteren Routinebesuchen wurden die markierten Kälber vom Untersucher und einem in Zusammenarbeit mit dem District Veterinary Officer (DVO) Rukungiri ausgewählten Übersetzer bis zum Erreichen des neunten Lebensmonats weiterverfolgt. Neugeborene Kälber wurden in derselben Weise in die Untersuchung aufgenommen. Alle Daten wurden auf Einzeltierbasis wie auch auf Betriebsebene detailliert und strukturiert erfaßt. Insgesamt wurden 4 Fragebögen benutzt: Fragebogen 1 (Kälberdaten), Fragebogen

2 (Muttertierdaten), Fragebogen 3 (allgemeine Betriebsdaten), Fragebogen 4 (klinische Erkrankungen/Todesfälle/Abgänge). Alle Fragebögen sind im Anhang I (I-6 bis I-9) enthalten.

Folgende Primärdaten wurden auf Einzeltierbasis erhoben (Fragebogen 1):

- Ohrmarke
- Geburtsdatum
- Rasse: Lokalrasse Ankole, deren Kreuzungen
- Geschlecht: männlich, weiblich
- Körpergewicht: ermittelt durch Messung des Brustumfanges (Details siehe 2.4.10).

2.4.3 Klinische Untersuchung

Jedes Kalb wurde einer klinischen Untersuchung mit einem in Anlehnung an MOLL et al. (1986), MOLL (1990), UNGER (1996), LORENZ (1997) und von den BENKEN (1998) entwickelten Untersuchungsgang unterzogen:

- Einschätzung des Allgemeinzustandes (Verhalten, Erscheinungsbild, Ernährungszustand, Haut, Haarkleid, etc.)
- Bestimmung der Körpertemperatur
- Palpation der peripheren Lymphknoten: (*Lnn. parotidei superficialis*, *Lnn. praescapularis*, *Lnn. subilicalis*):
Ihre relative Größe wurde dabei wie folgt eingeschätzt: -, +, ++
 - “-“ kein Lymphknoten vergrößert
 - “+“ ein oder mehrere Lymphknoten bis zu doppelter Größe vergrößert
 - “++“ ein oder mehrere Lymphknoten mehr als doppelt so groß
- Auskultation der Lunge: Beurteilung der Atemgeräusche
- Adspektion der Lungenfunktion: Bestimmung des Atmungstypes
- Auszählen der Herz- und Atemfrequenz
- Adspektion der Schleimhäute
- Aufnahme aller klinischen Symptomen, wenn vorhanden

2.4.4 Definition einer klinischen ECF Erkrankung

In Kenntnis der in der Literatur beschriebenen typischen klinischen Symptome einer ECF Erkrankung (Moll et al., 1986; MOLL, 1990; NORVAL et al., 1992; LAWRENCE, et al., 1995a) und in Anlehnung an Empfehlungen des „FAO-ECF Immunization Projektes“ in Entebbe, Uganda, galt ein Kalb als klinisch an Ostküstenfieber erkrankt, wenn mindestens zwei der folgenden pathologischen Symptome im Rahmen der klinischen Untersuchung diagnostiziert wurden:

- eine rektale Körpertemperatur $\geq 40^{\circ}$ C
- vergrößerte Lymphknoten bei Palpation nach 2.4.3
- gestörtes Allgemeinbefinden wie:
 - Teilnahmslosigkeit an der Umwelt
 - Verlust des Appetites

2.4.5 Durchgeführte Behandlungen

Konnten im Rahmen der klinischen Untersuchung Symptome von Ostküstenfieber oder einer anderen Erkrankung diagnostiziert werden, erfolgte eine Behandlung. Die Behandlung (Wirkstoff und Dosis) wurde schriftlich aufgenommen. Zur Behandlung von Ostküstenfieber kamen folgende Medikamente allein oder in Kombination zur Anwendung:

- Oxytetracyclin (20%tig), verschiedene Hersteller
- Buparvaquon (Parvexon[®])

Unterstützend kamen in schweren Fällen Paraimmunitätsinducer (Baypamun[®]) und hyperthone Infusionslösungen verschiedener Hersteller zum Einsatz.

