

Untersuchungen  
zur Erfassung und Verbesserung der Fruchtbarkeitslage  
in Rinderbetrieben –  
Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung der  
Konzentrationen des Pregnancy Associated Glycoproteins  
im Blut zur Trächtigkeitsdiagnostik und  
Erfassung der embryonalen Mortalität

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Hanna Dunker

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer:

Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

Prof. Dr. Axel Wehrend

Untersuchungen  
zur Erfassung und Verbesserung der Fruchtbarkeitslage  
in Rinderbetrieben –  
Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung der Konzentrationen des  
Pregnancy Associated Glycoproteins im Blut zur Trächtigkeitsdiagnostik  
und Erfassung der embryonalen Mortalität

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Hanna Dunker**  
Tierärztin aus Westerland/Sylt

Gießen (2013)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann  
Prof. Dr. A. Wehrend  
Prof. Dr. K. Doll

Tag der Disputation: 15. Oktober 2013

Gefördert durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Hanna Dunker

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
2.1	Maternale Erkennung der Gravidität	2
2.2	Kenngroßen zur Beurteilung der Herdenfruchtbarkeit	4
2.3	Möglichkeiten der frühen Trächtigkeitsdiagnostik beim Rind	5
2.3.1	Klinische Methoden der Trächtigkeitsuntersuchung	5
2.3.1.1	Transrektale Palpation des Uterus zur Trächtigkeitsdiagnose	5
2.3.1.2	Transrektale Ultraschalluntersuchung zur Trächtigkeitsdiagnose (TRUS)	6
2.3.2	Hormonanalytische Verfahren der Trächtigkeitsdiagnostik	7
2.3.2.1	Bestimmung von Progesteron	7
2.3.2.2	Bestimmung von Östrogenen	9
2.3.3	Andere labordiagnostische Methoden zur Trächtigkeitsdiagnostik	10
2.3.3.1	Early Pregnancy Factor (EPF)	10
2.3.3.2	Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs)	12
2.3.3.2.1	PAGs – Allgemeine Aspekte	12
2.3.3.2.2	Einteilung der PAGs bei Hauswiederkäuern	13
2.3.3.2.2.1	boPAG8-Gruppe	13
2.3.3.2.2.2	boPAG2-Gruppe	14
2.3.3.2.2.3	boPAG1-Gruppe	14
2.3.3.2.2.4	Sonstige PAGs	15
2.3.3.2.3	Bildung von PAGs der boPAG1-Gruppe	16
2.3.3.2.4	Funktion von PAGs der boPAG1-Gruppe	17
2.3.3.2.5	Testsysteme zum spezifischen Nachweis definierter PAGs	18
2.3.3.2.6	Verlauf der PAG-Konzentrationen im Blut beim Rind während der Trächtigkeit und post partum	18
2.3.3.2.7	Endogene Einflüsse auf die PAG-Konzentration im Blut beim Rind	20
2.3.3.2.8	Verlauf der PAG-Konzentrationen im Plasma während der Gravidität und post partum bei Vergleich von drei PAG-Radioimmunoassays (PAG-RIAs)	21
2.3.3.2.9	Vergleich der Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Verwendung von drei PAG-RIAs zur Graviditätsdiagnose beim Rind	24
2.3.3.2.10	Weitere Untersuchungen zur Vorverlegung des Zeitpunktes des Trächtigkeitssnachweises	25
2.3.3.2.11	PAG-RIA Milch	27
2.3.3.2.12	PAG-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PAG-ELISA) Plasma	27
2.3.3.2.13	PAG-ELISA Milch	29
2.3.3.2.14	Nachweis von PAGs und embryonale Mortalität	30
2.3.3.2.14.1	Embryonale Mortalität	30
2.3.3.2.14.2	Nachweis von embryonaler Mortalität mittels PAG-RIA/ELISA	30
2.4	Ziel vorliegender Arbeit	32

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
3.1	Versuchsdesign	33
3.1.1	Tierkollektiv 1 (TK 1)	33
3.1.2	Tierkollektiv 2 (TK 2)	35
3.1.3	Tierkollektiv 3 (TK 3)	35
3.2	Blutproben- und Milchprobenentnahme	35
3.3	RIAs (Radioimmunoassays) zur Bestimmung von PAG im Blutplasma	36
3.3.1	Prinzip, Durchführung und Auswertung von boPAG1-RIA497 (RIA497) und boPAG1-RIA706 (RIA706)	37
3.3.2	Spezifität der verwendeten Antisera (Antiserum-Spezifität)	39
3.3.3	Herstellung des mit $^{125}\text{J}$ markierten boPAG1 (boPAG1-Tracer)	40
3.3.3.1	Prinzipielle Vorgehensweise	40
3.3.3.2	Durchführung der Kopplungsreaktion zwischen $^{125}\text{J}$ und boPAG1 (Jodierung) und der Säulenchromatographie	40
3.3.3.3	Tracerauswahl	42
3.4	Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron im Blutplasma bzw. in der Magermilch	43
3.4.1	Prinzip des Progesteron-RIAs	43
3.4.2	Antiserum-Spezifität	43
3.4.3	Vorbereitung der Milchproben	43
3.4.4	Durchführung des Progesteron-RIAs	44
3.4.5	Auswertung der Progesteron-RIAs	45
3.5	Untersuchungsgang der TRUS (transrektalen Ultraschalluntersuchung) zur Trächtigkeitsdiagnostik	45
3.6	Statistische Auswertung	46
3.6.1	Zweistichproben-t-Test	46
3.6.2	Erfassung der Zuverlässigkeitskennndaten (Sensitivität und Spezifität) der beiden RIAs	46
3.7	Gerätschaften	49
3.7.1	Probengefäße	49
3.7.2	Gerätschaften zur Herstellung des boPAG1-Tracers	49
3.7.3	Sonstige Geräte	50
3.8	Reagenzien und Chemikalien	51
3.8.1	Reagenzien und Chemikalien für die Herstellung des boPAG1-Tracers	51

3.8.2	Reagenzien und Chemikalien für die Durchführung von RIA497 bzw. RIA706	52
3.8.3	Reagenzien und Chemikalien für die Durchführung des Progesteron-RIAs	53
3.8.4	Lagerung der angewendeten Reagenzien und Chemikalien für RIA497 bzw. RIA706	54
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
4.1	Auswertung der Methodik	55
4.1.1	Bei der Herstellung der boPAG1-Tracer erzielte TBo-Werte und im RIA erhaltene Bo-Werte	55
4.1.2	Überprüfung der einzelnen Schritte der Methodik	56
4.1.2.1	Überprüfung der Herstellung der boPAG1-Tracer	56
4.1.2.1.1	Vergleich zweier Elutionsprofile	56
4.1.2.2	Überprüfung der Jodierung	57
4.1.2.2.1	Reagenzien zur Jodierung	57
4.1.2.2.2	Jodierung ohne Einsatz von boPAG1	57
4.1.2.2.3	Jodierung mittels Jodogen-Methode nach Chizzonite	58
4.1.2.3	Überprüfung der Säulenchromatographie	58
4.1.2.3.1	PD-10 Fertigsäule	58
4.1.2.4	Überprüfung von boPAG1 und der Antisera	59
4.1.2.5	Problemsuche bei Durchführung des RIAs	61
4.1.2.5.1	Überprüfung unterschiedlicher Chargen von PAG-freiem Serum	62
4.1.2.5.2	Überprüfung der Bindungseigenschaften der Antisera 497 und 706	63
4.1.3	Ergebnisse der Qualitätskriterien (Interassayvariabilität, Absolute und Relative Bindung) bei der Bestimmung von PAG im Plasma	64
4.1.3.1	Qualitätskriterien RIAs TK 1 und TK 2	65
4.1.3.1.1	RIA497	65
4.1.3.1.2	RIA706	66
4.1.3.2	Qualitätskriterien RIAs TK 3 (40. – 49. RIA)	67
4.1.3.2.1	RIA497	67
4.1.3.2.2	RIA706	68
4.1.3.3	Vergleich der Qualitätskriterien aus den Testreihen TK 1 und TK 2 mit TK 3 bei Anwendung von RIA497 und RIA706	69
4.2	Ergebnisse bei der Bestimmung von PAG im Blut	70
4.2.1	PAG-Werte im Verlauf der Trächtigkeit (TK 3)	70
4.2.2	Erfassung der Elimination von PAG post partum (TK 1)	72
4.2.2.1	Zuordnung der Tiere des TK 1 in die Gruppen A, B und C	75
4.2.3	PAG-Werte von als tragend bzw. nicht tragend diagnostizierten Kühen der Gruppen A, B und C sowie der Färsen (TK 1)	75
4.2.4	Beurteilung der Zuverlässigkeitskenndaten (Sensitivität, Spezifität) bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik	80
4.2.4.1	Gruppenübergreifende Erfassung aller Kühe und Färsen aus TK 1	80



