

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Projekthintergrund

Das Forschungsprojekt „Collaborative Research on Dairy Production“ des Institutes für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit, Fachrichtung Internationale Tiergesundheit der Freien Universität Berlin in Zusammenarbeit mit der Addis Ababa University, Faculty of Veterinary Medicine sowie mit dem International Livestock Research Institute (ILRI) Addis Ababa / Debre Zeit wurde 1996 begonnen. Aufgrund bis dahin vorliegender Ergebnisse prospektiver Untersuchungen (TEGEGNE, 1998; SCHÖNE, 1996; BISHI, 1997; FRESE, 1998) wurde 1998 deutlich, dass weitere, strukturierte Untersuchungen notwendig seien, um erste Zusammenhänge zwischen Milchqualität, Melkhygiene und Managementfaktoren besonders im Kleinstmilcherzeugerbetrieb, aber auch für größere Milchbetriebe, erfassen zu können.

Ziel und Schwerpunkt dieser Untersuchungen war daher die Bestimmung von Mastitisprävalenzen und -inzidenzen auf Kuh- und auf Euterviertelebene sowie die Untersuchung von Ursachen für auftretende Qualitätsmängel und Defizite in der Milchhygiene; die Untersuchung sollte an einem definierten Querschnitt repräsentativer milchproduzierender Betriebe um die Hauptstadt Äthiopiens, Addis Ababa, durchgeführt werden.

3.2 Studiengebiet

Äthiopien liegt im Horn von Afrika mit einer Gesamtfläche von 1.133.380 km². Die Hauptstadt Addis Ababa sowie die Stadt Debre Zeit, in denen die Studie stattfand, befinden sich im Hochland Äthiopiens auf einer Höhe zwischen 1.850 und 2.550 Metern über dem Meeresspiegel. Das Studiengebiet umfasst eine Fläche von ca. 7.056 km². Niederschläge fallen in den Hochländern zweimal pro Jahr in ausreichenden Mengen zwischen Mai und September (Addis Ababa: 1.225 mm/Jahr, Debre Zeit: 975 mm/Jahr). Die Bevölkerung in dieser Region besteht zum größten Teil aus der Gruppe der Orhomo, die mit 40% die größte ethnische Bevölkerungsgruppe in Äthiopien, neben Amhara (32%) und Tigray (9%), ist. Die Straßen und Zufahrtswege in der Region sind

relativ gut ausgebaut, die Straße von Addis Ababa nach Debre Zeit wurde während der Studienperiode komplett erneuert. Die großen periurbanen Farmen waren über gut erhaltene Schotterwege zu erreichen, die maximale Entfernung von den Höfen zu den Hauptverkehrsstraßen betrug 5 km. In Addis Ababa sowie in Debre Zeit selbst gibt es ein gut ausgebautes Netz von Verbindungswegen zu den kleinen Milcherzeugern. Bedingt durch hohes Verkehrsaufkommen, betrug die Fahrzeit für die 70 km lange Strecke von Debre Zeit nach Sabeta, wo sich einige der Studienbetriebe befanden, jedoch 2,5 Stunden.

3.3 Studienpopulation

Das internationale Referenzlabor für Nutztierforschung in Afrika (International Livestock Centre for Africa, ILCA) begann 1995, die etwa 10.000 Milcherzeugerbetriebe im Umkreis von Addis Ababa und Debre Zeit drei identifizierten Farm-Clustern zuzuordnen (ILCA, 1995). Diese drei Cluster setzen sich aus großen periurbanen Betrieben, großen urbanen Betrieben und Betrieben kleiner urbaner Erzeuger zusammen. Aus diesen ILCA-Studien war bekannt (ILCA, 1995), dass in den 10.000 Betrieben etwa 40.000 Milchkühe aufgestellt waren.

ILCA's Grundlage für die Farm-Cluster war die betriebliche Struktur der Milcherzeuger in Äthiopien, die sich generell in 3 Kategorien einteilen lässt:

- private große periurbane und intraurbane landwirtschaftliche Erzeuger mit Milchproduktion als Haupterwerb
- staatlich geführte Milchbetriebe
- innerstädtische und periurbane Kleinbauern

Die großen privaten Betriebe halten etwa 15 bis 150 Milchkühe, die Milch wird zumeist vom Hof direkt und unbehandelt an Endabnehmer verkauft bzw. zu Milchprodukten (Käse, Yoghurt, Butter, Ayib) verarbeitet. Diese großen Erzeuger wirtschaften fast ausschließlich im Nebenerwerb, die Farmbesitzer sind Geschäftsleute und halten die Farm als sekundäre Einkommensquelle. Die staatlichen Betriebe halten 100 bis 250 Kühe und produzieren nach dem gleichen Prinzip wie die großen privaten Erzeuger. Kleine und Kleinstbetriebe mit bis zu 15 Tieren halten ihr Vieh am Haus in kleinen, meist primitiven Stallungen und wirtschaften auf Subsistenzebene.

Für die Studie wurde das ILCA-System der 3 Farm-Cluster übernommen. Aus 376 intraurbanen Betrieben in Addis Ababa und 36 periurbanen- und 368 intraurbanen Betrieben in anderen Regionen, um Addis Ababa, wurden insgesamt 37 Milchviehbetriebe ausgewählt. Die Auswahl erfolgte proportional und repräsentativ nach dem Prinzip der *Zwei-Phasen-stratifizierten Zufallsauswahl*.

Die 37 Betriebe teilten sich nach Region und Zahl folgendermaßen auf:

- Periurbane Produktionssysteme in der Umgebung von Addis Ababa (6 Farmen)
- Intraurbane Produktionssysteme in Addis Ababa (10 Farmen)
- Intraurbane Produktionssysteme in Debre Zeit (21 Farmen)

Die 6 periurbanen Betriebe in der Umgebung von Addis Ababa (Sabeta, Kaliti) sowie jeweils eine Farm in Addis Ababa und eine Farm in Debre Zeit waren laut Definition große landwirtschaftliche Erzeugerbetriebe mit insgesamt 367 Milchkühen. Die restlichen 29 Milcherzeuger waren Klein- und Kleinstbetriebe mit 1 bis 15 Kühen. Die Gesamtzahl der Kühe in diesem Cluster betrug 64. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Verteilung der Tiere und der Studienbetriebe.