Bei Vorliegen anderer Erkrankungen kamen entsprechend der Indikation unterschiedliche Chemotherapeutika, Antibiotika und Antiparasitika zur Anwendung. Wenn notwendig, wurden der Besitzer oder Mitarbeiter des Betriebes angewiesen, Wiederholungsbehandlungen in Eigenverantwortung vorzunehmen.

2.4.6 Probenentnahme

2.4.6.1 Vollblut- und Serumgewinnung für diagnostische Tests

In der monatlichen Hauptuntersuchung wurde von jedem Probanden eine Vollblut-(EDTA)-Probe und eine weitere Blut-Probe zur Serumgewinnung gezogen. Demgegenüber fand eine Probenentnahme während der zusätzlichen klinischen Untersuchungsrunde nur bei auf Grund der klinischen Untersuchung als ECF krank eingestuftem Kälbern statt (siehe auch 2.4.1 Tabelle 9).

Die Blutentnahme erfolgte aus der *V. jugularis externa* oder *V. coccygea*, wobei eine Monovette für EDTA-Blut und zwei weitere für die Serumgewinnung benutzt wurden. Die Proben wurden beschriftet und sofort auf Eis gelagert. Nach Ende der Feldbesuche wurden die Serumproben am gleichen Tage zentrifugiert und das Serum in vier 1 ml „Cryo Tubes“ (Nunc®) pipettiert und bei -20°C gelagert. Die EDTA-Proben wurden in eine 1ml „Cryo Tube“ (Nunc®) pipettiert und danach in flüssigem Stickstoff konserviert.

2.4.6.2 Lymphknotenpunktate und Blutausstriche

Von den auf Grund der klinischen Untersuchung als ECF krank eingestuftem Tieren wurde ein Lymphknoten- und ein Blutausstrich gewonnen. Die Ausstriche wurden fixiert (Methanol), nach Giemsa gefärbt und schließlich lichtmikroskopisch zum direkten Erregernachweis untersucht.

2.4.7 Datenerhebung zu Zecken und Zeckenkontrolle

Zur Beurteilung der Vektorpräsenz und Einschätzung der Effizienz der Zeckenkontrolle wurden folgende Parameter erhoben:

- Ganzkörperzeckenzahl/Tier
- Zeckenspezies-Differenzierung
- Ernährungszustand der Zecke (vollgesogen/nicht vollgesogen)

Weiterhin erfolgte eine Befragung des Farmers zur angewendeten Zeckenkontrollstrategie auf Einzeltier- und Herdenebene mit Angaben zu:

- angewandte Akarizide
- verwendete Applikationsformen
- Intervall der Behandlung

Bei einem Wechsel des Akarizides oder der Kontrollstrategie wurden die Gründe erfragt.

2.4.8 Datenerhebung zum Kälbermanagement

Folgende Managementparameter zum Tränke- und Weideregime mit ihren Ausprägungen wurden aufgenommen:

- Angaben zum Tränkeregime: noch saugend, Eimertränke, abgesetzt
- Stallaufenthalt: immer, nur nachts, immer außerhalb (kein Stallaufenthalt ist dabei mit eingeschränktem bzw. uneingeschränktem Weidegang gleichzusetzen)
- Weidegang: keine Weide (Stall), eingeschränkt bzw. uneingeschränkt
 - Eingeschränkt („restricted grazing“): Kälber weiden getrennt von der Herde auf kleiner, in der Regel abgezaunter Weide mit direktem Zugang vom Kälberstall. Es besteht kein Kontakt zu kommunalen Triebwegen bzw. Tieren anderer Herden.
 - Uneingeschränkt („open grazing“): Um die gemeinschaftlich mit dem Rest der Herde genutzte Tagesweide zu erreichen, muß generell das eigene Farmland verlassen und eine Distanz von mindestens 2 km zurückgelegt werden. Dabei werden kommunale Triebwege genutzt. Es besteht in der Regel Kontakt zu Herden anderer Betriebe.