4.2.4.2	Selektive Erfassung der Kühe von Gruppe A und B (TK 1)	81
4.2.4.3	Übergreifende Erfassung der Färsen und Kühe aus TK 1 (Gruppen A, B) und TK 2	82
4.2.5	Vergleich der PAG-Werte von als tragend diagnostizierten Tieren der Tierkollektive TK 1 und TK 2 mit denen von TK 3	83
4.2.6	Eintreten einer Gravidität und Progesteron-Wert zum Zeitpunkt der Besamung (KB)	83
4.2.6.1	Beobachtungen TK 2	84
4.2.6.2	Beobachtungen TK 1	85
4.2.7	Untersuchung auf embryonale Mortalität	87
4.2.7.1	Erfassung spätembryonaler Mortalität durch mehrmalige Beprobung einer Kuh und Bestimmung von PAG und Progesteron im Blut (TK 3)	87
4.2.7.2	Nachweis von embryonaler Mortalität anhand einer zweimaligen Beprobung und Messung von PAG sowie Feststellung der Trächtigkeit/Nichtträchtigkeit mittels TRUS (transrektaler Ultraschalluntersuchung) bzw. transrektaler Palpation (TK 1)	88
4.2.8	Unterschiede zwischen den Gruppen des TK 1 hinsichtlich des KB-Erfolgs	89
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>90</b>
5.1	Diskussion der Methodik	91
5.1.1	Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung von PAG im Blutplasma	91
5.1.2	Progesteron-Bestimmung in Magermilch bzw. Blutplasma	95
5.2	Ergebnisse der Untersuchungen am Tier (TK 1, TK 2, TK 3)	96
5.2.1	Verlauf der PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit	96
5.2.2	Elimination von PAG und Zuordnung der Tiere des TK 1 in Gruppen	97
5.2.3	Ergebnisse nach Anwendung von RIA497 und RIA706 bei TK 1 und TK 2	99
5.2.3.1	Unterschiede zwischen den Gruppen des TK 1	99
5.2.3.2	Sensitivität und Spezifität bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei TK 1	100
5.2.3.3	Sensitivität und Spezifität bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei TK 1 und TK 2	101
5.2.3.4	Zusammenfassende Bewertung von Sensitivität und Spezifität bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik	101
5.2.4	Progesteron-Wert zum Zeitpunkt der KB	103
5.2.5	Spätembryonale Mortalität	104
5.3	Abschließende Bewertung	105
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>110</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: PAG-Konzentrationsverlauf ▲–▲ (boPAG1-RIA497) im Blut beim Rind vom 20. – 240. Tag der Trächtigkeit (1a) bzw. 20 Tage ante partum – 100 Tage post partum (1b) (Zoli et al., 1992b). 19
- Abbildung 2: PAG-Konzentrationsprofil vom 20. – 260. Trächtigkeitstag (2a) bzw. 20 Tage ante partum bis 100 Tage post partum (2b) bei Anwendung von drei unterschiedlichen RIAs: ▲–▲ Zoli et al. 1992b (boPAG1), ◆–◆ Sasser et al. 1986 (PSPB), ●–● Mialon et al. 1993 (PSP60). 22
- Abbildung 3: PAG-Konzentrationsprofil von fünf Holstein-Friesian-Kühen zwischen dem 20. und 240. Trächtigkeitstag bei Anwendung von drei unterschiedlichen RIAs: ▲–▲ Patel et al. 1997 (boPAG1), ◆–◆ Patel et al. 1995 (PSPB), ●–● Patel et al. 1998 (PSP60). 23
- Abbildung 4: Gegenüberstellung des PAG-Konzentrationsprofils dreier PAG-RIAs (siehe Kapitel 2.3.3.2.8) mit dem boPAG1-ELISA; 20. – 240. Trächtigkeitstag: ▲–▲ Zoli et al. 1992b (boPAG1-RIA), ◆–◆ Sasser et al. 1986 (PSPB-RIA), ●–● Mialon et al. 1993 (PSP60-RIA) und ■–■ Green et al. 2005 (boPAG1-ELISA). 28
- Abbildung 5: Beispiel einer Elutionskurve nach Auftrag des Reaktionsgemisches (6. Jodierung). Im 1. Peak (Proteinpeak, Fraktion 7 – 12) befand sich das an boPAG1 gekoppelte  $^{125}\text{J}$  (boPAG1-Tracer), im 2. Peak (Salzpeak, ab Fraktion 20) das freie  $^{125}\text{J}$ . Bei dieser Jodierung wurde Fraktion 9 (□) später im RIA als Tracer eingesetzt. 41
- Abbildung 6: Beispiel einer ROC-Kurve. Der große Punkt gibt den PAG-Wert wieder, der am weitesten von der Winkelhalbierenden (Gerade) entfernt ist und damit das günstigste Wertepaar „Sensitivität/Falsch-Positiv-Rate“ besitzt. Dieser PAG-Wert dient als cut off-Punkt. 48
- Abbildung 7: Vergleich zweier Elutionsprofile bei der Herstellung des boPAG1-Tracers. ■–■ Elutionsprofil der 6. Tracerherstellung, bei dem die 9. Fraktion (□) bei der Tracerauswahl einen TBo von 35,16 % erreichte; ▲–▲ Elutionsprofil der 16. Tracerherstellung, bei dem die 10. Fraktion (Δ) einen TBo-Wert von 7,69 % erreichte. 56
- Abbildung 8: Elutionsprofil nach Durchführung einer Jodierung ohne Einsatz von boPAG1. Es sind ein 1. Peak (Proteinpeak) mit an Protein gekoppeltem  $^{125}\text{J}$  und ein 2. Peak (Salzpeak) mit freiem  $^{125}\text{J}$  darstellbar. 57
- Abbildung 9: Bo-Reihe bei Verwendung des im Labor Beckers hergestellten und ins hiesige Labor überführten boPAG1-Tracers (▲–▲ Antiserum 497; ■–■ Antiserum 706). 63
- Abbildung 10: Verlauf der PAG-Werte von sechs Kühen und einer Färse im Verlauf der Trächtigkeit (30. – 245. Tag der Trächtigkeit): ▲–▲ RIA497 ■–■ RIA706 (Werte dargestellt als  $x_g \cdot \text{SF}^{\pm 1}$ ). 70
- Abbildung 11: Ausschnitt aus Abbildung 10: PAG-Werte im Verlauf der Trächtigkeit (30. – 120. Tag der Trächtigkeit) ▲–▲ RIA497 ■–■ RIA706 (Werte dargestellt als  $x_g \cdot \text{SF}^{\pm 1}$ ); \* kennzeichnen signifikante Unterschiede in der PAG-Konzentration zwischen den beiden RIAs. 70

- Abbildung 12: Postpartaler Abfall der PAG-Konzentration (RIA497) im maternalen Blut bei 258 Kühen. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte (Punktwolke), schnelle und langsame Evasion (schwarze Geraden) und die aus den Messwerten mittels nicht linearer Regressionsanalyse errechnete Exponentialfunktion  $y = 0,74 + 972,9 e^{-0,08745 t}$  (rote Kurve). 73
- Abbildung 13: Postpartaler Abfall der PAG-Konzentration (RIA706) im maternalen Blut bei 258 Kühen. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte (Punktwolke), schnelle und langsame Evasion (schwarze Geraden) und die aus den Messwerten mittels nicht linearer Regressionsanalyse errechnete Exponentialfunktion  $y = 0,35 + 453,9 e^{-0,07215 t}$  (blaue Kurve). 74
- Abbildung 14: PAG-Werte (RIA497) von zum Zeitpunkt der 2. Beprobung mittels transrektaler Ultraschalluntersuchung als tragend (TRUS+) ■ und nicht tragend (TRUS-) ■ eingestuften Kühen der Gruppen A, B, C und Färsen sowie PAG-Werte von im selben postpartalen Zeitraum zum Zeitpunkt der KB beprobten Tieren (nicht tragend) ■; Darstellung im Box-Plot: Whisker- = Minimum, Whisker+ = Maximum. 77
- Abbildung 15: PAG-Werte (RIA706) von zum Zeitpunkt der 2. Beprobung mittels transrektaler Ultraschalluntersuchung als tragend (TRUS+) ■ und nicht tragend (TRUS-) ■ eingestuften Kühen der Gruppen A, B, C und Färsen sowie PAG-Werte von im selben postpartalen Zeitraum zum Zeitpunkt der KB beprobten Tieren (nicht tragend) ■; Darstellung im Box-Plot: Whisker- = Minimum, Whisker+ = Maximum. 78
- Abbildung 16: Nachweis embryonalen Fruchttodes bei einer Kuh.  
 ▲—▲ = PAG in ng/ml (RIA497); ■—■ = PAG in ng/ml (RIA706);  
 ◆—◆ = Progesteron in ng/ml. 87

Abkürzungsverzeichnis

AI	artificial insemination
AUC	Area under the curve
1. Beprobung	Beprobung am Tag der KB
2. Beprobung	Beprobung 29/30/31 Tage nach der KB
3. Beprobung	Beprobung 39 – 53 Tage nach der KB
Bo	Bindungsnullwert
bCG	bovines Choriongonadotropin
BioPRYN	PSPB-ELISA
BNR	Brunstnutzungsrate
boPAG	bovines PAG
boPAG1-Tracer	mit <sup>125</sup> J markiertes boPAG1
BSA	Bovines Serum Albumin
caPAG	caprines PAG
cut off-Punkt	Grenzwert
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPF	Early Pregnancy Factor
FWZ	Freiwillige Wartezeit
KB	Besamung
LPO	Laktoperoxidase
LTR	Landesverband Thüringer Rinderzüchter
LW	Leerwert
MW	Mittelwert
Nr.	Nummer
NRR90	Non-Return-Rate 90
NSB	nichtspezifische Bindung
ovPAG	ovines PAG
PAG	Pregnancy Associated Glycoprotein
PEG	Polyethylenglykol
PSPB	Pregnancy Specific Protein B
PSP60	Pregnancy Specific Protein 60
QC	Qualitätskontrolle
RIA	Radioimmunoassay
RIA497	boPAG1-RIA497
RIA706	boPAG1-RIA706

## VIII

ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	Standardabweichung
SOP	Standard Operation Procedure
TA	Totalaktivität
TBo	Bindungsnulwert des boPAG1-Tracers
TK 1	Tierkollektiv 1
TK 2	Tierkollektiv 2
TK 3	Tierkollektiv 3
TNSB	nichtspezifische Bindung des mit $^{125}\text{J}$ markierten boPAG1
TRUS	transrektale Ultraschalluntersuchung
VK	Variationskoeffizient
ZKZ	Zwischenkalbezeit