Tabelle 4. Verteilung der Studienbetriebe und der Milchkühe

Ort und Betriebsgröße	Anzahl der Betriebe	Anzahl der Milchkühe (Durchschnitt)	Anzahl der laktierenden Kühe (Durchschnitt)
Debre Zeit (groß, urban)	1	52	20
Debre Zeit (klein, urban)	20	37 (2)	34 (1,7)
Addis Ababa (groß, urban)	1	45	19
Addis Ababa (klein, urban)	9	27 (3)	16 (1,7)
Kaliti (groß, periurban)	3	142 (47)	114 (38)
Sabeta (groß, periurban)	3	128 (43)	97 (32)
Summe:	37	431	300

Die Zahl der laktierenden Kühe (Durchschnitt N = 300) schwankte über die Studienzeit von einem Minimum von 289 bis zu einem Maximum von 316 Tieren, wobei die Anzahl der laktierenden Tiere vom Anfang bis zum Ende der Studie abnahm. Bei allen Tieren handelte es sich um Kreuzungen zwischen Holstein-Friesian Kühen (HF) und lokalen Rinderrassen (Zebu, Borana) mit mindestens 50% HF-Anteil.

3.4 Eigene Untersuchungen

3.4.1 Anzahl, Intervalle und Methodik der Farmbesuche

Alle Betriebe wurden während der 12-monatigen Untersuchungsperiode jeweils insgesamt 7 mal besucht. Ein Farmbesuch dauerte je nach Größe des Betriebes 1-3 Arbeitstage, da die Milchuntersuchung und Probenentnahme auf die Melkzeit beschränkt war. Mehrere kleine Farmen mit jeweils nur einer Kuh konnten allerdings auch an einem Tag bearbeitet werden. Der erste Besuch galt der Vorstellung der Untersuchungstätigkeiten auf der Farm sowie technischen Absprachen über den weiteren Studien- und Besuchsverlauf mit dem Personal. Weiterhin wurden die Farmdaten und die Primärdaten auf Einzeltierebene erfasst. Die nachfolgenden Farmbesuche (im Verlauf dieser Arbeit als 1. bis 6. Besuch beschrieben) dienten der Untersuchung der Milchkühe, der Erfassung von Veränderungen in der Herde zum letzten Besuch (Krankheiten im Bestand, trockengestellte und abgegangene Tiere, Neulaktationen und -zugänge) sowie zur Durchführung des Schalm-Tests und der Milchprobensammlung. Am jeweils 1. und 6. Besuch wurden dabei zur Erstellung eines Gesamtstatus in allen Betrieben von allen laktierenden Kühen Milchproben für die bakteriologische Untersuchung genommen, unabhängig vom Ergebnis des Schalm-Tests. Bei den Besuchen 2 bis 5 wurden hingegen Milchproben nur bei positivem Schalm-Test genommen. Alle Proben wurden vom Autor persönlich entnommen.

Aus administrativen und technischen Gründen fanden die ersten 3 Besuche, inklusive dem Vorstellungsbuch, auf den 37 Farmen zunächst in unregelmäßigen 6 bis 8-wöchigen Intervallen statt. Die nachfolgenden 4 Besuche wurden in festen 5-wöchigen Abständen durchgeführt.

3.4.2 Farmprofile und Kooperationsbereitschaft der teilnehmenden Farmer

Die 8 großen Farmen der Studie wurden ausschließlich von angestellten Farmleitern geführt (4 weiblich, 4 männlich). Die Besitzer betrieben die Milcherzeugung als Zweit- oder Dritterwerb mit dem Ziel, ein relativ stabiles und einfaches Nebeneinkommen zu erwirtschaften. Alle 8 Milcherzeuger betrieben die Milchproduktion exklusiv, es wurden lediglich umliegende betriebseigene Grasflächen (< 3 ha) zur Heuernte benutzt. Das Interesse am Farmgeschehen in diesem Farm-Cluster war seitens der Besitzer nur

in 2 Fällen ausgeprägt (Kaliti 1 und Kaliti 3), die anderen 6 waren an ihren Farmen wenig interessiert.

Während der Studienperiode hatte sich ein privates Milchsammel- und Verarbeitungssystem entwickelt, welches von einer Farm der ersten Phase der Studie initiiert wurde. Dieser für lokale Verhältnisse außergewöhnlich modernisierte Betrieb entwickelte mit 5 der anderen 8 großen Betriebe während der Studie, ausgehend von persönlichen Kontakten, einen Erzeugerverbund. Die Milch wurde von den 5 Betrieben mit einem Kleinlaster abgeholt und dann in Eigenregie verarbeitet. Die Lieferwege betragen bis zu 54 km und die Transportkette fand zur Studienzeit noch ohne Kühlung statt. In der modernen Anlage der Startfarm (Melkmaschine, Kühlmöglichkeiten, Yoghurtherstellung, Käserei, etc.) wurde dann eine Gesamtmenge von ca. 4200 Liter pro Tag inklusive der Eigenproduktion verarbeitet.

Die kleinen Milcherzeuger wirtschafteten im Familienverband; die anfallenden Arbeiten wurden meist von den Frauen erledigt bzw. eine Hilfskraft verrichtete die notwendige Melk- und Stallarbeit. Neben Milchkühen hielten ein Großteil der Kleinbauern eine kleine Herde Ziegen oder Schafe. Der anfallende Mist wurde in 21 der kleinen Farmen (75%) gesammelt, ausgebreitet, getrocknet und als Brennstoff verkauft. In den kleinen Betrieben in Addis Ababa fiel auf, dass ein Melker 4 verschiedene Farmen in der Umgebung betreute. Die gewonnene Milch wurde für die Familie genutzt bzw. wurden Überschüsse unbehandelte Milch an Nachbarn in der unmittelbaren Umgebung zum direkten Verbrauch verkauft.