2.4.9 Datenerhebung zu Ereignissen zwischen zwei Farmbesuchen zu Herdendynamik, Krankheitsereignissen und Abgängen

Vom 2. Besuch an bis zum Ende der Studie wurden die zwischen zwei Farmbesuchen stattgefundenen Ereignisse zu Herdendynamik, Krankheiten und Abgängen retrospektiv wie folgt erfaßt:

- Klinischer Erkrankungsfall
- Art der Erkrankung: Vermutung des Farmers?
- Beobachtete Symptome
- Dauer der Erkrankung
- Angaben zu einer erfolgten Behandlung (Wirkstoff und Dosis), wenn ja, durch wen?
- Schicksal des Kalbes
- Abgänge: Verkäufe, Schlachtungen, Schenkungen

2.4.10 Bestimmung des Körpergewichtes

Ab dem zweiten Farmbesuch und bei jedem weiteren Besuch wurde das Körpergewichtes aller Probanden indirekt durch Messung des Brustumfanges mit einem standardisierten Meßband (Firma BAYER®) ermittelt.

2.4.11 Erhebung zu allgemeinen Betriebs-, Herden- und Management-parametern

Während der ersten und letzten Besuchsrunde wurden zusätzliche Informationen zu generellen Praktiken des Betriebs- und Herdenmanagements aufgenommen. Der Erhebungsbogen beinhaltete folgende Punkte (siehe Anhang I-8):

- Herdenstruktur (Kälber, Bullen, Färsen und Kühe)
- Geburtsverlauf (Totgeburten, Aborte usw.)
- Tränkmanagement (Kolostral- und Milchversorgung, Absetzalter)
- Zeckenkontrolle (Zeitpunkt des Beginns)
- Gesundheitskontrolle der Herde (prophylaktisch, therapeutisch und durch wen)
- Weidenutzung (kommunal, privat)

2.4.12 Aufzeichnung von klimatischen und geographischen Daten

Um mögliche Klimaeinflüsse zu klinischen und serologischen Ergebnissen wie auch zur Vektorpräsenz in Beziehung setzen zu können, wurden für den gesamten Untersuchungszeitraum in der Distrikthauptstadt Rukungiri die maximalen und

minimalen Tagestemperaturen sowie die absolute tägliche Niederschlagsmenge gemessen.

Die geographische Lage aller Studienbetriebe wurde mittels eines Geographic Position System (Gerät: GPS II; Hersteller: Garmont®) ermittelt. Die geographische Positionierung des Standortes erfolgte nach zwei unterschiedlichen Verfahren, einerseits durch Bestimmung der klassischen Längen- und Breitengrade und andererseits mit Hilfe des wesentlich präziseren „UTM (Universal Transverse Mercator)“-Systems. Dabei wird die Entfernung des Standortes in Meter zu einer definierten standardisierten geographischen Zone berechnet. Um Meßfehler zu reduzieren, erfolgten alle Messungen als Doppelbestimmungen im Abstand von fünf Minuten.

Zur Bestimmung der Höhenangaben für jeden Betrieb (Meter über dem Meeresspiegel) kam ein Höhenmesser (Hersteller: Casio®) zur Anwendung.

2.5 Serologische Test

Alle Serumproben wurden zum International Livestock Research Institute (ILRI) in Nairobi transportiert und dort den nachfolgend beschriebenen Testen unterworfen.

Dabei kamen ELISA-Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen *Th. parva*, *Th. mutans*, *A. marginale* und *B. bigemina* wie folgt zur Anwendung:

***Theileria parva* :** *Theileria parva* p 85 polymorphes immundominantes Molekül, (PIM) rekombinantes Antigen (aus Sporozoit- und Schizontenlysaten) mit einem Grenzwert für die optische Aktivität von 15 Prozent Positivität (PP%)

***Theileria mutans*:** *Theileria mutans* p 32 rekombinantes Piroplasmantigen mit einem Grenzwert für die optische Aktivität von 19 Prozent Positivität (PP%)

***Anaplasma marginale*:** *Anaplasma marginale* rekombinantes MSP5 „Initial Bodies“-Antigen mit einem Grenzwert für die optische Aktivität von 18 Prozent Positivität (PP%)