## 1 EINLEITUNG

Die Fruchtbarkeit ist ein entscheidender, die Wirtschaftlichkeit eines Milcherzeugerbetriebes beeinflussender Faktor. Maßstab für die Fruchtbarkeit ist unter anderem die Non-Return-Rate 90 (NRR90). In Abhängigkeit von der Betriebsgröße zeigen sich hier deutliche Unterschiede. So werden in eher kleinen bis mittleren Betrieben, wie zum Beispiel (z.B.) in Bayern, NRR90 von zum Teil deutlich über 60 % erzielt (Röhrmöser et al., 2009), während sie in Großbetrieben, wie sie für die neuen Bundesländer typisch sind, bei unter 50 % liegen können (Landesverband Thüringer Rinderzüchter (LTR) 2009, persönliche Mitteilung). Diese Situation weist auf Probleme im Fruchtbarkeitsmanagement hin, in dem einem rechtzeitigen Erkennen des Besamungs(KB)-Erfolges eine entscheidende Bedeutung zukommt. Im Hinblick auf eine Trächtigkeitsfeststellung ist die transrektale Palpation in der tierärztlichen Praxis das am häufigsten verwendete Verfahren. Eine Trächtigkeit kann mit diesem Verfahren ab der 5. beziehungsweise (bzw.) 6. Graviditätswoche sicher diagnostiziert werden (Ahlers und Andresen, 1995; Ahlers, 1999). Als Goldstandard wird hingegen die transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) bezeichnet, da damit nicht nur die Diagnose „tragend“/„nicht tragend“ gestellt werden kann, sondern sich auch zahlreiche physiologische und pathologische Erscheinungen des Uterus und des Ovars darstellen lassen und der Zeitpunkt der Graviditätsdiagnose gegenüber der transrektalen Palpation auf den 25. Tag post conceptionem vorverlegt werden kann (Kähn, 1997). In großen Milchkuhbeständen erfordern jedoch beide Verfahren einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand, der seitens der involvierten Stellen oft kaum zu bewältigen ist. Die Nachfrage nach einem weniger aufwändigen, aber ebenso sicheren Laborverfahren ist dementsprechend groß. Als ein solches Verfahren wird seit 1992 (Zoli et al., 1992b) der Nachweis des „Pregnancy Associated Glycoprotein“ (PAG) im Blutplasma von Färsen und Kühen propagiert. Mit vorliegender Arbeit sollte ein Beitrag zur Verbesserung des Fruchtbarkeitsmanagements in Großbetrieben geleistet werden. Dazu sollten zwei unterschiedliche Antisera zur Erfassung der PAG-Konzentrationen zur Anwendung kommen mit dem Ziel, deren Eignung für eine frühe und sichere Graviditätsdiagnostik zu überprüfen. Die dazu notwendigen Blutprobenentnahmen bei Färsen und Kühen erfolgten im Rahmen eines Feldversuches zu definierten Zeitpunkten. Gleichzeitig sollten Erkenntnisse über die Bedeutung des embryonalen Fruchttodes sowie die Wahl des korrekten KB-Zeitpunktes erhalten werden. Zu dessen Kontrolle kam der Progesteron-Test in Milch bzw. Blut zur Anwendung.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Maternale Erkennung der Gravidität**

Die Entwicklung des Embryos im Uterus und die Aufrechterhaltung der Gravidität hängen weitestgehend davon ab, inwieweit der Embryo in der Lage ist, mit dem maternalen Organismus zu kommunizieren und von diesem registriert zu werden. Dies ist vor allem bei saisonal bzw. asaisonal polyöstrischen Tieren mit spontaner Ovulation entscheidend, da der Embryo im Uterus nur überleben kann, wenn er die Rückbildung des zyklischen Gelbkörpers verhindert (Hoffmann, 1994). Nur die Umwandlung vom Corpus luteum cyclicum in ein Corpus luteum graviditatis sichert die initiale und – in Abhängigkeit von der Spezies – langfristige Bereitstellung von trächtigkeitserhaltendem Progesteron.

Progesteron spielt eine Rolle bei der frühembryonalen Entwicklung, bei Implantation, Plazentation und der erfolgreichen fetalen und plazentaren Entwicklung bis zur Geburt (Spencer und Bazer, 2004), es sorgt für eine weitgehende Ruhigstellung des Myometriums (Taverne et al., 1979) und ist für die Bildung der Histirophe mitverantwortlich (Spencer und Bazer, 2004).

Während des Zyklusgeschehens wird bei den landwirtschaftlichen Nutztieren der Gelbkörper durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterinen Ursprungs zur Regression gebracht (Hoffmann, 1994). Diese Luteolyse gilt es zu verhindern.

Beim Pferd wandert der Embryo zwischen Tag 12 – 14 der Gravidität im Uterus umher und verhindert dadurch – vermutlich entweder über parakrine Signale oder über direkte Stimulation der Epithelzellen – die uterine Prostaglandin-Produktion und damit die Gelbkörperregression (Roberts et al., 1996).

Das Trophoblastgewebe von Schweineembryos produziert am 10. – 12. Tag und vermutlich auch zwischen Tag 15 und 25 – 30 der Gravidität Östrogene, die die Prostaglandin-Ausschüttung im Uterus so verändern, dass  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nicht mehr in die Blutbahn, sondern ins Uteruslumen sezerniert wird. Es gelangt nicht mehr zum Gelbkörper, womit die Luteolyse verhindert wird (Bazer und Thatcher, 1977; Roberts et al., 1996; Spencer und Bazer, 2004).

Bei den Wiederkäuern spielt Interferon- $\tau$ , ein Typ I Interferon, eine große Rolle bei dem Erhalt des Gelbkörpers. Es wird von den mononukleären Trophoblastzellen in hohen Konzentrationen ausgeschüttet und verhindert – vermutlich durch Inhibition der Aufregulierung des Oxytocin-Rezeptors und des Östrogen-Rezeptors  $\alpha$  im Epi-

## Literaturübersicht

thel des Endometriums – die durch Oxytocin induzierte pulsatile endometriale Ausschüttung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und damit die Luteolyse des Gelbkörpers (Bazer et al., 1994; Roberts et al., 1996; Robinson et al., 2008). Diese Umstellung des Corpus luteum cyclicum in ein Corpus luteum graviditatis findet in Abhängigkeit von der Zykluslänge beim Schaf um den 12. – 14. Tag und bei Ziege und Rind um den 14. – 17. Tag der Gravidität statt (Bazer et al., 1994).

Allerdings ist von der Beteiligung weiterer Faktoren an diesen Prozessen auszugehen, da beim Rind gezeigt werden konnte, dass durch alleinige Applikation von Interferon- $\tau$  im oben genannten Zeitraum die Gelbkörperphase bei den meisten Tieren zwar verlängert werden konnte, aber nur gelegentlich in einer ausgedehnten Pseudogravidität endete (Roberts et al., 1996).



## 2.2 Kenngößen zur Beurteilung der Herdenfruchtbarkeit

Die Fruchtbarkeit ist von entscheidender ökonomischer Bedeutung für einen Milchzeugerbetrieb. Ziel ist es, eine Kuh möglichst früh nach der Kalbung erfolgreich zu besamen, da es sonst durch niedrigere Milchleistungen pro Kuh und Jahr, durch einen geringeren Kälberanteil, langsameren Zuchtfortschritt und steigenden Remontierungsraten zu höheren jährlichen Kosten kommt (Britt, 1975; Pabst, 2005).

Die Zwischenkalbezeit (ZKZ), das Intervall zwischen zwei Kalbungen, wird hierfür als eine wichtige Kenngröße herangezogen. Für lange Zeit galt, dass sie einen Zeitraum von 12 Monaten nicht überschreiten sollte (Britt, 1975; Dijkhuizen et al., 1985). Weil dies jedoch unrealistisch ist, liegt die tatsächliche Zielgröße bei 385 Tagen (Pabst, 2005; Hoedemaker et al., 2007). Bei sehr hohen Milchleistungen kann es zudem sinnvoll sein, die ZKZ auf bis zu 400 Tage auszuweiten (Pabst, 2005), da es bei leistungsstarken Tieren ansonsten zu einem zu frühen Abflachen der Laktationskurve kommt.

Die ZKZ kann durch die Freiwillige Wartezeit (FWZ), die Brunstnutzungsrate (BNR) und die Konzeptionsrate beeinflusst werden. Die FWZ ist der vom Betrieb festgelegte Zeitraum post partum, in dem die Kühe grundsätzlich nicht besamt werden. Die BNR stellt den Anteil der in einem bestimmten Zeitabschnitt besamten Kühe dar. Die Konzeptionsrate ist die Anzahl tragend gewordener Tiere geteilt durch die Anzahl der KBs in einem bestimmten Zeitabschnitt, also das Produkt aus BNR und KB-Erfolg (Hoedemaker et al., 2007).

Über die nötige Länge der FWZ gibt es kontroverse Meinungen. Während Britt (1975) noch davon ausgeht, dass die 1. KB um den 40. Tag post partum gelegt werden kann, was in etwa der physiologisch bedingten Mindestrastzeit (biologische Rastzeit) von circa (ca.) 50 – 60 Tagen entspricht (Pabst, 2005), gehen andere Autoren von längeren Zeiträumen aus, abhängig von der Laktationsleistung und dem Alter der Tiere (Hoedemaker et al., 2007). Britt (1975) und Yusuf et al. (2010) weisen zudem darauf hin, dass bei sehr kurz gewählten Rastzeiten auch die Anzahl der KBs bis zur Konzeption steigen kann und damit auch die Kosten.

Die BNR lässt sich durch eine gute Brunstbeobachtung, eine zeitgerechte KB, qualitativ gutes Sperma, einen erfahrenen Besamungstechniker sowie gute Fütterungs- und Haltungsbedingungen erhöhen (Hoedemaker et al., 2007).

## **2.3 Möglichkeiten der frühen Trächtigkeitsdiagnostik beim Rind**

Einer möglichst frühen und zuverlässigen Trächtigkeitsdiagnostik kommt bei der Kontrolle der Herdenfruchtbarkeit eine entscheidende Bedeutung zu.

Die Zuverlässigkeit eines Verfahrens wird über die Sensitivität und Spezifität ausgedrückt. Dabei spiegelt die Sensitivität den Anteil der als „korrekt tragend“ erkannten Tiere und die Spezifität den Anteil der als „korrekt nicht tragend“ erkannten Tiere wider. Zur Überprüfung der „Korrektheit“ wird das jeweilige Verfahren mit einem als Referenz dienenden, bekannt sicheren Diagnostikverfahren verglichen (siehe auch Kapitel 3.6.2). Generell wird angestrebt, ein Verfahren anzuwenden, das bei hoher Sensitivität bzw. Spezifität eine frühe Trächtigkeitsdiagnose ermöglicht und welches mit möglichst geringem zeitlichen und finanziellen Aufwand durchführbar ist. Dabei ist die korrekte Diagnose der nicht tragenden Tiere entscheidender, da bei früh durch den Tierarzt als nicht tragend identifizierten Rindern rechtzeitig biotechnologisch bzw. therapeutisch eingegriffen und damit die ZKZ im vorgegebenen Rahmen gehalten werden kann (Hoedemaker et al., 2007).

