

3 Material und Methoden

3.1 Aufgabenstellung

Ziel dieser Studie war es, die Effektivität der Behandlung chronischer Endometritiden mit dem Enzympräparat Masti Veyxym[®] zu beurteilen. Als Vergleich diente eine Behandlung mit Prostaglandin F_{2α} oder mit der Trägersubstanz des Enzympräparates, ohne enthaltene Enzyme. Als Beurteilungskriterien wurden die klinische Heilungsrate und die Fruchtbarkeitskennzahlen im weiteren Verlauf der Laktation zugrunde gelegt.

3.2 Studienbetrieb

Die Studie wurde auf zwei Milchviehanlagen im Landkreis Barnim, Land Brandenburg, durchgeführt.

Die Herde in Studienbetrieb A bestand aus durchschnittlich 750 Milchkühen, die aus den Rassen Holstein Frisian und Schwarzbuntes Milchrind gekreuzt waren. Einige Rotbunte Kühe befanden sich ebenfalls in der Herde. Es handelte sich um einen Laufstall mit Spaltenboden, dessen Liegeboxen mit Gummimatten ausgelegt waren. Je nach Reproduktions- bzw. Laktationsstatus wurden die Tiere in unterschiedlichen Gruppen mit jeweils etwa 100 bis 150 Tieren gehalten. Kranke und hochträchtige Tiere wurden separat in Anbindehaltung auf Gummimatten und Gitterrost mit Grabner-Ketten gehalten. Nach der Kalbung blieben die Tiere während der Kolostralperiode in der Anbindehaltung, bevor sie in die Laufställe verbracht wurden.

Die weiblichen Kälber wurden an einen Aufzuchtbetrieb verkauft und kamen als tragende Färsen zurück in den Betrieb. Die männlichen Kälber blieben 14 bis 20 Tage in dem Betrieb und wurden dann an den Rinderzuchtverband Berlin-Brandenburg GmbH (RBB) verkauft. Die Fütterung bestand aus Maissilage, Grassilage, Triticale-Ganzpflanzensilage, Lieschkolbensilage, Diffusionsschnitzeln, Stroh und Sojaextraktionsschrot. Zusätzlich konnte jede Kuh Kraftfutter entsprechend ihrer Milchleistung über transpondergesteuerte Futterautomaten abrufen.

Die Kühe wurden zweimal täglich in einem Doppel-20er Side-by-Side-Melkstand gemolken. Die Gruppe der kranken Tiere und die Tiere im Abkalbestall wurden mit einer Rohrmelkanlage gemolken. Im Untersuchungszeitraum lag die durchschnittliche Jahresmilchleistung bei 8700 kg pro Kuh. Der Milchfettgehalt betrug durchschnittlich 4,33 % und der Milcheiweißgehalt 3,43 %.

Die Brunstbeobachtung erfolgte morgendlich durch den Betriebsleiter und weiteres Betriebspersonal. Ein Besamungstechniker der Rinderproduktion Berlin- Brandenburg GmbH (RBB) besuchte den Betrieb einmal täglich und führte die künstliche Besamung durch. Der Hoftierarzt nahm zwischen dem 39. und 45. Tag post inseminationem die Trächtigkeitsuntersuchung vor. Zur Datenverwaltung wurde in Betrieb A das Herdenverwaltungsprogramm Superkuh (Version 6.12, Agrocom GmbH & Co. Agrarsystem KG, Bielefeld) verwendet.

