

3 Material und Methoden

3.1 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit sollte der Evaluierung der Cytobrush-Methode zur Diagnostik von subklinischen Endometritiden bei Milchkühen nach Abschluss des klinischen Puerperiums dienen. In einer Feldstudie wurden hierzu Zellen mittels Cytobrush-Methode aus der Gebärmutter klinisch unauffälliger Kühe (21.-27. Tag p.p.) gewonnen. Ein möglicher Grenzwert des PMN-Gehaltes für eine subklinische Endometritis sollte gefunden werden. Die Auswirkung einer subklinischen Gebärmutterentzündung auf die folgende Fruchtbarkeitsleistung der untersuchten Tiere wurde ermittelt.

3.2 Beschreibung des landwirtschaftlichen Betriebes

Der Betrieb auf dem die Untersuchungen durchgeführt wurden, lag nordöstlich von Berlin im Landkreis Barnim, Brandenburg. Organisatorisch war er in zwei Abteilungen unterteilt. Die Pflanzenproduktion diente in erster Linie zur Herstellung von betriebseigenem Futter. In geringem Anteil wurden auch Marktfrüchte produziert. Die Milchproduktion wurde ausschließlich kommerziell betrieben. Die Milchkuhherde bestand aus ca. 750 Kühen. Die Rasse Deutsches Schwarzbuntes Milchrind sowie die Rasse Holstein Friesian waren zu je etwa 10% vertreten. Etwa 80% der Kühe waren Kreuzungstiere der beiden Rassen. Einige wenige Rotbunte Kühe befanden sich in der Herde. Die weiblichen Kälber wurden innerbetrieblich in den Aufzuchtbetrieb umgesetzt und kamen als tragende Färsen in den milchproduzierenden Sektor zurück. Die männlichen Kälber blieben 14 bis 20 Tage in dem Betrieb und wurden dann an den RBB GmbH (Rinderzuchtverband Berlin-Brandenburg GmbH) verkauft. Eine Übersicht betriebsrelevanter Daten findet sich in der Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über den Versuchsbetrieb

Parameter	Betrieb
Landwirtschaftliche Nutzfläche	1100 Hektar
Arbeitskräfte in der Tierproduktion	11 Angestellte
Herdengröße (Stand 10/2003)	759 Milchkühe
Rassen	Holstein Friesian, Schwarzbuntes Milchrind, Kreuzungstiere
Haltungsform	Liegeboxen-Laufstall mit Spaltenböden und Gummimatten Krankenreihe und Abkalbestall mit Anbindehaltung (Grabner-Ketten)
Fütterung	Grundfuttermischung mit leistungsbezogener Kraftfuttergabe (Transponderfütterung)
Melktechnik	2 x 20 Side-by-Side
Milchleistung kg / Kuh (Milchjahr 2002-2003)	8200 kg verkaufte Milch
Milchinhaltsstoffe	4,1% Fett 3,5% Eiweiß

3.2.1 Haltungsform und Melktechnik

Nach der Abkalbung verbrachten die Kühe die erste Woche im Abkalbestall (Gruppe 8). Anschließend wurden sie in die Gruppe der frühlaktierenden Kühe umgestellt (Gruppe 5). Nach etwa 7 Wochen p.p. wurden die Tiere in zwei Leistungsgruppen mit jeweils etwa 150 Tieren aufgeteilt (Gruppen 1 und 2). In diesen beiden Gruppen wurden die Kühe besamt und blieben dort bis zur Feststellung der Trächtigkeit. Tragende Kühe und Kühe mit einer Milchleistung unter 25 Litern wurden ebenso in zwei Gruppen gehalten (Gruppen 3 und 4). Zuchtuntaugliche Kühe blieben bis zu ihrem Abgang aus dem Betrieb in Gruppe 4.

Acht bis sechs Wochen vor dem errechneten Abkalbetermin wurden die Kühe trockengestellt und in eine Stallzeile im Wandbereich des Boxenlaufstalls verbracht. Diese hatte Liegefressboxen und eine Faltschieberentmischung. In den Sommermonaten war partiell ein

mit Stroh eingestreuter Auslauf zugänglich (Gruppe 7). Die tragenden Färsen wurden räumlich abgetrennt in gleicher Art wie Gruppe 7 aufgestellt.