Bei allen diagnostischen Verfahren ist jedoch zu beachten, dass in der Frühträchtigkeit eine höhere Rate an embryonaler Mortalität festzustellen ist, weshalb bei früh als tragend eingestuften Tieren die Diagnose gegebenenfalls (ggf.) keinen Bestand hat. Eine erneute Trächtigkeitsuntersuchung zu einem späteren Zeitpunkt erscheint in solchen Situationen sinnvoll (Fricke, 2002).

### **2.3.1 Klinische Methoden der Trächtigkeitsuntersuchung**

#### **2.3.1.1 Transrektale Palpation des Uterus zur Trächtigkeitsdiagnose**

Die transrektale Palpation ist in der tierärztlichen Praxis das am häufigsten verwendete Verfahren zum Nachweis der Gravidität beim Rind. Eine Trächtigkeit mittels dieses Verfahrens kann – entsprechende Erfahrungen vorausgesetzt – ab der 5. (Färse, jüngere Kühe) bzw. 6. Graviditätswoche (ältere Kühe) sicher diagnostiziert werden (Ahlers und Andresen, 1995; Ahlers, 1999). Nach Alexander et al. (1995) ergibt sich für diesen Zeitraum bei Färsen eine Sensitivität von 96,1 %, nach Breed et al. (2009) bei Kühen eine Sensitivität von 94,8 % und eine Spezifität von 97,2 % (Referenz: Nachweis von Pregnancy Specific Protein B (PSPB) im Blut).

Zu der Frage, ob eine transrektale Palpation einen frühembryonalen Fruchttod zur Folge haben kann, gibt es unterschiedliche Meinungen. Während einige Autoren davon ausgehen, dass der Eihautgriff vor dem 45. Tag nach der KB die Gefahr embryo-

naler Mortalität möglicherweise erhöht (Paisley et al., 1978; Vaillancourt et al., 1979; Franco et al., 1987; White et al., 1989), gehen Thurmond und Picanso (1993) und Thompson et al. (1994) davon aus, dass der Zeitpunkt der transrektalen Palpation nur geringe Effekte auf den Fortbestand der Trächtigkeit hat.

All diesen Studien ist gemeinsam, dass keine direkten Hinweise auf die Lebensfähigkeit des Embryos erhalten wurden und eine Kontrollgruppe fehlte (Paisley et al., 1978; Vaillancourt et al., 1979; Franco et al., 1987), so dass zwischen spontanem Embryonalverlust und Effekten auf den Embryo durch transrektale Palpation nicht eindeutig unterschieden werden kann. Weiterführende Untersuchungen mittels TRUS bzw. Messung von PSPB im Blut unter Einbeziehung einer Kontrollgruppe konnten keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit des Embryos/Fetus feststellen (Alexander et al., 1995; Romano et al., 2007).

### **2.3.1.2 Transrektale Ultraschalluntersuchung zur Trächtigkeitsdiagnose (TRUS)**

Der Vorteil der TRUS gegenüber der transrektalen Palpation besteht darin, dass sich durch die Sonographie zusätzlich zur Trächtigkeitsdiagnose auch zahlreiche physiologische und pathologische Erscheinungen des „nicht graviden“/„graviden“ Uterus und des Ovars darstellen lassen. Zudem kann der Zeitpunkt der Graviditätsdiagnose gegenüber der transrektalen Palpation bei Färsen auf den 25. Tag und bei Kühen auf den 29. Tag post inseminationem vorverlegt werden (Kähn, 1997; Müller et al., 1999). Zu diesem Zeitpunkt ist der Embryo mit seiner Herzpulsation darstellbar (Kähn, 1997). Am 25. – 30. Tag post inseminationem dehnt sich die Amnionhöhle im gesamten graviden Uterushorn aus. Es sind Pseudoampullen, Einschnürungen der Amnionhöhle, die durch ins Lumen hineinragende Falten der Uteruswand entstehen, feststellbar, der Embryo ist 5 – 12 mm lang und zeigt ggf. Herzaktion (Pierson und Ginther, 1984b). Am 35. Tag ist der Embryo 15 mm, am 40. Tag 20 mm lang.

In der Regel wird für die Untersuchung ein linearer Schallkopf mit einer Frequenz von 5 MHz verwendet (Pierson und Ginther, 1984a; b; Kähn, 1997; Heuwieser und Müller, 2000).

Nach Müller et al. (1999) ergeben sich bei Färsen zwischen dem 28. und 31. Tag nach der KB für Sensitivität bzw. Spezifität Werte von 99,4 % bzw. 96,9 %, bei Kühen von 95,5 % bzw. 92,0 % (Referenz: transrektale Palpation).

Gründe für den noch nicht routinemäßigen Einsatz dieses Verfahrens in der Rinder-

praxis liegen in dem höheren zeitlichen Aufwand pro Tier und den hohen Geräte- und Betreuungskosten (Pabst, 2005).

### **2.3.2 Hormonanalytische Verfahren der Trächtigkeitsdiagnostik**

Bei labordiagnostischen Verfahren zur Trächtigkeitsdiagnose beim Rind werden Hormone im Blut, in der Milch bzw. im Kot nachgewiesen, die auf eine eingetretene Trächtigkeit schließen lassen. Der Landwirt kann diese Proben – ggf. nach Unterweisung durch den Tierarzt – selbst entnehmen, an ein diagnostisches Labor versenden und erhält in der Regel nach einigen Tagen das Ergebnis (Zöllner, 2006a).

#### **2.3.2.1 Bestimmung von Progesteron**

Für das Rind liegen umfangreiche Untersuchungen vor, welche zeigen, dass von den Progesteron-Konzentrationen im Blut (Karg et al., 1969; Pope et al., 1969; Stabenfeldt et al., 1969) bzw. in der Milch (Hoffmann und Hamburger, 1973; Hoffmann et al., 1974) auf das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein eines endokrin aktiven Gelbkörpers geschlossen werden kann.

Daraus resultierend hat die Progesteron-Bestimmung als diagnostisches Verfahren zur Fertilitätskontrolle eine weite Verbreitung erfahren. So können zum Beispiel mit Hilfe von Verlaufsproben Zyklusverlängerungen und Zyklusstörungen wie Stille Brunst, Azyklie, persistierende Gelbkörper und ggf. auch embryonaler Fruchttod erkannt werden (Karg et al., 1969; Pope et al., 1969; Stabenfeldt et al., 1969; Hoffmann, 1971; Sprague et al., 1971; Hoffmann und Hamburger, 1973).

Ein besonderes Interesse gilt jedoch dem Trächtigkeitsnachweis mittels Progesteron-Bestimmung. Auf eine solche Möglichkeit wiesen Shemesh et al. (1968) erstmals hin. Allerdings zeigte sich, dass ein sicherer Trächtigkeitsnachweis durch eine einmalige Progesteron-Bestimmung am 21. Tag nach der KB, das heißt nach Umstellung des Corpus luteum cyclicum in ein Corpus luteum graviditatis, nicht möglich ist. Der Test weist zwar eine hohe Sensitivität (98,1 – 100 %), aber eine nur niedrige Spezifität (54,5 – 76,2 %) auf (Referenz: transrektale Palpation) (Günzler et al., 1975; Heap et al., 1976). Somit werden nahezu 50 % der nicht tragenden Tiere aufgrund hoher Progesteron-Werte falsch positiv diagnostiziert (Hoffmann et al., 1974; Günzler et al., 1975; Heap et al., 1976; Pennington et al., 1976; Shemesh, 1978). Dies kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass bereits der KB-Zeitpunkt falsch gewählt worden ist und demnach der Tag der Probenentnahme nicht dem 21. Tag nach der Brunst entspricht (Hoffmann et al., 1974; Günzler et al., 1975; Shemesh, 1978); wei-

## Literaturübersicht

terhin ergeben sich Fehldiagnosen aufgrund von verlängerten Zyklen (Hoffmann et al., 1974; Günzler et al., 1975).

Wie bei allen frühen Trächtigkeitsnachweisen ist jedoch auch embryonaler Fruchttod nach dem 21. Tag post inseminationem für eine erniedrigte Spezifität des Tests verantwortlich. So ist das Ergebnis des Tests zum Zeitpunkt der Probenentnahme zwar richtig, das Tier stellt sich bei einer späteren, als Referenz dienenden Diagnostik jedoch als nicht tragend heraus und wird damit zu den falsch positiv diagnostizierten Tieren gerechnet (Heap et al., 1976).

Nach Günzler et al. (1975) sind die Hälfte der Fehldiagnosen auf eine falsche Brunst-datierung zurückzuführen. Ein Zwei-Proben-Test, also die Beprobung am Tag der Brunst und am 20. Tag nach der KB, kann diese Fehldiagnosen vermindern und damit die Zuverlässigkeit des Tests erhöhen (Günzler et al., 1975). Ein Drei-Proben-Test, das heißt die Beprobung am Tag der Brunst, am 7. und 20. Tag nach der KB, kann wiederum zusätzlich Aufschluss darüber geben, ob nach der KB eine erfolgreiche Ovulation stattgefunden hat (Karg, 1994).

Anders als Günzler et al. (1975) gehen Pennington et al. (1976) und Shemesh (1978) davon aus, dass die embryonale Mortalität der Hauptgrund für die relativ niedrige Spezifität des Tests darstellt.

Nach Günzler et al. (1975) und Shemesh (1978) liegt der Vorteil der Progesteron-Bestimmung vor allem darin, dass man bereits am 20. bzw. 21. Tag nach der KB die nicht gravid gewordenen Tiere identifiziert und entsprechende Maßnahmen durchführen kann.