***Babesia bigemina*:** *Babesia bigemina* p 200 rekombinantes Merozoid-Antigen mit einem Grenzpunkt für die optische Aktivität von 18 Prozent Positivität (PP%)

Die beschriebenen Tests wurden alle am ILRI, Nairobi entwickelt und dort auch durchgeführt. Die Sensitivitätsbestimmung erfolgte mit Seren von experimentell infizierten Rindern bzw. Tieren aus endemischen Gebieten (Ostafrika). Für die Spezifitätsprüfung kamen Seren aus Ländern, in denen die entsprechenden Erreger nicht vorkommen, zur Anwendung (Niederlande). Die Sensitivitäten und Spezifitäten der Tests sind in Tabelle 10 detailliert dargestellt (KATENDE et al., 1998).

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität der ELISA-Tests (KATENDE et al., 1998)

	Sensitivität	Spezifität
<i>Theileria parva</i>	> 99%	98%
<i>Theileria mutans</i>	> 99%*	99%*
<i>Babesia bigemina</i>	97%*	98%*
<i>Anaplasma marginale</i>	96% – 99%*	95% – 98%*

*KATENDE, persönliche Mitteilung

Jede ELISA-Mikroplatte (F96 Polysorb, NUNC[®] Immunoplate, Dänemark) enthielt stark und schwach positive (C++; C+) und negative Kontrollseren (C-). Für alle Tests wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei nur die Mittelwerte aus zwei Bestimmungen in die Ergebnisse eingingen. Die Verdünnung, in der die Test- und Kontrollseren zur Auswertung kamen, betrug 1:200. Die Berechnung der Prozentualen Positivität (PP%) der Testseren bezog sich auf die Optische Dichte (OD) des stark positiven Kontrollserums (C++) und wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{Prozentuale Positivität der Testseren (PP\%)} = \frac{\text{Optische Dichte (OD) der Testseren}}{\text{Optische Dichte der C++ -Kontrolle}}$$

Im Folgenden wird die Testprozedur für *Theileria parva* (beispielhaft für die anderen Antigene) im Detail beschrieben:

1. Bindung des Antigens an ein Feststoffsystem
 - Beschichtung einer Mikro-ELISA-Platte (F96 Polysorb, NUNC[®], Dänemark) mit dem PIM Antigen (50ng/Loch) und anschließende Inkubierung (90min bei 37°C).
 - Abschütteln überschüssiger Antigenlösung.
 - Abblockung mit 0,25% Kasein Lösung und erneute Inkubierung (60 min bei 37°C).
2. Auftragen und möglicherweise Bindung der in Testseren / Kontrollen enthaltenen Antikörper an das Antigen (Antigen-Antikörper-Reaktion)
 - Dazu werden zur Doppelbestimmung je zweimal 150 µl verdünntes Testserum (Konzentration 1:200; gelöst in DPBS [Di-phosphat-buffer-solution] mit 0,1% Tween-20 und 2% Magermilch) pro Vertiefung verwendet. Alle Kontrollen (C++;C+;C-; DPBS alleine) werden in vierfacher Wiederholung aufgetragen. Die Behandlung der Kontrollseren erfolgt analog zu den Testseren.
 - Zulassen der Bindungsreaktion für 25min bei Raumtemperatur unter leicht schüttelnden Bewegungen (Mikro Agitator, Heidolph[®]). Ungebundene Antikörper werden anschließend durch mehrfaches Waschen entfernt.
3. Zusatz von enzymmarkierten Antiseren (Konjugat-Reaktion). Es erfolgt eine Bindung, wenn unter 2. eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat. Nicht gebundenes Material wird herausgewaschen
 - Beschichten der Mikroplatten mit 150 µl verdünntem Anti-Rinder IgG1 Konjugat (Konzentration 1:5000; gelöst in DPBS mit 0,1% Tween-20 und 2% Magermilch), danach inkubieren (37°C) und mehrfaches Waschen.
4. Zusatz eines hydrolysierbaren Substrats, das bei stattgefundener Enzymbindung (unter 3.) in ein farbiges Reaktionsprodukt umgesetzt wird
 - Als Substrat wurde 150µl Natrium Citrat Puffer, versetzt mit 1% Hydrogen-Peroxid, verwendet.
5. Abstoppen der Farbreaktion nach einer festgelegten Zeit, um zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen.
 - Ablesen nach 30 min Inkubierung im Anschluß an Schritt 4.