Drei bis zwei Wochen vor dem erwarteten Kalbetermin wurden die Färsen und tragenden Kühe aus der Trockenstehergruppe (Gruppe 7) in den Abkalbestall gebracht (Gruppe 8). Dort wurden sie in Anbindehaltung (Grabner-Ketten) in Kurzständen mit Gummimatten und Gitterrosten gehalten. Kranke Tiere wurden in gleicher Weise aufgestellt (Gruppe 6).

Die laktierenden Kühe der einzelnen Gruppen (Gruppe 1, 2, 3, 4 und 5) wurden in Boxenlaufställen mit Spaltenböden gehalten. Die Liegeboxen waren mit Gummimatten ausgelegt.

Alle melkenden Kühe wurden zweimal täglich in einem Doppel-20er-Side-by-Side Melkstand (Firma Alfa Laval) gemolken. Kühe der Krankenreihe und Tiere im Abkalbestall wurden mit einer Rohmelkanlage (Firma Alfa Laval) gemolken.

3.2.2 Fütterung

Das Grundfutter der Ration stammte aus betriebseigenem Anbau. Grundfutterkomponenten waren Maissilage, Silage aus Ganzpflanzen, Grassilage, Lieschkolbensilage, Pressschnittel und Soja, sowie Stroh zur Erhöhung des Rohfaseranteils. Je nach Laktationsstadium (Gruppenzugehörigkeit) war die Grundfuttermischung unterschiedlich zusammengesetzt. Sie wurde fünf- bis sechsmal am Tag auf den Futtertischen angeboten. Zusätzlich wurde Milchleistungsfutter 18/3 (18% Eiweiß, Energieklasse 3) gefüttert. Diese Kraftfuttermenge wurde leistungsbezogen zugeteilt und über Transponderfütterung kontrolliert.

3.2.3 Datenerfassung im Betrieb

Die Datenerfassung auf dem Betrieb erfolgte mit dem Computerprogramm „Superkuh 6“ (AGROCOM GmbH & Co. Agrarsystem KG, Bielefeld). Alle betriebsrelevanten Daten der Tiere und die Ergebnisse der Milchleistungsprüfungen wurden in dem Computersystem gespeichert und standen für die Auswertung zur Verfügung.

Mit Hilfe des Computerprogramms wurden wöchentlich Aktionslisten für die tierärztlichen Tätigkeiten erstellt.

3.3 Studientiere

Tiere, die zwischen dem 30.05.2001 und dem 10.03.2003 auf dem landwirtschaftlichen Betrieb abgekalbt hatten, wurden in die Studie aufgenommen. Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung befanden sie sich in Gruppe 5. Zwei Tiere waren in Gruppe 6 aufgestellt.

3.4 Untersuchung und Behandlung

Nach Abschluss des klinischen Puerperiums wurden die Kühe des Betriebes einer routinemäßigen klinischen Untersuchung des Genitaltraktes unterzogen. Kühe, die Anzeichen einer Endometritis aufwiesen, wurden behandelt. Bei klinisch unauffälligen Tieren wurden Zellen aus der Gebärmutter entnommen. Dieses Verfahren wird im folgenden Kapitel (3.5) beschrieben.

3.4.1 Klinische Untersuchung im Puerperium

Zwischen dem 21. und 27. Tag nach der Kalbung (dpp) durchliefen die Tiere des Betriebs eine erste klinische Untersuchung (Puerperalkontrolle 1, PK 1). Diese wurde mittels äußerer Adspektion und manueller Palpation vom Rektum her durchgeführt. Die Größe, die Kontraktilität, die Symmetrieverhältnisse und gegebenenfalls der Inhalt des Uterus wurden beurteilt. Auch die Ovarien wurden palpatorisch untersucht, um den Zyklusstand des Tieres zu ermitteln. Zusätzlich wurden die Körperkondition (BCS) der Tiere, das Allgemeinbefinden und andere auffällige Befunde notiert. Das Allgemeinbefinden wurde mit Noten von 0 (ungestört), 1 (geringgradig gestört), 2 (mittelgradig gestört) oder 3 (hochgradig gestört) beurteilt. Der verwandte Befundbogen ist im Anhang 1 aufgeführt. Bei einer Stichprobe von Tieren (n=107), die bei der rektalen Untersuchung als klinisch gesund beurteilt worden waren (o.b.B. = ohne besonderen Befund), wurde eine vaginoskopische Untersuchung mit einem Röhrenspekulum nach Götze angeschlossen. Hierbei wurde die Form und der Öffnungsgrad des äußeren Muttermundes sowie die Farbe und Feuchtigkeit der Schleimhaut beurteilt. Lag Ausfluss aus der Portio vaginalis cervicis oder eine Flüssigkeitsansammlung in der Vagina vor, wurde deren Qualität notiert. Als Kriterium für die Diagnose Endometritis wurde die Ausflussqualität herangezogen. Klarer Ausfluss bzw. kein Ausfluss wurden als gesund erachtet und alle anderen Qualitäten als krankhaft. Sonstige abnormale Befunde wurden ebenfalls dokumentiert. Der Befundbogen der Vaginoskopie ist im Anhang 2 aufgeführt. Die Klassifizierung der Endometritiden beruhte auf den Ergebnissen der Adspektion und der