Wie oben dargelegt, kann Progesteron sowohl im Blut als auch in der Milch gemessen werden. Der Vorteil der Progesteron-Bestimmung im Blut ist darin zu sehen, dass Progesteron dort homogen verteilt ist (Hoffmann und Hamburger, 1973). In der Milch hingegen befindet sich aufgrund der hohen Lipophilie von Progesteron der Hauptanteil des Hormons in der Fettphase (Hoffmann und Hamburger, 1973). Da der Fettanteil der Milch beim Melkvorgang vom Vorgemelk zum Nachgemelk ansteigt, ergeben sich für das Anfangs-, Mitte-, End- oder Gesamtgemelk jeweils unterschiedliche Referenzwerte (Hoffmann und Hamburger, 1973).

Nachdem zunächst die Bestimmung von Progesteron im Gesamtgemelk und Endgemelk (Hoffmann und Hamburger, 1973; Hoffmann et al., 1974; Pennington et al., 1975; 1976; Booth et al., 1979) bzw. im Milchfett (Hoffmann et al., 1976; Arnstadt und Cleere, 1981; Claus et al., 1982) propagiert wurde, hat sich heute die Bestimmung im

Vorgemelk (Shemesh, 1978; Romagnolo und Nebel, 1993) bzw. in der Magermilch (Pope, 1982; Prakash et al., 1988) durchgesetzt.

Als laborgebundene Messverfahren stehen Radioimmunoassays (RIAs) (Hoffmann et al., 1973; Hoffmann et al., 1974), Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) (Arnstadt und Cleere, 1981) und vollautomatische Analysegeräte zur Verfügung. Diese Methoden weisen eine hohe analytische Sicherheit auf, das Ergebnis liegt dem Landwirt jedoch erst Tage nach Beprobung vor, und eine durch das Labor festgestellte erneute Brunst kann für eine Nachbesamung des Tieres somit in der Regel nicht genutzt werden. Dem praktischen Tierarzt bzw. Landwirt stehen aber auch sogenannte Kits (Schnelltests) zur Verfügung, die in den Betrieben zeitnah angewendet werden können. Diese schneiden bei Vergleich mit den laborgebundenen Verfahren jedoch zum Teil deutlich schlechter ab (Sobiraj et al., 1995). Zudem sind sie in kleineren Beständen aufgrund des relativ kurzen Verfallsdatums unrentabel.

Der größte Nachteil der Progesteron-Messung zum Trächtignachweis ist jedoch darin zu sehen, dass der Progesteron-Wert nur Rückschlüsse auf den Funktionszustand des Ovars zulässt und damit nur indirekt mit einer Trächtigkeit in Verbindung steht. Ein weiteres Problem ist der feste zeitliche Rahmen, in dem der Test durchgeführt werden muss (Zöllner, 2006b).

### **2.3.2.2 Bestimmung von Östrogenen**

Östrogene werden abhängig von der Tierart im Ovar und in der Plazenta, aber auch im Hoden, Hypothalamus, Fettgewebe und in der Nebennierenrinde gebildet (Döcke, 1994). Zu den wichtigsten körpereigenen Östrogenen gehören  $17\beta$ -Estradiol und Estron. Die während der Trächtigkeit gebildeten Östrogene stammen beim Rind aus dem fetalen Trophoblastgewebe der Plazenta (Hoffmann et al., 1979).

Messbares Produkt plazentarer Östrogen-Synthese in der maternalen Zirkulation ist vor allem sulfo-konjugiertes Estron (Robertson und King, 1974). Es unterliegt im maternalen Organismus einer Verteilung und Verstoffwechslung. Der überwiegende Teil wird über den Faeces ausgeschieden, ein geringerer Anteil über den Urin (Hoffmann und Karg, 1976; Velle, 1976) und über die Milch (Heap und Hamon, 1979). Unterschiedliche Angaben finden sich zum Zeitpunkt, ab dem eine Östrogen-Bestimmung den Rückschluss auf eine eingetretene Gravidität erlaubt. Bei Messungen im Blut halten dies Robertson und King (1979) ab der 10. Graviditätswoche für möglich, Hoffmann et al. (1997) jedoch erst ab der 16. Woche der Gravidität. Östrogen-Bestimmungen in der Molkefraktion der Milch sollen eine entsprechende Aussa-

ge ab der 14./15. Trächtigtkeitswoche gestatten (Hamon et al., 1981; Heap und Holdsworth, 1981), für den Harn soll dies ab der 17. Woche (Hoffmann et al., 1997) und für den Kot ab der 14. bzw. 18. Woche der Gravidität möglich sein (Möstl et al., 1984; Bamberg et al., 1985; 1986; Hoffmann et al., 1997).

Der Östrogen-Nachweis ist somit zur frühen Trächtigtkeitsdiagnose beim Rind nicht geeignet. Er bringt zudem die Nachteile aller laborgebundenen Tests mit sich. Lediglich bei im Zoo gehaltenen Wildwiederkäuern hat sich die Östrogen-Bestimmung im Kot als Trächtigtkeitsdiagnose etabliert (Möstl et al., 1984).

### **2.3.3 Andere labordiagnostische Methoden zur Trächtigtkeitsdiagnostik**

#### **2.3.3.1 Early Pregnancy Factor (EPF)**

Über das Phänomen des Early Pregnancy Factor (EPF) wurde erstmals 1976 bei Mäusen berichtet (Morton et al., 1976). Dadurch, dass EPF lange Zeit nicht aufgereinigt und identifiziert werden konnte, wurde dieser zunächst nicht als eine Substanz, sondern als ein Faktor definiert, der sich durch eine immunsupprimierende Wirkung sowie durch ein bereits sehr frühes Auftauchen im Serum – innerhalb von Stunden nach der Befruchtung – auszeichnet (Morton et al., 1974; Noonan et al., 1979; Klima et al., 1992).

Heute geht man davon aus, dass es sich bei diesem Faktor um mehrere trächtigtkeitsassoziierte Glykoproteine handelt (Clarke et al., 1980; Wilson et al., 1983; Mehta et al., 1989; Ito und Yasuda, 1992; Klima et al., 1992), die sowohl im Ovar, Ovidukt, in der befruchteten Eizelle und in Plazentaextrakten (Cavanagh, 1984; Clarke et al., 1987; Ikemizu et al., 1994) sowie im Serum tragender Tiere sechs bzw. 24 Stunden nach der Befruchtung (Morton et al., 1976; 1979) und bis zum Teil über das 2. Trächtigtkeitstrimester hinausgehend (Morton et al., 1977; 1979) nachweisbar sind und deren Molekülgröße in Abhängigkeit von Spezies und Trächtigtkeitsstadium zu variieren scheint (Clarke et al., 1980; Wilson et al., 1983).

EPF wurde bisher in folgenden Spezies nachgewiesen:

Maus (Morton et al., 1976), Mensch (Morton et al., 1977), Kaninchen (Sueoka et al., 1988), Schaf (Morton et al., 1979), Schwein (Morton et al., 1983), Stute (Ohnuma et al., 1996) und Rind (Nancarrow et al., 1981).

Beim Rind ist EPF bereits 24 bzw. 72 Stunden nach der Befruchtung im Serum nachweisbar (Yamazaki et al., 1995; Yoshioka et al., 1995) und kann mittels Rosetteninhibitionstest zur Trächtigtkeitsdiagnose genutzt werden. Bei dem Rosetteninhibitions-

## Literaturübersicht

test handelt es sich um einen Test, der ursprünglich zur Beurteilung der immunsupprimierenden Wirkung von Antilymphozytenserum entwickelt worden war. Zugrunde liegt diesem Verfahren die Fähigkeit von T-Lymphozyten, zusammen mit bestimmten heterologen Erythrozyten sogenannte Rosetten zu bilden. Der Test misst den Titer des Antilymphozytenserums, bei dem 25 % der Rosettenbildung zwischen T-Zellen und Erythrozyten verhindert werden kann (Bach und Antoine, 1968).

Es zeigte sich, dass bei Mitinkubation von Serum tragender Tiere wesentlich geringere Konzentrationen von Antilymphozytenserum benötigt werden, um denselben Grad der Rosettenhemmung zu erreichen. Dies erklärte man sich mit dem Vorhandensein von EPF.

Nach einem modifizierten Verfahren von Morton et al. (1979) wird mit diesem Test nun indirekt auf das Vorkommen von EPF im Blut geschlossen. Am 13. – 16. Tag der Trächtigkeit weist ein Titer  $< 4$  auf eine Nichtträchtigkeit (Sakonju et al., 1993), ein Titer von  $> 4$  auf eine Trächtigkeit des Rindes hin (Yamazaki et al., 1995).

Obwohl mit dem Test sehr früh eine Trächtigkeit bzw. Nichtträchtigkeit beim Rind festgestellt werden kann, wird dieser Test nicht routinemäßig zur Trächtigkeitsdiagnose eingesetzt. Gründe hierfür sind in dem hohen Aufwand bei der Durchführung – es können in etwa nur sechs Proben pro Tag analysiert werden – dem Misslingen des Tests bei unpräziser Durchführung und dem Fehlen einer spezifischen und quantitativen Bestimmung von EPF zu sehen (Koch und Ellendorff, 1982; Tiemann und Klima, 1985; Morton, 1998).



### **2.3.3.2 Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs)**

#### **2.3.3.2.1 PAGs – Allgemeine Aspekte**

Die Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) bilden eine polymorphe Familie von Proteinen, die bei Wiederkäuern von Beginn bis zum Ende der Trächtigkeit von der Plazenta exprimiert werden. Diese sogenannten PAGs werden in den mono- bzw. binukleären Zellen des Trophektoderms gebildet. Ein Teil von ihnen gelangt in die Blutbahn und kann von verschiedenen RIA- und ELISA-Systemen für die Trächtigkeitsdiagnostik bei Rind, Schaf und Ziege genutzt werden (Sousa et al., 2006).

Vertreter dieser mittlerweile großen Gruppe wurden erstmals 1982 unter dem Namen PSPB aus bovinen Plazentomen unterschiedlicher Trächtigkeitsstadien isoliert (Butler et al., 1982). Dieses PSPB repräsentierte eine Vielzahl von Molekülen mit einem Molekulargewicht zwischen 27 und 53 kDa (Butler et al., 1982). Sasser et al. (1986) konnten PSPB vom 24. Tag nach der Konzeption bis zur Geburt im Blut von tragenden Kühen mittels eines von ihnen entwickelten RIAs nachweisen. Zoli et al. (1991) isolierten ein einzelnes 67 kDa großes Protein und bezeichneten es als boPAG1. Bis heute wurden PAGs in vielen Spezies nachgewiesen, und innerhalb einer Spezies kommen sie zum Teil in großer Vielfalt vor (Sousa et al., 2006).