Von den 37 Farmen zu Beginn der Studie schied ein großer Betrieb (siehe oben) am Anfang der Untersuchungen aus und wurde durch einen etwa gleich großen Hof (Kaliti 4) in der Umgebung ersetzt. Aus diesem Betrieb wurde die gleiche Anzahl laktierender Tiere in die Studienpopulation einbezogen (n=42). Alle anderen Milcherzeuger nahmen über den gesamten Zeitraum an der Studie teil. Die Kooperation der Studienfarmen war gut; da die Farmer von der Arbeit profitierten und die Melkhygiene durch Anweisungen und Ratschläge verbessert werden konnte, sahen sie einen Vorteil in der Mitarbeit an der Studie.

3.4.3 Veterinärmedizinische Betreuung der Herden

Das äthiopische 'Ministry of Agriculture' führte regelmäßig, in Kooperation mit PARC (Pan African Rinderpest Campaign), Impfkampagnen gegen Rinderpest und

Lungenseuche durch. Diese kostenlosen Impfungen waren obligatorisch, es wurde eine Impfabdeckung von 90% im ganzen Land angestrebt. Andere Impfmaßnahmen (Milzbrand, Blackquarter, Brucellose) waren dagegen fakultativ und wurden von den Rinderhaltern aus Kostengründen meist nicht durchgeführt.

Eine individuelle tierärztliche Betreuung von Herden oder Einzeltieren war wenig entwickelt. In Addis Ababa und der näheren Umgebung bestand zumindest die Möglichkeit, einzelne, limitiert vorhandene Tierarzneimittel zu kaufen. Die Tendenz der tierärztlichen Tätigkeit ging in Richtung von Privatinitiativen mit kleiner Praxis, scheiterte aber oft an fehlenden oder gar nicht vorhandenen Medikamenten und veterinärmedizinischen Ausrüstungsgegenständen. Tierärzte oder Veterinärassistenten betrieben daher meist selber nur den Handel von Tierarzneimitteln. Oft behandelten die Besitzer ihre Tiere selbst, ohne über ausreichende Sachkenntnis zu verfügen. Die Farmen der Studie wurden von einem Team von 4 äthiopischen Tierärzten beratend betreut, deren Leistungen von den Tierhaltern positiv aufgenommen wurden. Diese 4 Tierärzte wurden von ILRI-Äthiopien unterstützt.

3.4.4 Fragebögen und Farmbetrachtungen

Zur Erfassung der Strukturen der Milchbetriebe wurden eingehende Befragungen des Personals mit standardisierten Fragebögen (Anhänge I und II) vorgenommen. Schwerpunkte der Befragung waren der soziale Hintergrund des Betriebes, die Anzahl der Beschäftigten, deren Vorkenntnisse, Behandlungsstrategien bei Eutererkrankungen, eigene Einschätzungen der Mastitisproblematik und Mastitishäufigkeit, Kälberaufzuchtverfahren, Trockenstellmethode sowie generelles Betriebsmanagement. Weiterhin wurden Primärdaten über die Anzahl der Tiere im Betrieb, Anzahl der laktierenden Tiere, Ohrmarkennummern, Alter, Anzahl der Paritäten, Milchleistung, Laktationsstadium und Laktationslänge aufgenommen.

Neben den Befragungen spielte die direkte Beobachtung betrieblicher Abläufe sowie die Beurteilung der betrieblichen Infrastruktur eine wesentliche Rolle. Die Farmen wurden hinsichtlich ihrer baulichen Beschaffenheiten (geschlossene oder offene Stallungen), Belüftung der Stallungen, Befahrbarkeit der zuführenden Wege, Entfernungen zur nächsten Ortschaft (periurbane Betriebe), Bodenbeschaffenheit ausserhalb und innerhalb der Scheune, Hygienezustand in der unmittelbaren Umgebung

sowie im Stall, Weidequalität (falls vorhanden) und Weidemanagement beurteilt. Alle Milchviehbetriebe wurden jeweils vor und während der Melkzeit besucht.

Zum Melkvorgang wurden folgende Punkte notiert:

- Melkvorbereitung
- Handwäsche der Melker
- Euter- und Zitzenreinigung
- Kontrolle des Vorgemelks
- Melktechnik
- Verhalten des Personals
- Melkreihenfolge
- Handhabung der Milch nach dem Melken

Alle Informationen und Daten wurden in standardisierten Daten-Erfassungsbögen aufgenommen.

3.4.5 Klinische Untersuchung

Jedes Tier wurde vor der Milchuntersuchung einer klinischen Untersuchung unterzogen. Folgende Untersuchungskriterien wurden dabei, in Anlehnung an RADOSTITS et al. (1996), angewendet:

- Einschätzung des Allgemeinzustandes, Verhalten, Erscheinungsbild, Ernährungszustand, Haut und Haarkleid
- Bestimmung des „Body Condition Score“ (BCS)
- Untersuchung der Klauen und Gelenke
- Adspektion und Palpation des Euters sowie der Euterlymphknoten (*Lnn. mammarii*)
- Adspektion und Palpation der Zitze und Zitzenkuppe

3.4.6 Grobsinnliche Untersuchung der Milch

Vor dem Schalm-Test wurde das Milchsekret jedes Euterviertels grobsinnlich auf Abweichungen vom physiologischen Zustand untersucht. Das Viertelgemelk wurde auf Farbveränderungen, Geruch, Konsistenz und Beimengungen (Eiterflocken, Fibrinflocken, Blutkoagula) geprüft. Diese Sekretprüfung diente neben der klinischen Untersuchung zur Feststellung von klinischen Fällen von Mastitis. Für die grobsinnliche Milchkontrolle wurde eine schwarze Testschale des Schalm-Tests benutzt.

3.4.7 California-Mastitis-Test

Die Milch aller laktierenden Kühe wurde mit dem Schalm-Test untersucht. Der Schalm-Test, auch „California-Mastitis-Test“ (CMT) genannt, stellt ein semiquantitatives Diagnoseverfahren zur Feststellung erhöhter somatischer Zellzahlen in der Milch dar. Dabei wird das Anfangsviertelgemelk aller 4 Euterviertel individuell und gleichzeitig geprüft. Die Bezeichnungen Schalm-Test und CMT werden nachfolgend synonym verwendet.