rektalen Palpation und ist in Tabelle 4 dargestellt. Für die Dokumentation der Uterusbefunde wurde der Schlüssel nach Grunert (Grunert 1999a) verwendet.

Tabelle 4: Klassifizierung der Endometritiden

Grad der Endometritis	Klinische Symptome
Endometritis 1. Grades (E 1)	Getrübter Ausfluss oder klarer Ausfluss mit Eiterflocken, Größe des Uterus G I bis G III, Uterushörner symmetrisch bis leicht asymmetrisch
Endometritis 2. Grades (E 2)	Schleimig-eitriger Ausfluss, Größe des Uterus G II bis G IV, Uterushörner symmetrisch bis asymmetrisch
Endometritis 3. Grades (E 3)	Eitrig-übelriechender Ausfluss, Größe des Uterus mindestens G III, Uterushörner asymmetrisch

Kühe, die zum Zeitpunkt der PK 1 an einer Endometritis erkrankt waren, wurden behandelt und nach zwei Wochen erneut vorgestellt (Puerperalkontrolle 2, PK 2). Tiere, die zur PK 2 klinische Anzeichen einer Gebärmutterentzündung aufwiesen, wurden behandelt und vierzehn Tage später ein weiteres Mal klinisch untersucht (Puerperalkontrolle 3, PK 3).

3.4.2 Behandlung der Tiere mit Endometritis

Tiere, die bei der PK 1 eine Endometritis aufwiesen, wurden behandelt. Tiere mit ungerader Transpondernummer bekamen subkutan oder intramuskulär eine Dosis Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (0,5 mg Cloprostenol, PGFVeyx forte[®], Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn) verabreicht. Nach vierzehn Tagen erfolgte eine zweite Behandlung. Tiere mit gerader Nummer erhielten intrauterin zwei Injektoren eines Enzympräparates (8 mg Chymotrypsin, 8 mg Trypsin, 4 mg Papain, 100.000 IE Retinolpalmitat und 120 mg α -Tocopherolacetat, Masti Veyxym[®], Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn). In dieser Gruppe erhielten nur Tiere mit Anzeichen einer Endometritis bei der PK 2 eine weitere Behandlung. Bei der PK 3 erfolgte in beiden Gruppen eine erneute Behandlung klinisch auffälliger Tiere. Der Vergleich beider Behandlungsmethoden war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Gynäkologische Erkrankungen, die innerhalb der ersten 20 Tage p.p. auftraten und Erkrankungen, die nicht in direktem Zusammenhang mit dieser Untersuchung standen, wurden von dem Hoftierarzt oder dem Anlageleiter nach Anleitung durch den Tierarzt behandelt.

3.4.3 Weiterführende Untersuchung von Tieren ohne klinische Endometritis

Bei Tieren, die zum Zeitpunkt der PK 1 keine Anzeichen einer Endometritis aufwiesen, wurden mittels Cytobrush-Methode Zellen aus der Gebärmutter gewonnen. In einem Abstand von vierzehn Tagen (35. bis 41. Tag nach der Kalbung) wurden die klinische und die zytologische Untersuchung wiederholt (NU 1).

Auch bei einer Stichprobe von zunächst erkrankten Tieren, die zur PK 2 als geheilt eingestuft worden waren, wurde eine Cytobrush-Untersuchung angeschlossen. Eine Wiederholung der Untersuchungen erfolgte auch bei diesen Tieren im Abstand von vierzehn Tagen (NU 2).