PAGs unterlaufen wie alle Glykoproteine einen komplexen post-translationalen Prozess. Die Vielzahl unterschiedlicher PAGs ergibt sich aus der hohen Variabilität der Aminosäuresequenzen, der Kohlenhydratkomponenten und dem Maß der Glykosylierung (Gajewski et al., 2009). Xie et al. (1997b) vermuten, dass allein Wiederkäuer bis zu 100 PAG-Gene besitzen. Bis heute wurde jedoch lediglich cDNA von 22 bovinen PAG(boPAG)-Genen, von neun ovinen PAG(ovPAG)-Genen und von elf caprinen PAG(caPAG)-Genen geklont und sequenziert (Xie et al., 1991; 1994; 1997b; Garbayo et al., 2000; Green et al., 2000; Garbayo et al., 2005).

PAGs gehören phylogenetisch zur Familie der Aspartasen; boPAG1 ist von der Aminosäurestruktur zu über 50 % mit Pepsin A, Cathepsin D und Cathepsin E identisch (Xie et al., 1991). Eine enzymatische Aktivität wird bei den meisten PAGs jedoch nicht vermutet (Xie et al., 1991; Guruprasad et al., 1996).

### 2.3.3.2.2 Einteilung der PAGs bei Hauswiederkäuern

Die PAGs der Hauswiederkäuer werden anhand von Unterschieden in ihrer Aminosäurestruktur in verwandtschaftliche Beziehungen gesetzt und, wie in Tabelle 1 angegeben, in drei Gruppen eingeteilt (Garbayo et al., 2000; Green et al., 2000; Hughes et al., 2000; 2003; Sousa et al., 2006).

Tabelle 1: Einteilung bisher identifizierter PAGs der Hauswiederkäuer in drei Gruppen entsprechend ihrer Aminosäurestruktur.

<b>boPAG8-Gruppe</b>	<b>boPAG2-Gruppe</b>	<b>boPAG1-Gruppe</b>
boPAG8/10 (Rind)	boPAG2, boPAG11-13 (Rind)	boPAG1/3-7/9/14-21 (Rind)
	ovPAG2 (Schaf)	ovPAG1/3-9 (Schaf)
caPAG8 (Ziege)	caPAG2 (Ziege)	caPAG1/3-7/9-11 (Ziege)

#### 2.3.3.2.2.1 boPAG8-Gruppe

Die boPAG8-Gruppe ist die wahrscheinlich phylogenetisch älteste Gruppe von PAGs, die bis heute entdeckt wurde (Xie et al., 1997b). Die PAGs dieser Gruppe wurden nicht nur bei Hauswiederkäuern (siehe Tabelle 1) (Xie et al., 1997b; Garbayo et al., 2000; Green et al., 2000; Hughes et al., 2000) nachgewiesen, sondern auch bei anderen Spezies der Unterklasse der höheren Säugetiere, zu deren Ordnungen auch Paarhufer, Unpaarhufer, Raubtiere, Hasenartige und Nagetiere gehören (Sousa et al., 2006). So wurde cDNA von PAGs dieser Gruppe auch bei Schwein (poPAG8), Pferd und Zebra (ePAG), Katze (catPAG), Kaninchen (rabbit pepsinogen F), Maus und Ratte (Mouse und Rat Pepsin F) nachgewiesen (Kageyama et al., 1990; Gan et al., 1997; Green et al., 1999; Kageyama et al., 2000; Chen et al., 2001; Panasiewicz et al., 2004). Es weist vieles darauf hin, dass diese PAGs eine dem Pepsinogen F ähnliche Wirkung entfalten (Garbayo et al., 1999; Green et al., 1999; Sousa et al., 2006), bei ePAG gilt dies als gesichert (Guruprasad et al., 1996).

Sie werden vermutlich sowohl in mono- als auch binukleären Zellen der Plazenta – sofern vorhanden – exprimiert (Xie et al., 1997b; Garbayo et al., 2000; Green et al., 2000).

#### **2.3.3.2.2.2 boPAG2-Gruppe**

Da man mit demselben Verfahren, mit dem bereits ein gonadotropinähnlich wirkendes Protein namens bovines Choriongonadotropin (bCG) aus der Plazenta extrahiert wurde (Beckers et al., 1988), auch boPAG2 entdeckte, nimmt man an, dass auch boPAG2 gonadotropinähnliche Wirkung besitzt. Da boPAG11-13, ovPAG2 (Green et al., 2000) und caPAG2 (Garbayo et al., 2000) eine ähnliche cDNA-Struktur wie boPAG2 besitzen, werden sie zu dieser Gruppe gezählt.

Sie werden vermutlich sowohl in mono- als auch binukleären Zellen der Plazenta – sofern vorhanden – exprimiert (Xie et al., 1997b; Garbayo et al., 2000; Green et al., 2000).

#### **2.3.3.2.2.3 boPAG1-Gruppe**

Die jüngere und wesentlich größere Gruppe von PAGs wird boPAG1-Gruppe genannt. Diese PAGs sind vermutlich erst zu der Zeit entstanden, als die Unterordnung der Wiederkäuer sich stammesgeschichtlich von der Unterordnung der Schweineartigen abzweigte und sich die epitheliochoriale zur synepitheliochorialen Plazenta entwickelte.

Die PAGs dieser Gruppe sind demnach ausschließlich in der Plazenta von Wiederkäuern zu finden (Hughes et al., 2000) und werden dort – anders als die PAGs der anderen beiden Gruppen – vorwiegend im Zytoplasma von binukleären Trophoblastzellen gebildet (Xie et al., 1997a; 1997b; Green et al., 2000; Hughes et al., 2000). Neben den in Tabelle 1 genannten boPAGs, ovPAGs (Green et al., 2000; Hughes et al., 2000) und caPAGs (Garbayo et al., 2000; Hughes et al., 2000) gehören auch PSPB und Pregnancy Specific Protein 60 (PSP60) zu dieser Gruppe, die wie boPAG1 in entsprechenden RIAs für die Trächtigkeitsdiagnose beim Rind herangezogen werden.

Es ist unwahrscheinlich, dass die PAGs dieser Gruppe enzymatische Aktivität besitzen (Guruprasad et al., 1996; Xie et al., 1997b).

#### 2.3.3.2.2.4 Sonstige PAGs

PAG-Gene, die bisher keiner der drei aufgeführten Gruppen zugeordnet werden konnten, wurden, wie Tabelle 2 zeigt, bei folgenden Spezies nachgewiesen (Xie et al., 1997b; Beckers et al., 1999):

Tabelle 2: Spezies der Unterordnung Wiederkäuer, bei denen „sonstige PAGs“ nachgewiesen wurden.

<b>Familie der Hornträger, Unterfamilie Bovinae:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Gaur,</li> <li>○ Yak</li> <li>○ Kaffernbüffel (bubPAG)</li> <li>○ Amerikanisches Bison</li> <li>○ Europäisches Bison (EbPAG)</li> <li>○ Zebu (zebuPAG)</li> </ul>
<b>Familie der Hornträger, Unterfamilie Caprinae:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hausschaf</li> <li>○ Dallschaf</li> <li>○ Schraubenziege</li> <li>○ Goral</li> <li>○ Takin</li> </ul>
<b>Familie der Gabelhornträger:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Gazelle</li> <li>○ Antilope</li> <li>○ Impala</li> <li>○ Gnu</li> <li>○ Ducker</li> <li>○ Nyala</li> </ul>
<b>Familie der Hirsche:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Weißwedelhirsch (wtdPAG)</li> <li>○ Damhirsch</li> <li>○ Maultierhirsch</li> <li>○ Japanischer Hirsch</li> <li>○ Elch (mPSPB)</li> <li>○ Amerikanischer Elch</li> </ul>
<b>Familie der Giraffen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Giraffe</li> </ul>

### **2.3.3.2.3 Bildung von PAGs der boPAG1-Gruppe**

Da bis heute nur Mitglieder der boPAG1-Gruppe für die Trächtigkeitsdiagnose genutzt werden können, wird im Folgenden ausschließlich auf diese Gruppe eingegangen.

Die PAGs der boPAG1-Gruppe (siehe Kapitel 2.3.3.2.2.3) werden in den binukleären Trophoblastzellen der Plazenta gebildet (Reimers et al., 1985; Xie et al., 1991; Zoli et al., 1992a; Xie et al., 1997a; Garbayo et al., 2000; Green et al., 2000). Da PAGs aber auch in Bullen- und Färsenserum sowie in Hoden von Bullen und Schafböcken nachweisbar sind (Zoli et al., 1990; 1992b), ist anzunehmen, dass neben der Plazenta auch die Gonaden PAGs produzieren können. Aus diesem Grunde bezeichnet man die Proteine nur noch als trächtigkeitsassoziiert (Sousa et al., 2001).

Ist ein Wiederkäuer tragend, tauchen binukleäre Zellen kurz vor der Implantation des Embryos im Trophektoderm auf (Wango et al., 1990). Binukleäre Trophoblastzellen entstehen durch eine unvollständige Zellteilung mononukleärer Trophoblastzellen, machen 15 – 20 % der Gesamtzellzahl im Trophektoderm aus (Wooding et al., 1986) und sind dort von der Implantation bis 1 – 2 Tage vor der Geburt präsent (Wooding et al., 1986; Derivaux et al., 1988). Neben Progesteron (Reimers et al., 1985; Gross und Williams, 1988), Prostaglandinen (Reimers et al., 1985), plazentärem Lactogen (Morgan et al., 1989; Wooding, 1992) und Östrogenen (Gross und Williams, 1988; Matamoros et al., 1994) produzieren sie eine Woche nach Implantation – zeitgleich mit der Entwicklung der Villi – auch PAGs (Lee et al., 1986; Morgan et al., 1987; 1989; Sousa et al., 2001).