Die Herde in Studienbetrieb B bestand aus durchschnittlich 630 Milchkühen, die hauptsächlich aus den Rassen Holstein Frisian und Schwarzbuntes Milchrind gekreuzt waren. Je nach Reproduktions- bzw. Laktationstatus wurden die Tiere in unterschiedlichen Gruppen mit jeweils etwa 100 bis 150 Kühen gehalten. Sie waren in einem Laufstall mit Liegeboxen, Gummimatten und Faltschieberentmistung aufgestellt. Kranke Tiere wurden separat in Boxenlaufställen auf Gummimatten oder in Anbindehaltung mit Grabner-Ketten auf Gitterrost gehalten. Zum Kalben wurden die Tiere in Abkalbeboxen auf Stroh gestellt. Eine bauliche Besonderheit stellte das Stallbüro dar, welches oberhalb des Stalles lag. Dadurch hatte der Betriebsleiter die Gruppen mit den Rindern jederzeit im Blick, was die Brunstbeobachtung erleichterte. Die künstlichen Besamungen und die Trächtigkeitsuntersuchungen wurden nach demselben Verfahren und von demselben Besamungstechniker bzw. Hoftierarzt wie in Betrieb A vorgenommen. Zur Datenverwaltung wurde in Betrieb B das Herdenverwaltungsprogramm DairyPlan (Version C 21, Westfalia Surge, Bönen) verwendet. Die Fütterung bestand aus Maissilage, Grassilage, Triticale-Ganzpflanzen-Silage, Lieschkolbensilage, Diffusionsschnitzeln, Stroh und Sojaextraktionsschrot. Die Kühe wurden zweimal am Tag mit einem 36er - Karussellaußenmelker gemolken. Über einen Transponder erhielten die Tiere eine von ihrer Leistung abhängige Menge Milchleistungsfutter. Die Gruppe der kranken Tiere und die Tiere im Abkalbestall wurden mit einer Rohmelkanlage gemolken. Im Untersuchungszeitraum lag die durchschnittliche Jahresmilchleistung bei 9066 kg pro Kuh. Der Milchfettgehalt betrug durchschnittlich 3,76 % und der Milcheiweißgehalt 3,44 %.

Die weiblichen Kälber wurden an einen Aufzuchtbetrieb verkauft und kamen als tragende Färsen zurück in den Betrieb. Die männlichen Kälber blieben 14 bis 20 Tage in dem Betrieb und wurden dann an den Rinderzuchtverband Berlin-Brandenburg GmbH (RBB) verkauft.

3.3 Studienablauf

3.3.1 Puerperalkontrolle 1

Bei allen Tieren wurde zwischen dem 21. und 27. Tag post partum (pp.) eine erste klinische Untersuchung, Puerperalkontrolle eins (PK 1), durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Adspektion des äußeren Genitalbereiches. Daran schloss sich eine Untersuchung der Gebärmutter mittels manueller Palpation vom Rektum her an. Bei der Untersuchung wurden die Größe, Kontraktilität und Symmetrie des Uterus sowie etwaiger Inhalt beurteilt. Es wurden die Ovarien auf das Vorhandensein von Funktionskörpern palpiert. Zusätzlich wurde die Körperkondition (Body Condition Score, BCS) der Tiere nach dem Schema von Edmondson et. al (1989) beurteilt. Das Allgemeinbefinden und andere klinische Befunde wurden ebenfalls notiert. Bei Vorhandensein von palpierbarem Inhalt in der Gebärmutter oder pathologischem Ausfluss aus der Vagina wurde das Tier als klinisch apparent an chronischer Endometritis erkrankt bewertet. Tiere, die nach Adspektion und rektaler Untersuchung keine Anzeichen einer Endometritis aufwiesen, wurden in Studienbetrieb A zusätzlich mit einem Röhrenspekulum nach Götze vaginoskopisch untersucht. Bei der Vaginoskopie wurde auf das Vorhandensein von Flüssigkeitsansammlungen in der Vagina und auf Ausfluss aus der Cervix geachtet. In Studienbetrieb B beruhte die Diagnose allein auf der rektalen Untersuchung. Tiere ohne Ausfluss bzw. mit klarem Schleim wurden als gesund beurteilt. Diese Tiere gingen in eine parallel durchgeführte Studie ein, die nicht Gegenstand dieser Untersuchung war. Alle anderen Qualitäten an Ausfluss wurden als krankhaft angesehen. Tiere, die nach palpatorischer und gegebenenfalls vaginoskopischer Untersuchung klinische Anzeichen einer Endometritis aufwiesen, wurden in die Studie aufgenommen. Nach folgenden Kriterien wurden diesen Tieren die verschiedenen Endometritisgrade zugeordnet:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| Endometritis 1. Grades: | Uterus symmetrisch, jedes Horn zwei- bis dreifingerstark, trüber, rauchiger Ausfluss oder einzelne Eiterflocken im Schleim |
| Endometritis 2. Grades: | Uterus symmetrisch bis leicht asymmetrisch, unter der Hand versammelbar, evtl. fluktuierender Inhalt palpierbar, schleimig-eitriger Ausfluss |
| Endometritis 3. Grades: | Uterus asymmetrisch, nicht unter der Hand zu versammeln, fluktuierender Inhalt palpierbar, eitriges Ausfluss |
| Endometritis 4. Grades:
(Pyometra) | Uterus asymmetrisch, fluktuierender Inhalt palpierbar, kein Ausfluss
(Cervix geschlossen) |

Für die Dokumentation der Uterusbefunde bzw. der Größe und Funktionskörper der Ovarien wurde der Schlüssel nach (Grunert, 1999) benutzt. Der für die Dokumentation verwandte Befundbogen ist im Anhang aufgeführt.