Abbildung 1 zeigt den Versuchsverlauf.

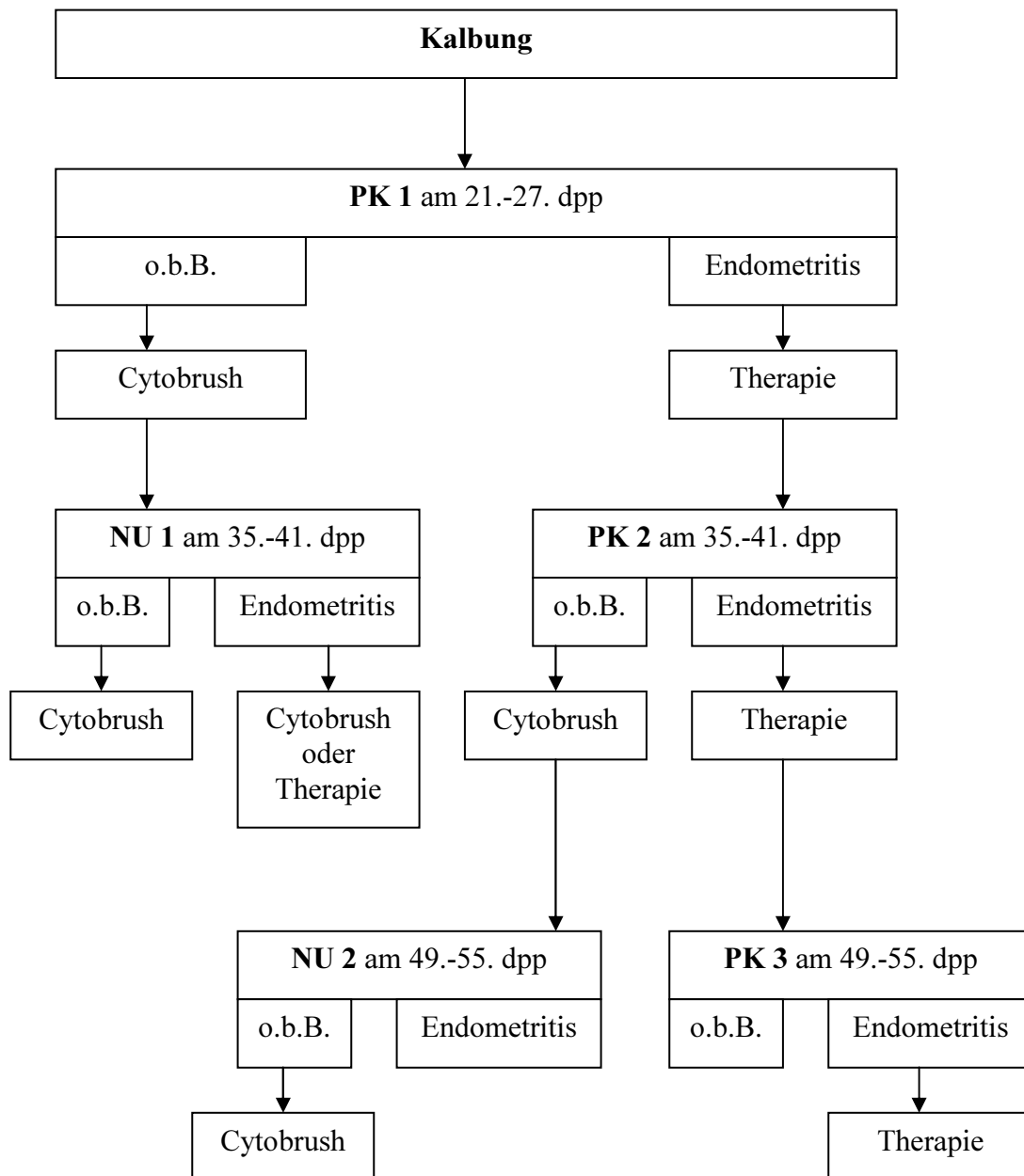


Abbildung 1: Darstellung des Versuchsverlaufs

Tiere, die nach der PK 1 als zuchtuntauglich beurteilt worden waren, erhielten keine weitere Untersuchung.