Die noch unreifen binukleären Zellen sind tief im Trophektoderm lokalisiert und wandern während der Reifung Richtung maternales Epithel (Sousa et al., 2001). Über die gesamte Trächtigkeit (Wooding und Wathes, 1980) wandern ca. ein Fünftel der im Trophektoderm gereiften binukleären Zellen kontinuierlich in Richtung Uterusepithel, bilden dabei zeitweise einen Teil der trophektodermalen tight junctions und überqueren diese junctions (Wooding et al., 1980; Wooding und Wathes, 1980; Morgan und Wooding, 1983). Via Exocytose geben die Zellen den Inhalt ihrer Granula entweder unmittelbar an die Basalmembran der Uterusepithelzellen ab, oder sie fusionieren zunächst mit den maternalen Zellen zu trinukleären, fetomaternalen Hybridzellen, um dann kurz danach zu degranulieren und vom Trophektoderm resorbiert zu werden (Wooding, 1984).

Die einzelnen PAGs scheinen zu sehr unterschiedlichen Zeiten in der Plazenta exprimiert zu werden. Einige werden in früher Trächtigkeit exprimiert und verschwinden zur Geburt, während wiederum andere erst zu einem späteren Trächtigkeitsstadium erstmals nachweisbar sind (Garbayo et al., 2000; Green et al., 2000). So sind die ersten boPAGs ab dem 7. Tag post conceptionem nachweisbar, der Beginn der Nachweisbarkeit anderer PAGs fällt in die Zeit vom 14. – 21. Tag der Trächtigkeit (Ushizawa et al., 2004).

### **2.3.3.2.4 Funktion von PAGs der boPAG1-Gruppe**

Die genaue Funktion der PAGs der boPAG1-Gruppe ist bis jetzt noch weitgehend unbekannt. Grundsätzlich wird diskutiert, ob Ziel der Wirkung von PAGs vorrangig die Plazenta oder aber der maternale Organismus ist.

Für eine vorrangige Wirkung im maternalen Organismus spricht die Tatsache, dass PAGs in hohen Konzentrationen im maternalen, aber kaum im fetalen Blut nachweisbar sind (Zoli et al., 1992b; Ushizawa et al., 2004). So vermuten Del Vecchio et al. (1996), dass es sich bei den PAGs um plazentare Hormone handelt, die als Ziel ihrer Wirkung das Corpus luteum haben. So konnten sie nach Zugabe von PSPB (siehe Kapitel 2.3.3.2.1) zu Lutealzellkulturen vom Rind einen Anstieg der Progesteron-Produktion nachweisen, ein Effekt, der in einer ersten Untersuchung ausblieb (Del Vecchio et al., 1995). Xie et al. (1994) sowie Pate und Condon (1982) weisen jedoch darauf hin, dass Lutealzellen in Zellkulturen häufig unterschiedlich reagieren. Zudem spricht nach Wooding et al. (2005) die Vielfalt an PAGs gegen eine einseitige Wirkung auf das Corpus luteum.

Andere Autoren sind der Ansicht, dass PAGs ausschließlich lokal in der Plazenta wirken und ihre Präsenz im maternalen Blutkreislauf nur eine unbeabsichtigte Konsequenz daraus ist, dass die binukleären Zellen ihre Granula in der Nähe der maternalen Blutkapillaren entlassen. So gehen Wooding et al. (2005) von einer rein mechanischen Funktion der PAGs aus; ihrer Meinung nach könnten PAGs eine Rolle im Verknüpfen von maternalem und fetalem Gewebe spielen. Die Tatsache, dass es eine Vielzahl von unterschiedlich glykosylierten PAGs innerhalb einer Spezies gibt (Xie et al., 1991; 1994; 1997a; Green et al., 2000) und dass die im Laufe der Trächtigkeit im Blut auftauchenden PAGs jeweils eine andere Glykosylierung aufweisen, lässt Klisch et al. (2006) hingegen vermuten, dass die unterschiedliche Glykosylierung der PAGs eine immunregulatorische Rolle spielt. Sie stellen die Theorie auf, dass PAGs die Selektin vermittelte Zelladhäsion von Leukozyten verhindern, indem die Glykane der

PAGs mit diesen Selektinen interagieren. Wooding et al. (2005) halten es wiederum für möglich, dass PAGs Trophoblastzellen vor den Attacken des maternalen Immunsystems schützen, indem die im maternalen Bindegewebsstroma sitzenden PAGs der boPAG1-Gruppe die Leukozytenmigration aus den maternalen Kapillaren verhindern.

### **2.3.3.2.5 Testsysteme zum spezifischen Nachweis definierter PAGs**

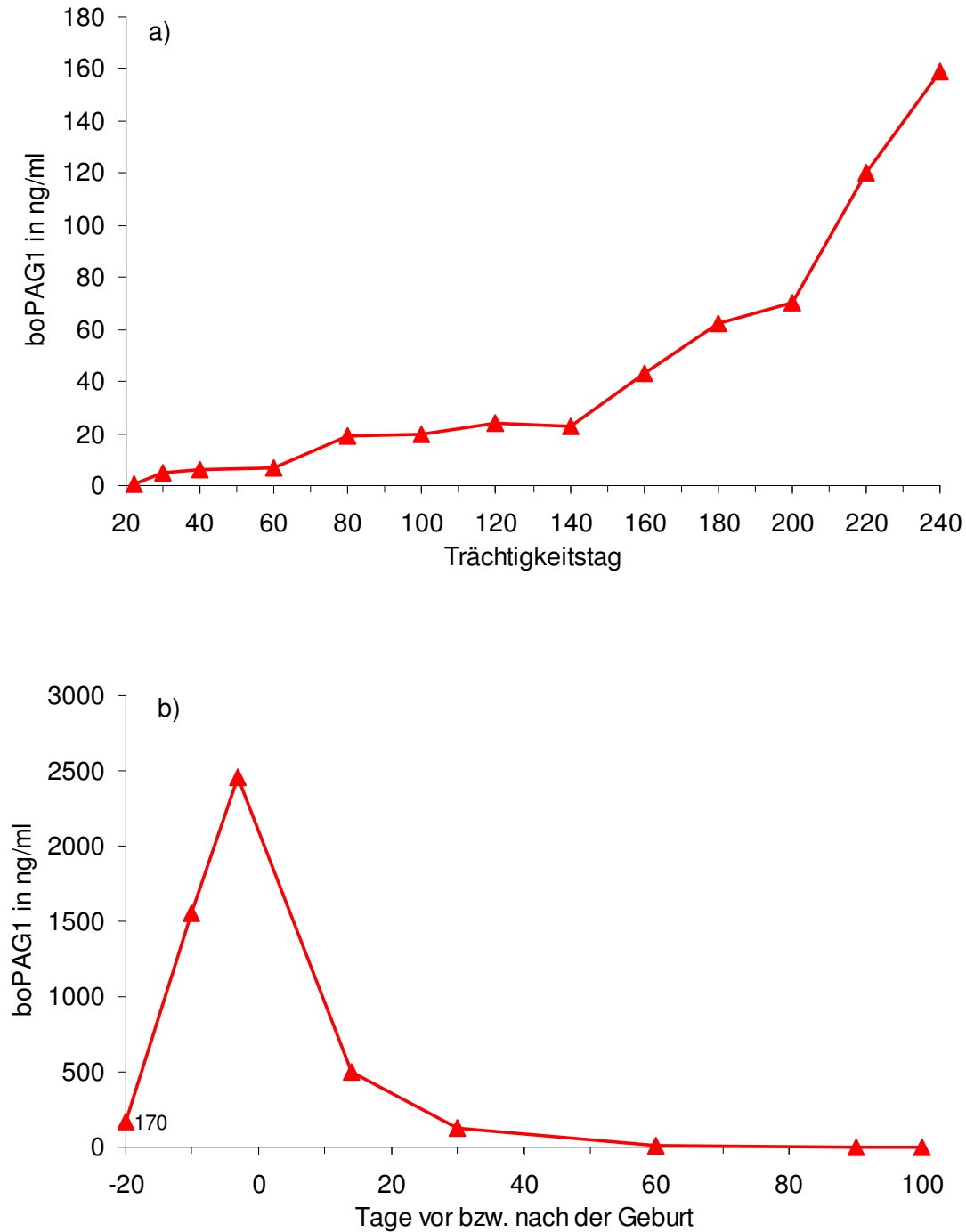
Von der Vielzahl identifizierter PAGs konnten bis jetzt nur wenige aus der Plazenta aufgereinigt werden (Xie et al., 1991; 1994; 1997b; Green et al., 2000; Sousa et al., 2006). Zu diesen PAGs gehören unter anderem boPAGs wie PSPB, PSP60 und boPAG1. Mit den halbaufgereinigten und aufgereinigten Präparationen dieser PAGs wurden Kaninchen immunisiert und aus ihrem Blut Antisera gewonnen. Diese Antisera ermöglichten die Entwicklung von homologen und heterologen RIAs und ELISAs (Sousa et al., 2006) zum Nachweis von PAGs in Blut und Milch. Unter homologen Immunotests werden dabei Messverfahren verstanden, bei denen dasselbe PAG für Standard, radioaktiv markiertes Antigen (Tracer) und Antiserumherstellung verwendet wird. Bei heterologen Immunotests wird hingegen eine der drei Komponenten durch ein anderes PAG ersetzt (siehe auch Kapitel 3.3).

### **2.3.3.2.6 Verlauf der PAG-Konzentrationen im Blut beim Rind während der Trächtigkeit und post partum**

Bereits kurz nach Entdeckung der PAGs untersuchten Zoli et al. (1992b) mittels eines homologen RIAs (boPAG1-RIA497 ; siehe auch Kapitel 3.3) den PAG-Konzentrationsverlauf über den gesamten Zeitraum der ungestörten Gravidität und post partum. Dazu wurden Blutproben von 20 Kühen zwischen dem 20. Tag nach Konzeption und dem 100. Tag post partum entnommen.

Abbildung 1a zeigt den Verlauf der PAG-Konzentrationen im maternalen Blut vom 20. – 240. Trächtigkeitstag und Abbildung 1b den Verlauf vom 20. Tag ante partum bis zum 100. Tag post partum. Da je nach verwendetem RIA-System die Höhe der gemessenen PAG-Konzentrationen unterschiedlich ausfällt (siehe Kapitel 2.3.3.2.8), haben die in Abbildung 1 dargestellten Verlaufskurven nur qualitativen Charakter.