Der Test beruht auf dem Prinzip, dass die DNS der Zellkerne der Zellen in der Milch mit den oberflächenaktiven Substanzen der Schalm-Testflüssigkeit einen Komplex bildet, der zu einer Viskositätsänderung der Milch führt. Diese Reaktion kann semiquantitativ abgelesen werden. Die Reaktion der Milch mit der Testflüssigkeit in der schwarzen Testschale und daraus resultierend die Abschätzung der somatischen Zellen pro ml Milch wird auf einer Skala von 0 bis 3+ kategorisiert. Interpretiert wird der Grad der Schleim- oder Gelbildung, wobei das Gel nicht der Milchkonsistenz entspricht, sondern einen vergleichenden Hinweis auf die Konsistenz gibt. Weiterhin lässt der Schalm-Test bedingt Rückschlüsse auf den Sekretionszustand des Eutergewebes zu, indem der pH-Wert gemessen wird. Ein alkalischer pH-Wert der Milch ($\text{pH} \geq 7,0$) weist auf eine Herabsetzung der sekretorischen Aktivität der Milchdrüse hin. Dies kann durch einen entzündungsbedingten Zustand hervorgerufen sein, tritt aber auch am Ende der Laktationsperiode ein. Der alkalische pH-Wert zeichnet sich im Schalm-Test durch intensive Purpurfärbung des Gemisches ab. Ein saurer pH-Wert von 5,2 und darunter ist relativ selten, deutet dann aber auf laktoseabbauende Keime in der Milchdrüse hin. Die saure Milch ist durch eine deutliche Gelbfärbung im Testgemisch zu erkennen.

Der Schalm-Test gibt bei minimalem Aufwand in relativ kurzer Zeit hinreichenden Aufschluss über Veränderungen der Milch oder der Milchdrüse. Der Untersuchende muss allerdings über genügend Erfahrung beim Ablesen des Tests verfügen, um zu konstanten Klassifizierungen zu gelangen. Der Schalm-Test kann vom Landwirt ohne weiteres selber angewendet werden, um verdächtige Milchkühe zu selektieren.

Um zuverlässige Resultate zu erlangen, wurde zur Testdurchführung den Empfehlungen von PHILPOT und NICKERSON (1991) in der Studie gefolgt:

Das Euter wurde angerüstet, und die ersten Milchstrahlen wurden verworfen. Die Testschale wurde so unter das Euter gehalten, dass der Griff der Schale nach lateral zum Untersuchenden zeigte. Die 4 kleinen Sammelbehälter der Testschale sind mit den

Buchstaben A, B, C, D gekennzeichnet. Wird die Kuh von rechts gemolken, so entspricht die Reihenfolge der Buchstaben den Eutervierteln vorne rechts (A), hinten rechts (B), vorne links (C) und hinten links (D). Bei der Untersuchung von der linken Seite muss entsprechend auf die umgekehrte Zitzenreihenfolge geachtet werden.

Es wurden etwa 2 ml Milch jedes Viertels in die Schale gemolken. Für die Entnahme der Testmilch ist keine Zitzendesinfektion notwendig, lediglich eine grobe Euterreinigung wurde durchgeführt. Die Zugabe der Testflüssigkeit erfolgte mittels einer Plastiksprayflasche. Das Verhältnis Milch zu Testflüssigkeit sollte 1:1, im Idealfall 1:1,5 sein. Das Ergebnis wird durch höhere Mengen Testflüssigkeit nicht verfälscht, eine Überdosierung sollte aber aus Kostengründen vermieden werden. Die Testschale wurde nun leicht kreisend bewegt, um eine Reaktion zu erzeugen. Nach etwa 15 Sekunden zeigte sich bei erhöhtem Zellgehalt die Gelbildung. Die Ergebnisse ließen sich in 5 Kategorien einteilen: Bei physiologischer Milchkonsistenz blieb die Probe flüssig und ohne sichtbare Veränderungen. Wies die Probe zarte Schlieren auf, die bei längerem Rotieren verschwanden, so war das Ergebnis zweifelhaft. Bei einem schwach positiven (+) Ergebnis war die Probe schlierig, wies jedoch keine ausgeprägten Schleimspuren auf. Ein deutlich positives (++) Ergebnis lag vor, wenn sich die Mischung rasch verdickte, jedoch die flüssige Phase bestehen blieb. Die Flüssigkeit neigte dazu, sich bei kreisenden Bewegungen in der Mitte der Schale anzusammeln; wurde mit den Bewegungen aufgehört, so verteilte sich die Probe wieder. Bei einem stark positiven (+++) Resultat wurde die Probe zähschleimig bis gallertig und bildete im Mittelpunkt der Schale einen kuppelartigen nicht-fließenden Schleimpfropf.

Die Interpretation des California-Mastitis-Tests mit Referenzwerten für somatische Zellzahlen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5. Interpretation des California-Mastitis-Tests

Skala	Gelbildung	Ergebnis	Mittelwert der somatischen Zellen/ml	Zahlenbereich Zellen in 1000/ml
0	keine	negativ	100.000	< 200
Spuren	leicht	zweifelhaft	300.000	150-500
1	leicht-mittel	positiv	900.000	400-1.500
2	mittel	positiv	2.700.000	800-5.000
3	stark	positiv	8.100.000	> 5.000

Quelle: Schalm et al. (1971)

Milchproben mit zweifelhaftem Ergebnis wurden als negativ bewertet, und es wurden keine weitergehenden mikrobiologischen Untersuchungen durchgeführt, außer bei dem ersten und sechsten Untersuchungsbesuch der Betriebe. An diesen beiden Terminen wurde, unabhängig von dem Schalm-Test, eine Milchprobe aller Tiere zur Untersuchung genommen. Milchproben, die als 1 bis 3 positiv beurteilt wurden, wurden in jedem Fall einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen.

3.4.8 Somatische Zellen in der Milch

Somatische Zellen, speziell neutrophile Granulozyten sowie Leukozyten, Epithelzellen und andere Zellen dringen bei mechanischer und chemischer Irritation sowie bei bakterieller Invasion in die Milchdrüse ein (RADOSTITS et al., 1994a). Die Zählung der somatischen Zellen ist daher eine sinnvolle und nützliche Methode zur Kontrolle der Eutergesundheit und Milchhygiene.