3.5 Zytologische Untersuchung mittels Cytobrush-Methode

Die Zellgewinnung mit der Cytobrush-Methode wurde in der Einarbeitungsphase an Tieren der Tierklinik für Fortpflanzung der Freien Universität Berlin und an Tieren im Studienbetrieb geübt.

3.5.1 Technik der Probenentnahme und Anfertigen der Zellpräparate

Zur Zellgewinnung mit der Cytobrush-Methode wurde ein starrer, 49,5 cm langer, 4 mm starker Metallstab verwendet. An einem Pol befand sich ein 20 mm langes Gewinde, auf dem eine Flügelschraube und als Abschluss eine Mutterschraube befestigt wurde. Die Spitze des anderen Pols war 5 mm lang und 2 mm stark. Auf ein 4 mm langes Gewinde an dieser Spitze des Metallstabs, wurde ein Bürstchen (Cytobrush GT[®], Fa. Medscand, Malmö, Schweden) aufgeschraubt. Das Cytobrush hatte eine Länge von 20 mm und einen mittleren Durchmesser von 6 mm. In seine Halterung wurde zuvor ein Innengewinde geschnitten.

Vor der Zellentnahme aus dem Uterus wurden die Cytobrush zwischen alkoholgetränkten Zellstofflagen in eine Nierenschale gelegt. Diese Maßnahme entfiel vor der mikrobiologischen Untersuchung. Zum Schutz des Cytobrush bei der Passage durch die Zervix und zur Wahrung der Hygiene wurden Cytobrush und Metallstab in einen Einwegkatheter (Bruchpipette der Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Hoyerhagen) geschoben.

Die Tiere wurden in einer Liegebox mit einem Strick fixiert. Unter rektaler Kontrolle wurde das Instrument durch die Zervix in den Uterus der jeweiligen Kuh eingeführt. Hierbei wurde eine subjektive Beurteilung des Schwierigkeitsgrades vorgenommen. Der Metallstab wurde aus dem Katheter nach kranial geschoben. Das nun freiliegende Cytobrush wurde durch Drehen um mindestens 360° am Endometrium entlang gerollt und anschließend in die Schutzhülle zurückgezogen. An den Borsten des Cytobrush hafteten Zellen der Endometriumsoberfläche. Die Farbe bzw. die Beschaffenheit des gewonnenen Uterusinhaltes wurde notiert. Das Cytobrush wurde von links nach rechts auf einem entfetteten Glasobjektträger abgerollt. Bei Proben, die anschließend zur mikrobiologischen Untersuchung versandt wurden, wurden sterilisierte Objektträger verwendet. Danach wurde das zytologische Präparat fixiert (Fixierlösung Hemacolor[®], Fa. Merck, Darmstadt). Im Labor der Tierklinik für Fortpflanzung an der Freien Universität Berlin wurden die Präparate gefärbt (Hemacolor[®], Fa. Merck, Darmstadt).

3.5.2 Mikroskopische Beurteilung der Proben

Die Proben wurden bei 400facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop (Axiolab[®], Fa. Carl Zeiss, Göttingen) von zwei unabhängigen Untersuchern (Untersucher 1, Untersucher 2) begutachtet. Für die weiteren Auswertungen wurden die Ergebnisse von Untersucher 1

verwendet. Nach allgemeinen labordiagnostischen Methoden wurde die Durchsicht in der linken oberen Ecke des Objektträgers begonnen und mäanderförmig fortgesetzt. Es wurden 300 Zellen gezählt und differenziert. Eine Probe wurde als unbefriedigend bezeichnet, wenn praktisch keine Zellen vorhanden waren (Slusher et al. 1984). Die Unterteilung der Zellen erfolgte in polymorphkernige Granulozyten (PMN), Lymphozyten, Endometriumszellen, Zellen, die nicht eindeutig differenzierbar waren und zu Grunde gegangene Zellen. Eine Beschreibung dieser Zellen erfolgt in Tabelle 5. Das Vorhandensein von Erythrozyten auf dem Objektträger wurde semiquantitativ bestimmt. Das Auftreten von dichten Zellhaufen und weitere Auffälligkeiten wurden notiert. Die Anzahl der gesamten Gesichtsfelder (high power fields, HPF), der Gesichtsfelder mit Zellen, der leeren und der nicht auswertbaren Gesichtsfelder wurden bestimmt. Der Anteil der jeweiligen Zellart an der Gesamtzellzahl wurde errechnet. Mit einer Mikroskopkamera (MC 80 DX, Fa. Carl Zeiss, Jena) wurden mikrofotografische Aufnahmen angefertigt.