3.3.2 Einteilung in die Behandlungsgruppen

Tiere mit klinischen Anzeichen einer Endometritis wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die Einteilung erfolgte anhand der Endziffer ihrer Transpondernummern. Endete die Transpondernummer mit den Ziffern 1 bis 3, wurden sie der Enzymgruppe zugeteilt. Tieren dieser Gruppe wurden durch eine Plastikpipette intrauterin 20 g des Enzympräparates Masti Veyxym[®] (2 Injektoren, Veyx Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland) verabreicht. Pro Injektor von 10 g enthält Masti Veyxym[®] 8 mg Chymotrypsin, 8 mg Trypsin, 4 mg Papain, 100.000 IE Retinolpalmitat (Vitamin A) und 120 mg α -Tocopherolacetat (Vitamin E). Vor der Applikation wurde die Scham der Tiere mit Zellstoff gereinigt, um Verschmutzungen zu vermeiden. Tiere, deren Transpondernummer mit den Ziffern 4 bis 6 endete, wurden der PGF_{2 α} - Gruppe zugeteilt. Diese Tiere erhielten subkutan 0,5 mg des Prostaglandin F_{2 α} - Analogons Cloprostenol (PGF Veyx forte[®], Veyx Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland). In der Trägersubstanzgruppe (Tiere deren Transpondernummer mit den Ziffern 7 bis 9 endete) wurde den Tieren intrauterin die Matrix des Enzympräparates verabreicht (20 g, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland). Diese enthielt keine Enzyme. Bei Tieren mit der Endziffer 0 war die vorletzte Ziffer der Transpondernummer ausschlaggebend für die Gruppeneinteilung. Die vorgenommene Behandlung wurde bei allen Tieren entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit bei der Puerperalkontrolle 2 (35.- 41 Tag pp., PK 2)) wiederholt. Dies geschah unabhängig vom Untersuchungsergebnis der PK 2. Eine Übersicht über die Behandlungsgruppen zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Behandlungsgruppen

Enzymgruppe	PGF _{2α} - Gruppe	Trägersubstanzgruppe
Masti Veyxym [®] (Trypsin, Chymotrypsin, Papain, 20 g, i.ut.)	PGF Veyx [®] forte (Cloprostenol, 0,5 mg, s.c.)	Trägersubstanz (Matrix, 20 g, i.ut).
2x im Abstand von 14 Tagen	2x im Abstand von 14 Tagen	2x im Abstand von 14 Tagen

3.3.3 Puerperalkontrolle 2 und 3

Alle Tiere der drei Behandlungsgruppen wurden 14 Tage nach der PK 1 erneut rektal untersucht (35. – 41. Tag pp., PK 2). Erschienen sie dabei klinisch gesund, wurde zusätzlich eine Vaginoskopie vorgenommen.

Die Tiere wurden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit zum zweiten Mal behandelt, unabhängig vom Ergebnis der gynäkologischen Untersuchung. Die Dokumentation erfolgte analog zur PK 1. Tiere, die bei der PK 2 Anzeichen einer Endometritis aufwiesen, wurden am 49. bis 55. Tag pp. in einer dritten Puerperalkontrolle (PK 3) erneut gynäkologisch untersucht. Waren diese Tiere nach der rektalen Palpation klinisch gesund, wurden sie zur Absicherung der Diagnose ebenfalls vaginoskopisch untersucht. Zeigten diese Tiere immer noch Anzeichen einer Endometritis, wurden sie entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit ein drittes Mal behandelt.