In westlichen Industrieländern gehört die Zellzahlbestimmung zur normalen Routinediagnostik in der Milchhygiene und Qualitätsüberwachung. In vielen Entwicklungsländern wird dieses Verfahren zumeist noch nicht angewendet, in Äthiopien kommt es nicht zur Anwendung dieses Verfahrens. Weiterhin gibt es keine staatliche Instanz oder private Initiativen, die Qualitätskontrollen von Milch durchführen.

Um neben der groben Schätzung durch den Schalm-Test eine präzisere quantitative Aussage über den Zellgehalt der Milch zu erhalten, wurde in der Studie die direkte mikroskopische Zellauszählung durchgeführt. Bei allen Milchproben, die im Schalm-Test positiv waren, wurde der Zellgehalt pro Milliliter Milch ausgezählt.

Die direkte mikroskopische Zellzählung (DMZZ) nach BREED (1910) ist eine direkte visuelle Methode zur Bestimmung der Gesamtanzahl von Zellen in der Milch. In diesem Verfahren werden Zellen ausgezählt, deren Zellkerne sich nach Anfärbung mit Toluidinblau deutlich visuell erfassen ließen.

3.4.8.1 Kurzbeschreibung des DMZZ-Arbeitsprinzips

0,01 ml der zu untersuchenden Milch wurden mittels einer Mikrospritze auf einer Fläche von 1cm² auf einem Objektträger ausgestrichen. Der Ausstrich wurde getrocknet und danach mit Toluidinblau angefärbt. Die Auszählung erfolgte visuell unter dem Mikroskop. Die in einem definierten Ausschnitt gefundene Anzahl somatischer Zellen

wurde dann zur Bestimmung des Zellgehalts pro ml Milch mit einem Arbeitsfaktor multipliziert.

3.4.8.2 Material und Reagenzien

Folgende Materialien und Reagenzien wurden für die direkte mikroskopische Zellauszählung benötigt:

- Standardmikroskop mit Vergrößerung x 500 – 1.000
- Mikrospritze 0,01 ml mit Genauigkeit $\pm 2\%$
- Standard Objektträger mit Schablone (20mm x 5mm)
- Wärmeplatte (30°C - 50°C), nivelliert
- Wasserbad, einstellbar auf 30°C bis 40°C
- Objektträger mit mikrometrischer Teilung (0,01mm), Carl Zeiss®
- 0,2 % Toluidinblau
- Äthanol, absolut

3.4.8.3 Fixierung und Anfärbung des Präparates

Die gekühlte Milch ($< 6^{\circ}\text{C}$) sollte nicht länger als 12 Stunden vor der Untersuchung aufbewahrt werden. Ein Gefrieren der Milch ist unbedingt zu vermeiden, da sich die Zellkerne nach Gefrieren nicht mehr darstellen. Zur Untersuchung wurde die Milch auf 30°C bis 40°C angewärmt und gründlich durchmischt. Dann wurde die Probe auf Eichtemperatur der Mikrospritze (z. B. 20°C, bzw. Raumtemperatur) temperiert.

Die Objektträger wurden mit Äthanol gereinigt, mit staubfreiem Papier abgewischt, abgeflammt und dann gekühlt. Mit der Mikropipette wurden 0,01 ml der vorbereiteten Milch abgemessen und auf der Objektträgerfläche über der Schablone verteilt. Die Verteilung der Milch soll gleichmäßig dünn auf der Fläche von 20 mm x 5 mm geschehen. Anschließend erfolgte die Fixierung des Ausstriches auf der nivellierten Heizplatte bis er völlig abgetrocknet war. Danach wurden die Ausstriche 10 min bis 15 min mit Äthanol fixiert. Zur Färbung wurde das Präparat 30 sec bis 1 min in der Toluidinlösung blaugefärbt und anschließend luftgetrocknet. Anschließend wurden Farbüberschüsse vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Von jeder Milchprobe wurden 2 Präparate angefertigt.

3.4.8.4 Ermittlung an Zellgehalten

Der Gesichtsfelddurchmesser des Mikroskops musste vor dem Gebrauch mit dem mikrometrischen Objektträger (Carl Zeiss®) entsprechend der gewählten Vergrößerung (500x – 1.000x) einjustiert werden. Jede Mikroskopart hat einen unterschiedlichen Durchmesser des mikroskopischen Gesichtsfeldes. Die Ermittlung des Durchmessers ergab einen Faktor, der in die spätere Kalkulation der Zellzahlen pro ml Milch einging. Bei der Zellauszählung wurden die angefärbten Zellkerne gezählt. Alle sichtbaren Zellkerne, d.h. auch Kerne, die am Rand eines Gesichtsfeldes halb sichtbar waren, wurden gezählt. Pro Ausstrich wurden 20 Gesichtsfelder nach dem Zufallsprinzip ausgezählt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Bewegung des Objektträgers mit der Mikrometerschraube in eine Richtung geht, d.h. von links oben nach rechts unten oder umgekehrt. Nachdem das arithmetische Mittel der Anzahl der Zellkerne aus den 20 ausgezählten Feldern berechnet wurde, erfolgte die Kalkulation der Anzahl der Zellen pro Milliliter Milch. Hierzu wurde zunächst ein Arbeitsfaktor (Af) mit Hilfe der folgenden Formel entwickelt:

$$Af = (d / 2)^2 \times \pi$$

d = Durchmesser des Gesichtsfeldes

Dieser Arbeitsfaktor ging in die Formel zur Bestimmung der Gesamtzahl der Zellen pro ml Milch ein:

$$\text{Zellzahl / ml} = a \times (10.000 / Af)$$

a = Mittelwert der ausgezählten Zellen

Af = Arbeitsfaktor

Um das arbeitsaufwendige mikroskopische Zählverfahren etwas zu erleichtern, wurde ein maximaler Grenzwert für die Zählung der somatischen Zellen in einem Gesichtsfeld des Mikroskops definiert. Wurden in den ersten 5 Gesichtsfeldern mehr als 50 Zellkerne pro Feld ausgezählt, so erfolgte eine Schätzung der Zellkerne in den übrigen 15 Feldern. Erschienen die Zellzahlen gleich hoch (± 50), wurde die Probe als „sehr hoher Zellgehalt“, „too numerous to count“ (TNTC) eingestuft. In diesem Fall ergab die berechnete Zahl von 50 Zellen pro Feld ein Gesamtergebnis von 14.451.000 somatischen Zellen pro ml Milch. Dieser Wert lag deutlich über einer stark mit somatischen Zellen belasteten Milchprobe (Mittelwert bei sehr hohem Zellgehalt = 8,1 Mio. Zellen pro ml).