Tabelle 5: Beschreibung der differenzierten Zelltypen

Zellart	Beschreibung
Neutrophile Granulozyten	Runde oder ovale Zellen, dunkelviolettfärbte Kerne zumeist in 2-3 Segmente geteilt
Lymphozyten	Runde oder ovale Zellen, dunkelviolettfärbte Kerne mit teilweise seitlicher Einkerbung, Zytoplasma als schmaler hellvioletter Saum um den Kern oder nicht zu sehen
Endometriumszellen	Oberflächen- oder Drüsenepithelzellen (mit Vakuolen unterschiedlicher Größe) hochprismatischer Gestalt; Zellkerne oval, seltener länglich oder rundlich, je nach Chromatinverteilung einzelne Chromatingranula im relativ hellvioletten Kernplasma zu sehen oder dunkelvioletter Kern ohne sichtbare Chromatingranula; liegen basal in der Zelle oder als sogenannte „stripped nuclei“ ohne Zytoplasma vor
Tote Zellen	Zellen oder Zellkerne ohne scharfen Konturen, blassrosa bis violetter Farbe, teilweise als zugrunde gegangene neutrophile Granulozyten oder Endometriumszellen erkennbar
Nicht differenzierbare Zellen	Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie und Färbung nicht den oben beschriebenen Zellarten entsprechen

3.5.3 Auswertung der Zellpräparate

Durch verschiedene Zählweisen wurde die Zellverteilung auf den Objektträgern überprüft. Bei 21 angefertigten Präparate wurden in der Einarbeitungsphase 300 Zellen auf fünf verschiedene Zählweisen⁴ ausgezählt. Abbildung 2a-d zeigt die Zählweisen 1-4.

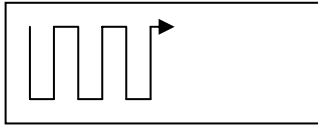


Abbildung 2a: Zählweise 1

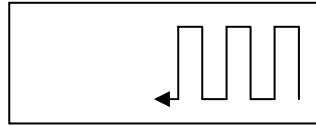


Abbildung 2b: Zählweise 2

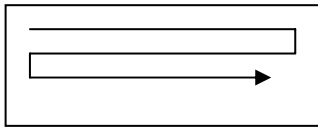


Abbildung 2c: Zählweise 3

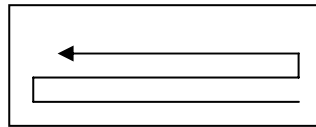


Abbildung 2d: Zählweise 4

3.5.4 Anfertigung eines zweiten Objektträgerpräparates

Zu Beginn der Untersuchung wurden von einigen Proben von einem Cytobrush zwei Objektträgerpräparate angefertigt. Ein Vergleich zwischen dem ersten und zweiten Objektträger wurde durchgeführt um zu testen, ob mit einem zweiten Ausstrich gleiche Ergebnisse zu erzielen waren wie mit dem ersten Ausstrich.

3.5.5 Reproduzierbarkeit der Probenentnahme

Um die Reproduzierbarkeit der angewandten Methode festzustellen, wurde bei einer Stichprobe (n=21) von Tieren im Abstand von mindestens 20 Minuten zum ersten Zellabstrich ein zweiter genommen. Diese Probenentnahme fand zum Zeitpunkt der PK 1 statt. Da vermutet wurde, dass dieser Abstand zu lange gewählt worden sein könnte, wurde

⁴ 1= von links oben senkrecht nach rechts, mäanderförmig
 2= von rechts unten senkrecht nach links, mäanderförmig
 3= von links oben waagrecht nach rechts, mäanderförmig
 4= von rechts unten waagrecht nach links, mäanderförmig
 5= willkürlich, dort wo Endometriumszellen zu sehen sind

eine zweimalige Zellgewinnung mit einem Zeitabstand von bis zu zwei Minuten durchgeführt. Diese Tiere (n=27) befanden sich an unterschiedlichen Tagen post partum.

3.5.6 Reproduzierbarkeit der Zellzählung

Um die Wiederholbarkeit der Zellzählung zu überprüfen wurden 20 Objektträger ein zweites Mal von Untersucher 1 gezählt. Der Zeitabstand zwischen den beiden Zählungen betrug mindestens ein Jahr.