3.3.4 Kontrolluntersuchung und Sterilitätskontrolle

Die Freiwillige Wartezeit (FWZ) wurde auf 65 Tage (Studienbetrieb A) beziehungsweise auf 55 Tage (Studienbetrieb B) nach der Abkalbung festgelegt. Vor diesem Zeitpunkt sollten die Kühe nicht besamt werden. Am Ende der FWZ wurden alle in die Studie aufgenommenen Tiere gynäkologisch durch manuelle Palpation vom Mastdarm her untersucht. Ausgeschlossen von dieser Untersuchung waren Tiere, die zu diesem Zeitpunkt bereits besamt oder zuchtuntauglich waren. Tiere aus den drei Gruppen mit Anzeichen einer Endometritis wurden mit 0,5 mg Cloprostenol (PGF Veyx[®] forte) behandelt. Diese Maßnahme wurde vorgenommen, um den Betrieben gegebenenfalls nachteilige Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit der Tiere der Kontrollgruppe zu ersparen. Wiesen die Tiere bei der Kontrolluntersuchung (KU) einen palpierbaren Gelbkörper auf einem der Ovarien auf, so wurde ihnen zur Brunstinduktion 0,5 mg Cloprostenol subkutan verabreicht. Zeigten die Kühe an den darauf folgenden Tagen Anzeichen einer Brunst, wurden sie dem Besamungstechniker zur künstlichen Besamung (kB) vorgestellt. Tieren mit einer Zyste wurde 0,02 mg Buserelin (Receptal[®], 5ml, Intervet Deutschland GmbH) verabreicht. Kühe mit einer Azyklie (auf beiden Ovarien keine Funktionskörper palpierbar) erhielten 0,02 mg Buserelin (Receptal[®], 5ml, Intervet Deutschland GmbH), um die Ovaraktivität anzuregen. Bei einem Zystenverdacht wurden die Tiere mit einwöchigem Abstand erneut untersucht und dem Befund entsprechend behandelt. Wurde an Ovar oder Uterus von untersuchten Kühen eine Verwachsung diagnostiziert, so wurden die Tiere für zuchtuntauglich erklärt.

Tiere, die im Zeitraum zwischen dem Ende der FWZ und dem 100. Tag post partum nicht in Brunst gesehen und besamt worden waren, wurden zur gynäkologischen Untersuchung (Sterilitätsuntersuchung, Steri) vorgestellt. Die Sterilitätsuntersuchungen wurden im Abstand von 14 Tagen wiederholt, bis die Tiere erneut besamt waren. Je nach Diagnose wurden die Tiere nach dem gleichen Schema wie bei der KU behandelt. Tiere mit Anzeichen einer Endometritis erhielten unabhängig ihrer Gruppenzugehörigkeit 0,5 mg Cloprostenol (PGF Veyx[®] forte). Kühe, die länger als 200 Tage post partum (pp.) nicht tragend waren, wurden als Abgang wegen mangelnder Fruchtbarkeit gewertet, auch wenn sie zu einem späteren Zeitpunkt tragend wurden. Die Ergebnisse der KU und Steri sowie die vorgenommenen Behandlungen wurden auf dem Befundbogen (Anhang) dokumentiert. Eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Untersuchungen und Behandlungen gibt Abbildung 1.

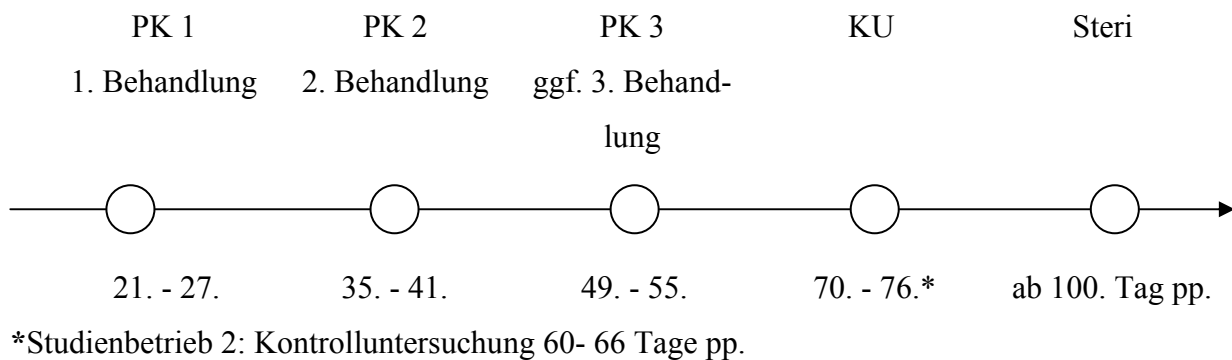


Abbildung 1: Schema zum Ablauf der Untersuchungen und Behandlungen

3.4 Studienzeitraum

In Studienbetrieb A wurden im Zeitraum vom 27.01.04 bis 18.03.05 an chronischer Endometritis erkrankte Kühe in die Studie aufgenommen. In Studienbetrieb B erfolgte die Aufnahme im Zeitraum vom 27.02.04 bis zum 18.04.05. Darüber hinaus wurden die Fruchtbarkeitskennzahlen der Tiere bis zum 200. Tag pp. erhoben und ausgewertet.