3.4.9 Milchprobennahme

Bei einem positiven Schalm-Test-Resultat wurde für die bakteriologische Untersuchung eine Milchprobe des jeweiligen Euterviertels entnommen. Zusätzlich wurde beim ersten und letzten Farmbesuch von allen Eutervierteln eine Milchprobe, ohne Berücksichtigung des Schalm-Tests, bakteriologisch untersucht. Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, wurde bei der Entnahme auf größtmögliche Sauberkeit und korrekte Handhabung geachtet. Antibiotisch behandelte Euterviertel wurden registriert, aber die Milchentnahme entfiel.

Alle Viertelgemelksproben wurden ausschließlich vom Untersuchenden selber mit folgender Entnahmetechnik genommen:

- Die ersten Milchstrahlen wurden verworfen (Stripcup, Eimer)
- Die verschmutzte Zitzenhaut wurde gereinigt
- Die Zitzenenden und die Strichkanalöffnung wurden mit in Äthylalkohol (70%) getränkter Watte desinfiziert
- Das sterile Proberöhrchen wurde geöffnet und der Deckel dachähnlich mit Daumen und Zeigefinger über der Öffnung gehalten
- 4-5 ml des mittleren Milchstrahls wurden möglichst horizontal in das schräg gehaltene Gefäß gemolken, ohne dass die Euterzitze das Röhrchen berührte
- Das Röhrchen wurde verschlossen und zum Transport in einer Kühlbox aufbewahrt
- Das Röhrchen wurde mit folgender Information gekennzeichnet: Farmnummer, Datum, Ohrmarkennummer, Euterviertel

3.4.10 Mikrobiologische Untersuchung

Die Milchproben wurden in der Dairy Technology Unit (DTU) von ILRI / Debre Zeit bakteriologisch untersucht. Das Labor verfügt über alle notwendigen diagnostischen Einrichtungen sowie über entsprechend ausgebildetes Fachpersonal zur Durchführung der mikrobiologischen Diagnoseschritte.

3.4.10.1 Kulturen

Die Kulturen wurden mit nicht-selektivem Columbia-Blut-Agar sowie mit McConkey-Agar im Direktausstrich auf einem Viertel der Agarplatte mit einer Öse (Durchmesser 0,1 cm) angesetzt. Nach 24 Stunden Inkubation (37°C) wurden die Proben auf

bakterielles Wachstum untersucht. Ergab das Resultat kein oder geringes Wachstum, so wurde die Inkubation um 24 Stunden verlängert. Die Proben wurden dann nach folgendem in vorherigen Studien entwickelten Bewertungsschema (TEGEGNE, 1998; BISHI, 1998; FRESE, 1999) beurteilt:

- Eine Probe war positiv, wenn einer der bekannten Mastitiserreger in wenigstens 1 Kolonie auf dem Kulturmedium vorhanden war
- Eine Probe war negativ, wenn nach 48 Stunden kein Wachstum zu sehen war
- Eine Probe war kontaminiert, wenn vereinzelt oder vermehrtes Wachstum von verschiedenen Kolonien, Umweltkeimen, Koliformen, Hefen oder Pilzen auftrat

3.4.10.2 Diagnostische Verfahren

Zur Einordnung der isolierten Mikroorganismen wurden zunächst Reinkulturen angefertigt, d.h. von der ersten gewachsenen Kultur wurde ein Kolonieabstrich entnommen und daraus ein Isolat erneut inkubiert. Diese Reinkulturen wurden hinsichtlich der Koloniemorphologie und deren Besonderheiten (Kolonieform, Größe, Pigmentierung, Geruch und Hämolyseeigenschaften) beurteilt. Weiterhin wurde auf physiologische Merkmale wie Wachstumsverhalten (strikt aerob oder anaerob) sowie Fähigkeiten, bestimmte Stoffwechselleistungen zu erbringen (z.B. Abbau bestimmter Kohlenhydrate) untersucht.

Die Kolonien, die auf dem allgemeinen Nährmedium angesetzt waren, wurden zur Identifizierung in 5 Kategorien nach folgender Direktive eingeteilt (NATIONAL-MASTITIS-COUNCIL, 1987):

- klein, durchsichtig, streptokokkenähnlich; groß, undurchsichtig staphylokokkenähnlich; groß, mukoid, koliformähnlich; andere große, trockene oder feuchte Kolonien; geringes oder kein Wachstum nach 24h, aber nach 48h.

Von allen Kulturen, die auf dem Columbia-Blut-Agar oder auf dem McConkey-Agar nach den oben genannten Kriterien Wachstum zeigten, wurde eine Gram-Färbung angefertigt. Diese Isolate wurden dann mikroskopisch untersucht und als gram-positive Bazillen, Hefen oder Pilze, Kokken, Kokkobazillen oder als gram-negative Stäbchen klassifiziert.

Gram-positive Kokken wurden nachfolgend durch den Katalase-Test differenziert. Der Katalase-Test beruht auf dem Prinzip, dass Staphylokokken das Enzym Katalase produzieren und mit Wasserstoffperoxid reagieren. Das Enzym spaltet

Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff. Diese Reaktion ist deutlich durch Blasen- und Schaumbildung zu erkennen. Positiv reagierende Keime wurden als Staphylokokken identifiziert, negative Reaktionen wiesen auf Streptokokkenarten hin.