3.5.7 Zeitfaktor

Die Zeitdauer für die Zellentnahme aus dem Uterus wurde bei einer Stichprobe gemessen. Die Messung begann beim Einschieben des Gerätes in das Vestibulum vaginae und endete bei dessen Herausziehen. Auch die Dauer der Beurteilung der Objektträger wurde anhand einer Stichprobe ermittelt.

3.5.8 Cytobrush-Untersuchung bei Kühen mit klinischer Endometritis

Fünfzig Kühe, die bei der PK 1 eine klinische Endometritis aufwiesen, wurden mit der Cytobrush-Methode untersucht und anschließend einer Therapie unterzogen. Hiermit sollte der Gehalt an PMN bei klinisch manifesten Endometritiden ermittelt werden.

3.6 Einteilung der Tiere

Anhand des prozentualen Anteils der PMN an der Gesamtzellzahl (PMN-Wert) wurden zwei Gruppen festgelegt:

Gruppe 1: Tiere, deren Anteil der PMN an der Gesamtzellzahl im zytologischen Präparat mindestens 5% betrug.

Gruppe 2: Tiere, deren Anteil der PMN an der Gesamtzellzahl im zytologischen Präparat kleiner als 5% war.

Eine annähernd gleiche Einteilung wurde von Couto und Hughes (1985) getroffen. Sie wurde nach Vorauswertungen als praktikabel und aussagekräftig eingestuft und daher für die folgenden Auswertungen verwandt.

3.7 Laboruntersuchungen

3.7.1 Progesteronmessung in der Milch

Zum Zeitpunkt der ersten Cytobrush-Untersuchung und zur Folgeuntersuchung wurden Nachgemelksproben zur Untersuchung auf ihren Progesterongehalt gewonnen. Mit der Analyse des Progesterongehaltes dieser Milchproben sollten die rektal gewonnenen Ovarbefunde verifiziert und der Zyklusstand der Tiere eingeschätzt werden. Betrag der Progesterongehalt maximal 5 ng/ml Milch, lag kein Gelbkörper vor. Bei einem Gehalt von mehr als 5 ng/ml bis zu 10 ng/ml Milch wurde das Vorhandensein von lutealem Gewebe als fraglich angesehen. Wurde mehr als 10 ng Progesteron pro ml Milch gemessen, wies das Tier einen Gelbkörper auf.

Zwei Eppendorfröhrchen wurden mit jeweils ca. 1,5 ml Milch gefüllt und innerhalb von 7 Stunden bei -18°C tiefgefroren. Während der Sommermonate erfolgte nach der Entnahme eine sofortige Kühlung der Proben. Die Untersuchung der Proben wurden im Labor der Tierklinik für Fortpflanzung an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Zur Bestimmung des Progesterongehaltes in der Milch wurde ein ELISA Progesterontest (HORMONOST[®], Biolab GmbH, Unterschleißheim) angewandt. Es wurden jeweils 20 µl Standard oder Probe in Mikrotiterstreifen im Doppelansatz einpipettiert. Dann wurden 100 µl Marker (Progesteron-Enzym-Konjugat) hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotiterstreifen viermal mit kaltem Leitungswasser gewaschen und das Restwasser ausgeklopft. Es wurden 100 µl Substrat-Puffer hinzugefügt und die Enzymreaktion mit 20 µl Chromogen gestartet. Sobald die Färbung ausreichend war (nach etwa 15 bis 30 Minuten), wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung beendet. Im Mikrotiter-Photometer (Elx800, Bio-Tek Instruments[®], Inc., USA) wurde die Extinktion der Proben bei 405 nm gegen Substratblank oder Wasser gemessen. Eichkurvenstandards und Proben wurden jeweils im Doppelansatz bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms KC Junior[™] (Bio-Tek Instruments[®], Inc., USA).

3.7.2 Bakteriologische Untersuchung

Zum Zeitpunkt der PK 1 und bei der Folgeuntersuchung nach vierzehn Tagen wurde eine Stichprobe an Bürstchen (n=59) auf den Gehalt an Mikroorganismen untersucht. Nach dem Abrollen auf sterilisierte Objektträger wurde das Bürstchen in ein Röhrchen mit einem

Transportmedium (Portagerm[®], bioMérieux sa, Frankreich) für aerobe und anaerobe Bakterien verbracht. Innerhalb von 24 Stunden wurden die Proben zur Anzucht in das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen an der Freien Universität Berlin gesandt. Die Anzucht und Differenzierung von Bakterien und Pilzen erfolgte durch das Personal des Labors.