3.5 Statistische Auswertung

Die Heilungsrate wurde in den Behandlungsgruppen definiert als Anteil der Tiere, die bei der PK 2 beziehungsweise PK 3 keine Anzeichen einer klinischen Endometritis aufwiesen. Eine Kuh galt als zyklisch, wenn auf einem der Ovarien ein Funktionskörper palpierbar war. Zur Beurteilung der Fruchtbarkeit in den drei Behandlungsgruppen wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Fruchtbarkeitskennzahlen herangezogen.

Tabelle 2: Fruchtbarkeitskennzahlen und ihre Definition

Kennzahl	Definition
Freiwillige Wartezeit	Zeit pp., in der die Tiere nicht besamt werden sollen
Rastzeit [d]	Intervall Abkalbung- erste Besamung
Güstzeit [d]	Intervall Abkalbung- erfolgreiche Besamung
Brunstnutzungsrate [%]	$\frac{\text{Zahl besamter Tiere bis 21 Tage nach Ende der FWZ} \times 100}{\text{Zahl zu besamender Tiere nach Ende der FWZ insgesamt}}$
Erstbesamungserfolg [%]	$\frac{\text{Zahl tragender Tiere aus erster Besamung}}{\text{Zahl besamter Tiere insgesamt}}$
Konzeptionsrate [%]	$\frac{\text{Zahl tragender Tiere} \times 100}{\text{Zahl durchgeführter Besamungen insgesamt}}$

Die erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS[®] (Version 12.0, SPSS Inc. 2003) und dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel[®] (Version 2000, Microsoft) bearbeitet und ausgewertet.

Für die Auswertung der Behandlungsgruppen wurden neben der deskriptiven Statistik folgende statistischen Auswertungen vorgenommen:

- Binäre Logistische Regression für folgende Parameter:

Heilungsrate, Brunstnutzungsrate, Erstbesamungserfolg, Anteil tragender Tiere

Kovariaten: Gruppe, Laktationsnummer (Erstkalbin = 1 oder Altkuh = 0),

Ovaraktivität (1 = zyklisch/ 0 = nicht zyklisch), Betriebszugehörigkeit (0 = Betrieb A/ 1 = Betrieb B), Behandlungserfolg (0 = krank/ 1 = geheilt)

Darstellung Odds ratio¹ 95%-Konfidenz-Intervall, P-Wert,

- Cox - Regressionsanalyse für folgende Parameter:

Rastzeit (besamte Tiere), Güstzeit (tragende Tiere), Abgangstag

Kovariaten: Gruppe, Laktationsnummer (Erstkalbin = 1 oder Altkuh = 0),

Ovaraktivität (1 = zyklisch/ 0 = nicht zyklisch), Betriebszugehörigkeit (0 = Betrieb A/

1 = Betrieb B), Behandlungserfolg (0 = krank/ 1 = geheilt)

Darstellung Hazard ratio², 95%-Konfidenz-Intervall, P-Wert, Überlebenszeitkurve

- Chi - Quadrat-Test: Konzeptionsrate

Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha < 0,05$ festgelegt.

¹ **Odds ratio**: Die Odds bezeichnet das Verhältnis zwischen Auftretenswahrscheinlichkeit und Nichtauftretenswahrscheinlichkeit eines Ereignisses: $p/(1-p)$. Die „odds ratio“ bezeichnet das Verhältnis zweier Odds, z.B. der Odds mit, dividiert durch die Odds ohne Exposition zu erkranken und ist das Risikomaß der Fallkontroll-Studie.

² **Hazard ratio / Hazard Rate**: Die Hazard Rate ist ein Maß für die augenblickliche Ereignisdichte, geschätzt als Anzahl der Ereignisse bezogen auf die Personenzzeit unter Beobachtung. Das Hazard ratio entspricht dem Verhältnis der Hazard Raten zweier Gruppen.