Die weiterführende Diagnostik differenzierte mit dem Koagulase-Test Staphylokokkenarten in *Staphylococcus aureus* und koagulase-negative-Staphylokokken (KNS). Die enzymatische Koagulaseaktivität von *Staphylococcus aureus* hat die Fähigkeit, Blutplasma zur Gerinnung zu bringen. Dafür wurde durch Citrat ungerinnbar gemachtes Kaninchenplasma als Testsubstanz verwendet. Das Plasma wurde mit einem Tropfen der zu prüfenden Bakterienkultur vermischt und 3 Stunden im Wasserbad bei 37°C verwahrt. Bei Eintreten von Blutgerinnung konnte auf *Staphylococcus aureus* geschlossen werden. Koagulase-negative Staphylokokken besitzen keine Koagulaseaktivität. Die Gruppe der KNS besteht aus mehr als 20 Spezies, die sich überwiegend als apathogen darstellen oder, wie die Vertreter *Staphylococcus hyicus* und *Staphylococcus epidermidis*, als opportunistische Erreger in die Milchdrüse eindringen können. Diese Gruppe wurde nicht weiter subklassifiziert und stellte eine Erregergruppe für sich dar.

Streptokokkenarten wurden durch folgende weiterführende biochemische Tests unterschieden: CAMP-Test und Äskulinhydrolyse zur Identifizierung von *Streptococcus agalactiae* (CAMP-positiv, Äskulin-negativ) und *S. dysgalactiae* (CAMP-negativ, Äskulin-negativ) sowie Zuckerfermentationstests (Raffinose, Mannitol, Inulin und Salicin) zur Differenzierung von *S. uberis* und *S. bovis*.

Der CAMP-Test, bezeichnet nach den Erfindern Christie, Atkins und Münch-Petersen, ist ein Kulturverfahren zur Streptokokkendifferenzierung. Auf einer Blutagarplatte wurde ein β -hämolisierender *Staphylococcus aureus* - Stamm quer aufgeimpft. Die zu untersuchenden Streptokokkenstämme wurden senkrecht dazu, ebenfalls strichförmig, bis nahe an den Staphylokokken-Stamm heran, aufgetragen. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C bildete *Staphylococcus aureus* im Hämolysebereich eine erweiterte schüssel- oder trichterförmige Hämolysezone in Richtung des *Streptococcus agalactiae*. Bei anderen Streptokokkenarten tritt dieses Phänomen selten auf und die Diagnose *Streptococcus agalactiae* gilt als gesichert.

Bei der Äskulinhydrolyse wird Äskulin in Glukose und Äskuletin gespalten. *S. uberis* und *S. bovis* besitzen diese Hydrolysefähigkeit. Nach Bebrütung von Äskulin und dem zu untersuchenden Bakterienstamm in einer Nährbouillon bei 37°C entstand im positiven Fall nach 3 – 4 Tagen bei Zugabe von Eisenzitrat ein grünlich-schwarzer Niederschlag. Bei nicht erfolgter Hydrolyse blieb die Bouillonkultur gelblich-grau.

Die Zuckerfermentationstests dienten der konfirmatorischen Differenzierung der anderen Streptokokkenstämme.

Das Flussdiagramm in Abbildung 1 fasst die einzelnen Diagnoseschritte zusammen.

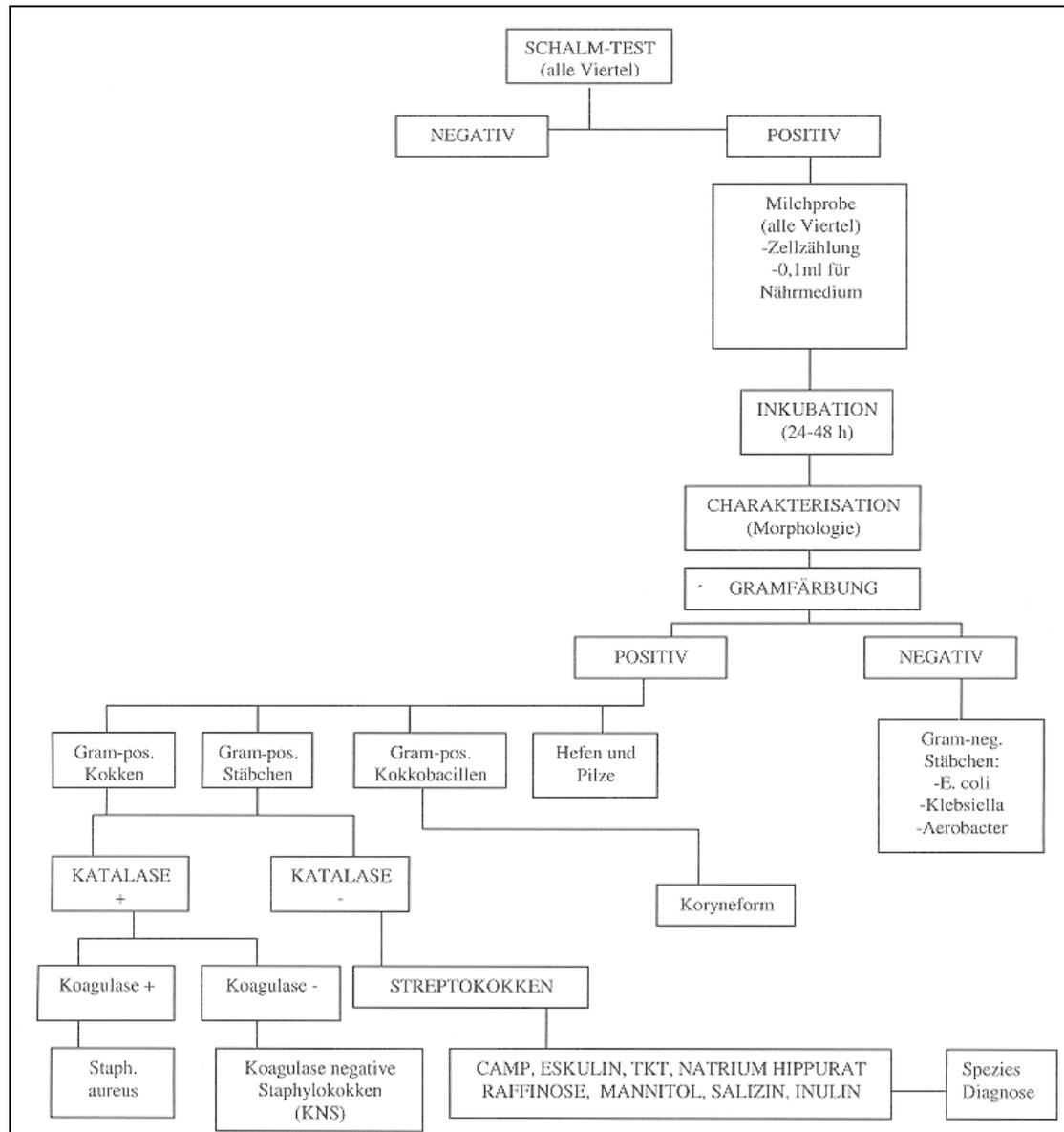


Abbildung 1. Flussdiagramm zur Darstellung der Untersuchungsschritte zur Differenzierung von Mastitisserregern (NATIONAL-MASTITIS-COUNCIL, 1987)