3.8 Fruchtbarkeitsmanagement

Zum Management des Betriebes gehörte die gezielte Anpaarung mittels künstlicher Besamung. Diese wurde von einem Besamungstechniker der RBB GmbH durchgeführt. Das verwendete Tiefgefriersperma wurde in Absprache mit dem Betriebsleiter ausgewählt. Zwischen dem 39. und 45. Tag post inseminationem wurde mittels rektaler Palpation eine Trächtigkeitsuntersuchung durch den Hoftierarzt vollzogen. Die im Folgenden beschriebenen Kontroll- und Sterilitätsuntersuchungen wurden von Mitarbeitern der Tierklinik für Fortpflanzung der FU Berlin, AG Bestandsbetreuung und Qualitätsmanagement durchgeführt.

3.8.1 Kontrolluntersuchung

Der Betrieb hatte eine Freiwillige Wartezeit von 72 Tagen festgelegt. Zwischen dem 69. und 75. Tag p.p. wurden die Kühe einer Kontrolluntersuchung unterzogen. Diese enthielt eine adspektorische Untersuchung und eine manuelle palpatorische Untersuchung vom Rektum her. Bei dem Vorliegen eines C.I. wurde eine Brunstinduktion mit Prostaglandin F_{2α} durchgeführt. Hinweise auf pathologische Geschehen am Reproduktionstrakt wurden dokumentiert und gegebenenfalls behandelt. Gebärmutterentzündungen wurden je nach Gruppenzugehörigkeit (s. Kap. 3.4.2) mit Prostaglandin F_{2α} oder einem Enzympräparat (Masti Veyxym[®]) behandelt. Bei dem Auftreten von Follikel-Theka-Zysten oder Azyklie wurden 5 ml eines GnRH-Analogen (0,02 mg Buserelin, Receptal[®], Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) verabreicht.

3.8.2 Sterilitätsuntersuchung

Ab dem 102. Tag p.p. wurde bei Kühen, die nicht oder erfolglos besamt worden waren, eine Untersuchung analog der Kontrolluntersuchung durchgeführt. In vierzehntägigen Intervallen wurde diese Untersuchung bis zur (erneuten) Besamung wiederholt. Die Behandlung erfolgte

in gleicher Weise wie bei der Kontrolluntersuchung, außer dass Endometritiden zu diesem Zeitpunkt alle mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ therapiert wurden.

3.9 Dokumentation

Die Befunde der klinischen Untersuchung wurden auf den in den Anlagen 1 und 2 dargestellten Befundbögen vor Ort dokumentiert. Diese Daten, sowie die Ergebnisse der Laboruntersuchungen wurden in Tabellen des Statistikprogramms SPSS[®] (Version 11.0, SPSS Inc. 2001) übertragen. Stammdaten der Tiere (Kalbedatum, Laktationsnummer) sowie Besamungsdaten und Besamungsergebnisse wurden aus dem Herdenverwaltungsprogramm des Betriebes kopiert und in SPSS[®] eingelesen. Für die Auswertung der Studie wurden Tiere, die innerhalb 200 Tage p.p. nicht wieder tragend waren, als Abgänger gewertet. Dies geschah auch wenn sie im Herdenverband verblieben und eventuell zu einem späteren Zeitpunkt tragend wurden. Kühe die tragend geschlachtet wurden, galten als tragend aus der letzten Besamung (Bartlett et al. 1986).

3.10 Statistische Auswertung

Alle zur Auswertung relevanten Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS[®] und dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel[®] (Version 2000, Microsoft) bearbeitet.

Zum Vergleich prozentualer Häufigkeiten zweier Parameter wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Rast- und Gützeiten wurden mittels U-Test nach Mann-Whitney verglichen. Der Vergleich der PMN-Gehalte bei unterschiedlicher Cytobrush Qualität wurde zunächst mit dem Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt. Ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied, wurde eine paarweise Untersuchung mittels Mann-Whitney-U-Test angeschlossen. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha < 0,05$ festgelegt.