6. Messung der Farbintensität. Die gebundene Enzymmenge ist dabei ein direktes Maß für gebundene Antikörper

- Das Ablesen erfolgte bei 414nm mittels eines Spektrophotometers gegen eine leere Mikroplatte. Für die Berechnung der Prozentualen Positivität (PP%) der Testseren kam die oben genannte Formel zur Anwendung.

2.6 Datenauswertung

Zur Erstellung der Fragebögen, Dateneingabe, Datenauswertung und graphischen Darstellungen der Ergebnisse kamen Microsoft EXCEL 6.0, STATGRAPHICS PLUS (Version 2.1 für Windows), EPIINFO (Version 5.01b), SAS® (Version für WINDOWS 6.10) und STATISTIX (DOS-Version 4.0) zur Anwendung.

Vor Anwendung analytischer Verfahren wurden die Daten zunächst deskriptiv statistisch mittels einfacher statistischer Maßzahlen wie Datenumfang, Mittelwert (zum Teil mit Berechnung des 95% Konfidenzintervalls), Median und relative Häufigkeiten beschrieben und die Ergebnisse in Tabellenform oder Grafiken (Häufigkeitsdiagramme, Box-and-Whisker-Plots, Linien- bzw. Säulendiagramme) zusammengefaßt. Die Aussage der Analysen bezieht sich dabei auf die Stichprobe der 20 Studienbetriebe bzw. Herden.

2.6.1. Seroprävalenz für *Theileria parva*

Die Ergebnisse wurden auf zwei Ebenen, der Einzeltier -und der Betriebsebene ausgewertet.

- Einzeltierebene

Zunächst wurden die Verteilungen der serologischen ELISA-Ergebnisse in ihrer Gesamtheit, d. h. bezogen auf die einzelnen Testresultate („readings“), mit Hilfe von Häufigkeitsdiagrammen charakterisiert. In einem nächsten Schritt wurden die serologischen Testergebnisse (abhängige Variable) nach bestehenden Risikofaktoren (unabhängige Variablen) stratifiziert. Auf Grund der altersbedingten

Entwicklung der Antikörpertiter im ersten Lebensjahr erfolgte die Mehrzahl der Vergleiche unter Berücksichtigung des Alters, d. h. in monatlichen Altersklassen (1. bis 10. Lebensmonat).

Wie sich die Antikörpertiter zu den einzelnen Risikofaktoren verhalten, fand graphisch Ausdruck in Box-and-Whisker Plots. Sie gaben einen ersten Eindruck über die Art der Verteilung und die Ausprägung eines Unterschiedes. Zusätzlich wurden die Verlaufskurven pro Tier in Liniendiagrammen gesondert im Anhang dargestellt.

Die Suche nach Assoziationen zwischen Managementfaktoren und Immunantworten erfolgte mittels nicht parametrischer Testverfahren, da für die serologischen Ergebnisse keine Normalverteilung zu erwarten ist. Bei unifaktoriellen Mehrgruppenvergleichen kam zunächst der Kruskal-Wallis-Test (THRUSFIELD, 1995) zur Anwendung. Dieser Test geht von der Annahme aus, daß die Lokalisation der einzelnen Gruppen gleich ist (Nullhypothese). Bei Ablehnung der Nullhypothese ($p < 0,05$) wurden in einem weiteren Schritt paarweise Vergleiche mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (THRUSFIELD, 1995) durchgeführt, um abweichende Gruppen zu identifizieren. Zur quantitativen Beurteilung der Unterschiede wurden dabei die errechneten „p-Werte“ herangezogen. Da es sich um eine explorative Datenanalyse handelte, wurde keine Klassifizierung in signifikant / nicht signifikant vorgenommen.