3.5 Statistische Aufbereitung der Daten

Dateneingabe, deskriptive Statistik und Tabellen wurden mittels des Computerprogramms MS EXCEL durchgeführt bzw. erstellt. Zunächst wurden die Daten durch einfache statistische Maßzahlen wie Datenumfang, Mittelwert, Median und relative Häufigkeiten beschrieben und Konfidenzintervalle berechnet. Konfidenzintervalle (KI) stellen immer 95%-ige KI dar. Die Ergebnisse wurden in Tabellenform oder Grafiken (Häufigkeitsdiagramme, Linien- bzw. Säulendiagramme, Pie-Charts, Box-and-Whisker-

Plots) zusammengefasst. Die Datenanalyse bezieht sich auf Farm-, Kuhpopulations- und Euterviertelebenen.

3.5.1 Mastitisprävalenzen

Für die Schalm-Test-Resultate wurden Prävalenzen auf Euter-, Kuh- und Betriebsebene berechnet. Die Beschreibung auf Euterviertelniveau erfolgte durch Darstellung prozentualer Häufigkeiten von Erkrankungen mittels Häufigkeitsdiagrammen bzw. linearer Verteilungen der Häufigkeiten. Das Auftreten von Mastitis auf Kuhebene wurde mit zwei Bezugsvariablen beschrieben: Euterviertel und Betriebsebene und wurde ebenfalls durch Häufigkeitsdiagramme dargestellt. Prävalenzen auf Betriebsebene wurden für die großen Farmen individuell beschrieben, die Mastitishäufigkeiten auf den kleinen Farmen wurden, nach geographischer Lage geordnet, in zwei Gruppen zusammengefasst (Addis Ababa und Debre Zeit).

Die Darstellung der mikrobiologischen Befunde erfolgte ebenfalls auf den drei Ebenen Euterviertel-, Kuh- und Betriebsebene. Bei der Beschreibung der Häufigkeiten des Auftretens bakterieller Erreger wurde die Farmebene betont, da Zusammenhänge zwischen Management-/Umweltfaktoren und Mastitisprävalenzen von besonderem Interesse waren.

3.5.2 Mastitisinzidenzen

Die Morbiditätsraten für Mastitis wurden in der Studie als Inzidenzdichterraten nach THRUSFIELD (1995) berechnet:

$$\text{Mastitis - Inzidenzdichte - Rate} = \frac{\text{Anzahl der neuerkrankten Kühe}}{\text{Summe der Risikotage der Tiere im Risiko}}$$

In die Berechnung wurden alle laktierenden Kühe einbezogen, neuerkrankte Tiere wurden mit der Hälfte des Zeitintervalls von 5 Wochen in die Inzidenzrate aufgenommen. Neulaktationen sowie neulaktierende Tiere, welche direkt an Mastitis erkrankt waren, gingen nach dem gleichen Prinzip mit der Hälfte des Intervalls in die entsprechende gesunde Risikopopulation bzw. erkrankte Tiergruppe ein. Chronische Mastitiden, die über den gesamten Studienzeitraum vorhanden waren, gingen als einmaliger Erkrankungsfall in die Berechnung ein. Das Tierzeitrisiko wurde in Tagen berechnet.

Grundlagen der Berechnung der Inzidenzdichterate (Zähler) waren ein positiver Schalm-Test sowie eine positive bakteriologische Diagnose. Klinische und subklinische Mastitisfälle wurden separat berechnet.

Die 95% Konfidenz-Intervalle der Inzidenzdichterten wurden nach der Formel 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 Kuhtage)

3.6 Testvergleich: somatische Zellen in der Milch

Die Ergebnisse des Schalm-Tests wurden mit den Ergebnissen der direkten mikroskopischen Auszählmethode der somatischen Zellen verglichen und dargestellt. Die Übereinstimmung der beiden Tests wurde in Spannweiten ermittelt, da der Schalm-Test im Gegensatz zur Auszählmethode Überlappungen in der Einordnung von Resultaten zulässt (siehe Tabelle 5). Weiterhin war die Beurteilung des CMT-Feldergebnisses auf den Farmen einer gewissen Subjektivität des Prüfers (ausnahmslos des Autors) unterlegen; die positiven Fälle wurden jedoch aufgrund der einfachen Methode des Schalm-Tests zumeist entdeckt. Die mikroskopische Auszählung der somatischen Zellen pro Milliliter Milch stellt dagegen eine genauere Einschätzung der vorhandenen Zellen in der Milch dar. Da in Äthiopien wenig Erfahrungen über die somatische Zellzählung vorhanden sind und keine Referenzwerte zur Verfügung stehen, wurde die Übereinstimmung beider „Tests“ in 2x2 Kontingenztafeln für den ersten und letzten Besuch dargestellt. Dies diente hauptsächlich dem konfirmatorischen Vergleich der eventuell von westlichen Standards abweichenden Zellzahlen. Die Unterteilung erfolgte, dem ILCA-Schema (ILCA, 1995) folgend, in den 3 Farmstrata: große peri-urbane Farmen, große urbane Farmen und kleine Milcherzeuger. Die prozentualen Übereinstimmungen, Unterschätzungen und Überschätzungen der Schalm-Test Ergebnisse im Vergleich zur Zellauszählung wurden gegenübergestellt und verglichen.