Bei einfachen paarweisen Gruppenvergleichen kam ebenfalls der schon erwähnte Wilcoxon-Mann-Whitney - Test zur Anwendung.

- Betriebsebene

Graphische Darstellungen dienten vorrangig zur Beschreibung und Interpretation der Ergebnisse auf Betriebsebene. Dabei wurden die serologischen Einzeltierverlaufskurven auf Betriebsebene getrennt nach Rasse und Altersgruppen zusammengefaßt und dargestellt.

2.6.2 Vektorpräsenz auf Einzeltierebene

Die Vektorpräsenz wurde als Befallsrate (prozentualer Anteil Kälber an der Gesamtpopulation mit Befall von mindestens einer Vektorzecke [weibliche, vollgesogene *Rh. appendiculatus*]) ausgedrückt. Anschließend wurden die Anteile vom Vektor befallener Tiere, mit denen vektorfreier Tiere in 2 x 2 Tabellen gegenübergestellt und auf Assoziationen mit dem Chi-Square-Test, korrigiert nach Yates, abgeprüft. Bei Zellzahlen unter 5 kam der „Fisher-exact-Test“ zur Anwendung. Von einer auffälligen Assoziation wird gesprochen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit „p“ kleiner 0,05 ist.

2.6.3 Berechnung der ECF-Morbidität

Morbiditäten wurden auf Einzeltierebene nach distinktiven Kälber-Merkmalen (Rassen, Alter und Geschlecht) berechnet. Die altersspezifischen Morbiditäten wurden auf Monatsbasis ermittelt. Als gesicherte Diagnose für ECF galt der parasitologische Erregernachweis, d. h. Schizonten im Blutausschrieb, in Kombination mit klinischen Symptomen, entsprechend der Definition eines klinischen ECF Falles (siehe 2.4.4).

Die Morbiditätsrate für ECF wurde in Form der Inzidenzdichterate nach THRUSFIELD (1995) berechnet:

$$\text{ECF Inzidenzdichte - Rate} = \frac{\text{Anzahl der erkrankten Kälber}}{\text{Anzahl der Risikotage}}$$

Grundlage der Berechnung der Risikotage war die Annahme, daß die Krankheit sich über einen Zeitraum von 15 Tagen erstreckt (NAKATUDDE, 1994; OYAT, 1996); in diesem Zeitraum stand ein Kalb nicht unter dem Risiko einer Neuerkrankung, diese 15 Tage gingen daher nicht in die Kalkulation der Risikozeit ein. Wiederholt auftretenden Erkrankungen an ECF wurden als neue Erkrankungsfälle bewertet, wenn ein Tier vollständig genesen war und mindestens 15 Tage nach der letzten Erkrankung vergangen waren. Demgegenüber gingen chronische Erkrankungen ohne vorübergehende Genesung als einmaliger Erkrankungsfall in die Berechnung

ein, wobei die gesamte Zeitspanne der Erkrankung, zuzüglich 15 Tage (siehe oben), nicht in die Risikozeit-Kalkulation einging.

Die Inzidenzdichterraten wurden für unterschiedliche Zeitabschnitte berechnet, bezogen sich aber im Regelfall auf einen Kälbermonat unter Risiko. Die entsprechenden 95% Konfidenz-Intervalle der Inzidenzdichterraten wurden nach den Formeln von SMITH und MORROW (1993) berechnet:

$$p \pm 1,96 \times SE$$

(dabei: p = Rate und SE = Standardfehler)

$$SE = (A / X^2)^{1/2}$$

(dabei: A = Anzahl der Fälle und X = Summe aller Kälbertage)

Zusätzlich wurde der Einfluß ausgewählter Herdenmerkmale auf die Zielgröße (ECF krank, ja/nein) univariat untersucht. Für Vergleiche der Einzelparameter wurden hierzu Gruppen von Farmen gebildet. Die Klassifizierung der qualitativen, ordinalen und nominalen Ausprägungen der Parameter (Rassezusammensetzung, Herdengröße usw.) wird bei der Darstellung der einzelnen Variablen beschrieben. Zur Darstellungen der Verteilungen wurden Box-and-Whisker-Plots verwendet.

2.6.4 Berechnung der ECF-Mortalität

Die Darstellung der Ergebnisse zur Mortalität erfolgte analog zu den Berechnungen der Morbidität auf Einzeltier- und Betriebsebene.

Die wahre Mortalitätsrate („crude mortality rate“, CMR) wurde als Dichterate berechnet:

$$\text{Wahre Mortalitäts-Rate} = \frac{\text{Anzahl der gestorbenen Kälber}}{\text{Anzahl der Risikotage}}$$

Die Berechnung der Konfidenz-Intervalle wie auch die univariate Betrachtung verschiedener Herden-Merkmale in Bezug auf die Zielgröße Mortalität entsprach dem für die Morbidität gewählten Verfahren (siehe 2.6.3.).

2.6.5 ECF-Letalitätsrate

Mit der ECF-Letalitätsrate („case fatality rate“; CFR) wurde die Häufigkeit einer ECF-Erkrankung berechnet, tödlich zu verlaufen. Sie ist wie folgt definiert:

$$\text{ECF-Letalitätsrate} = \frac{\text{Anzahl der Todesfälle infolge ECF}}{\text{Anzahl an ECF erkrankter Tiere}}$$

2.6.6 Chancenverhältnis (Odds Ratio) für ECF-bezogene Ergebnisse

Der Berechnung der Odds Ratio (OR) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{OR} = a * d / b * c$$

- (dabei: a = Anzahl erkrankter Tiere und dem Faktor X ausgesetzt
b = Anzahl nicht erkrankter Tiere und dem Faktor X ausgesetzt
c = Anzahl erkrankter Tiere und dem Faktor X nicht ausgesetzt
d = Anzahl nicht erkrankter Tiere und dem Faktor X nicht ausgesetzt)

Die Berechnung der exakten Konfidenzintervalle der Odds Ratios erfolgte nach MEHTA et al. (1985) und unter Verwendung des Computerprogramms EPIINFO (Version für Windows 5.01b).

2.6.7 Einteilungskriterien für Managementklassen („gut“ und „schlecht“) der Betriebe

Anhand definierter Einteilungskriterien für Managementpraktiken wurden mittels eines Punktsystems zwei Klassen von Betrieben für „gutes“ und „schlechtes“ Management wie folgt gebildet:

- 1 Erfolgte die Zeckenkontrolle entsprechend den Empfehlungen (Intervall, Konzentration, Applikationsmenge)?
 - Ja: 1 Punkt
 - Nein: 0 Punkte

2 Unabhängig von Punkt eins ging das Vorhandensein des infektiösfähigen Vektors (weibliche, vollgesogene *Rh. appendiculatus*) als Kriterium ein.

- Ja: 1 Punkt
- Nein: 0 Punkte

3 Erfolgte eine Behandlung und wenn ja in der richtigen Dosierung?

- Keine Behandlung: 0 Punkte
- Behandlung erfolgt aber fehlerhaft: 1 Punkt
- Behandlung erfolgt „lege artis“: 2 Punkte

4 Wurden Weiderestriktionen zur Unterbrechung der Infektionskette angewandt?

- Ja: 1 Punkt
- Nein: 0 Punkte

5 Herdengröße als Risikofaktor

- ≤ 16 (unteres Quantil) 0 Punkte
- > 16 bis 27 (mittlere 2 Quantile) 0,5 Punkte
- > 27 (oberes Quantil) 1 Punkt

6 Schließlich ging die subjektive Meinung des Untersuchers basierend auf den Betriebsbesuchen als Kriterium mit ein.

- Management wird als „gut“ eingestuft: 1 Punkt
- Management insgesamt „schlecht“: 0 Punkte

2.6.8 Proportionale Morbidität und Mortalität

Um den Anteil aller Erkrankungen und Todesfälle an der Gesamtmorbidität bzw. -mortalität aufzuzeigen, wurden proportionale Morbiditäten und Mortalitäten berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Kreisdiagrammen.