## Literaturübersicht



**Abbildung 1:** PAG-Konzentrationsverlauf ▲—▲ (boPAG1-RIA497) im Blut beim Rind vom 20. – 240. Tag der Trächtigkeit (1a) bzw. 20 Tage ante partum – 100 Tage post partum (1b) (Zoli et al., 1992b).



Wie aus Abbildung 1a ersichtlich ist, konnten bei einigen Tieren PAGs bereits 22 Tage nach Konzeption mit  $0,38 \pm 0,13$  ng/ml im Serum nachgewiesen werden, ab dem 30. Tag bei allen Kühen ( $3,60 \pm 1,73$  ng/ml). Die Konzentrationen stiegen kontinuierlich an bis auf  $2462,4 \pm 1017,9$  ng/ml 1 – 5 Tage ante partum. Danach sanken die Werte stetig ab und waren 100 ± 20 Tage post partum mit  $< 0,2$  ng/ml im Serum praktisch nicht mehr nachweisbar. Der erste Nachweis von PAGs im maternalen Blutkreislauf am 22. Trächtigkeitstag deckt sich zeitlich in etwa mit dem Auftauchen von PAGs in den Trophoblastzellen der Plazenta während der Implantation (siehe auch Kapitel 2.3.3.2.3).

Der in Abbildung 1b dargestellte Konzentrationspeak kurz vor der Geburt ist mit dem zu diesem Zeitpunkt beginnenden präpartalen Verschwinden der binukleären Zellen im Trophektoderm zu erklären (Patel et al., 1998).

Der nur langsame Abfall der PAG-Konzentrationen nach der Geburt kann zum einen mit den sehr hohen PAG-Konzentrationen kurz vor der Geburt, zum anderen mit der langen Halbwertszeit der PAGs von 8 – 9 Tagen erklärt werden (Zoli et al., 1992b; Kiracofe et al., 1993; Mialon et al., 1993).

### **2.3.3.2.7 Endogene Einflüsse auf die PAG-Konzentration im Blut beim Rind**

Die Höhe der PAG-Konzentrationen im Blut wird offensichtlich von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Einige von ihnen ergeben sich wie folgt:

Rasse (Guilbault et al., 1991; Zoli et al., 1992b; Mialon et al., 1993; Lopez-Gatius et al., 2007a), Geschlecht des Fetus (Guilbault et al., 1991; Zoli et al., 1992b), Anzahl der Feten (Sasser et al., 1986; Dobson et al., 1993; Patel et al., 1995; 1997; 1998; Lopez-Gatius et al., 2007a) und Milchproduktionsleistung (Lopez-Gatius et al., 2007a).

So haben Charolais-Kühe über die gesamte Trächtigkeit eine höhere PAG-Konzentration im Blut als Normand- und Holstein-Friesian-Kühe (Mialon et al., 1993), peripartal weisen Hereford-Kühe höhere PAG-Konzentrationen auf als Holstein-Friesian-Kühe (Guilbault et al., 1991; Zoli et al., 1992b).

Im Blut von Holstein- und Hereford-Kühen können peripartal bei männlichen Feten höhere PAG-Konzentrationen gemessen werden als bei weiblichen Feten (Guilbault et al., 1991), Zoli et al. (1992b) wiesen hingegen präpartal bei weiblichen Feten von Hereford-Kühen höhere PAG-Konzentrationen nach.

Dobson et al. (1993) und Vasques et al. (1995) konnten im Blut von zwillingsträchtigen Tieren höhere PAG-Konzentrationen nachweisen als bei Einlingsträchtigkeiten.

Zudem scheinen Kühe, die größere und schwerere Kälber zur Welt bringen, während der Trächtigkeit höhere PAG-Konzentrationen aufzuweisen (Vasques et al., 1995). Diese individuellen Unterschiede der PAG-Konzentrationen sind zum Teil so hoch, dass trotz eingetretener Trächtigkeit bei einigen Tieren auch am 40. Tag post conceptionem nur sehr niedrige PAG-Werte messbar sind (Szenci et al., 1998a). Die höchste Variabilität tritt aber kurz vor der Geburt auf (Green et al., 2005).

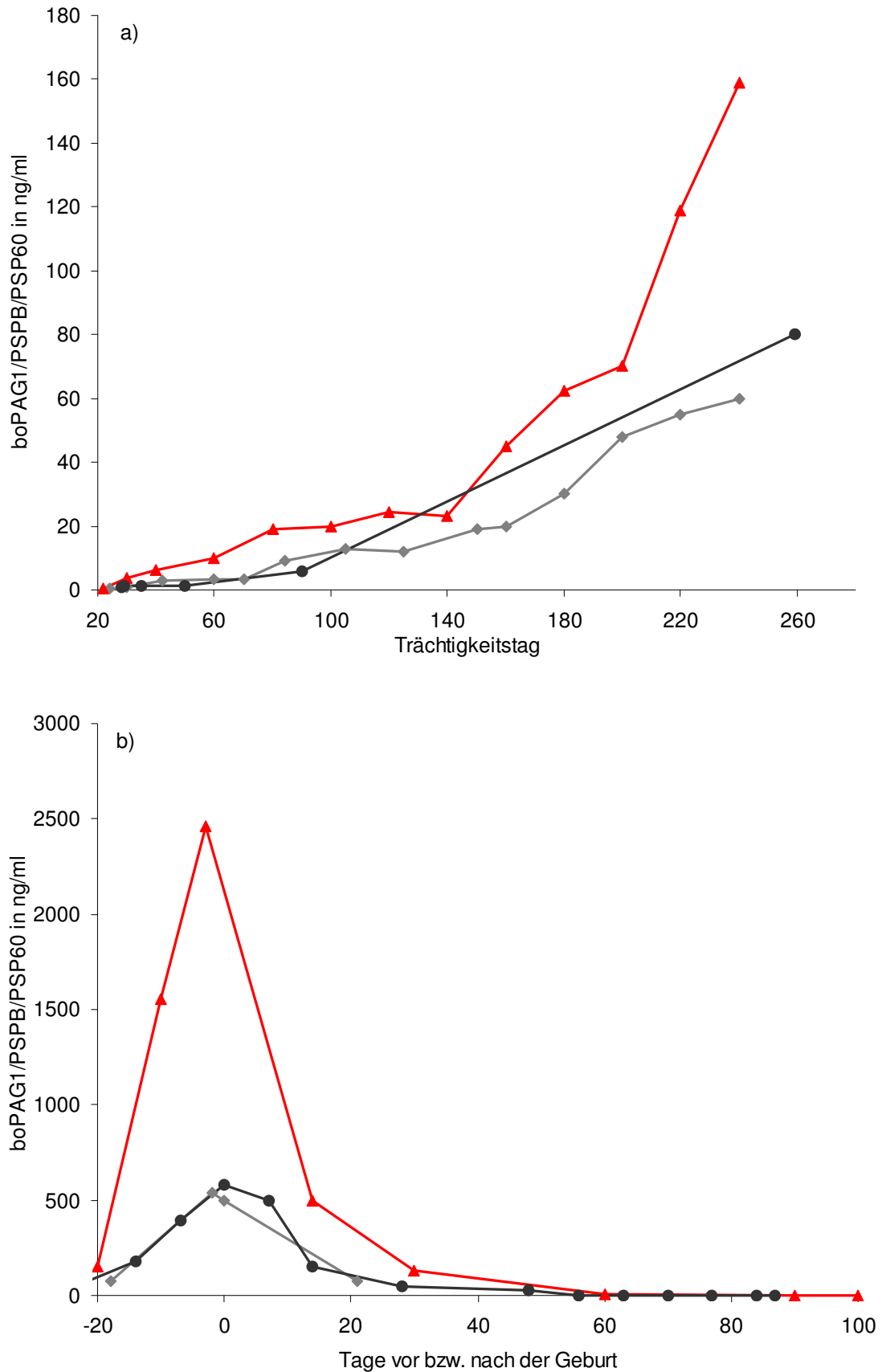
Verschiedene Embryotransferstudien weisen zudem darauf hin, dass die PAG-Konzentrationen im Blut der Rezipienten auf höhere Werte steigen, als dies bei normal inseminierten Kühen der Fall ist (Vasques et al., 1995). Der Anstieg ist umso höher, je weiter Mutter und Fetus genotypisch voneinander entfernt sind (Guilbault et al., 1991; Zoli et al., 1992b; Fernandez-Arias et al., 1999).

### **2.3.3.2.8 Verlauf der PAG-Konzentrationen im Plasma während der Gravidität und post partum bei Vergleich von drei PAG-Radioimmunoassays (PAG-RIAs)**

Neben dem in Kapitel 2.3.3.2.6 genannten homologen boPAG1-RIA497 von Zoli et al. (1992b) (siehe auch Kapitel 3.3) entwickelten Sasser et al. (1986) und Mialon et al. (1993) ebenfalls PAG-RIAs, alle mit dem Ziel, diese zur Trächtigkeitsdiagnostik beim Rind anwenden zu können. Heute geht man davon aus, dass die dafür verwendeten aufgereinigten PAG-Proteine boPAG1, PSPB und PSP60 identische aminoterminalen Sequenzen haben und, wenn auch nicht identisch, so doch nahe verwandt sind (Lynch et al., 1992; Green et al., 2000).

In Abbildung 2 werden die PAG-Konzentrationsprofile nach Anwendung der drei RIAs gegenübergestellt. Wie Abbildung 2 zeigt, ergeben sich für die drei RIAs nahezu identische PAG-Konzentrationsprofile. Die absolute Höhe der gemessenen Werte unterscheidet sich jedoch erheblich. So ergeben sich bei Anwendung des boPAG1-RIA497 (Zoli et al., 1992b) die höchsten Werte, während bei Anwendung des PSP60-RIAs (Mialon et al., 1993) deutlich niedrigere und nur tendenziell höhere Werte als beim PSPB-RIA (Sasser et al., 1986) gemessen wurden.

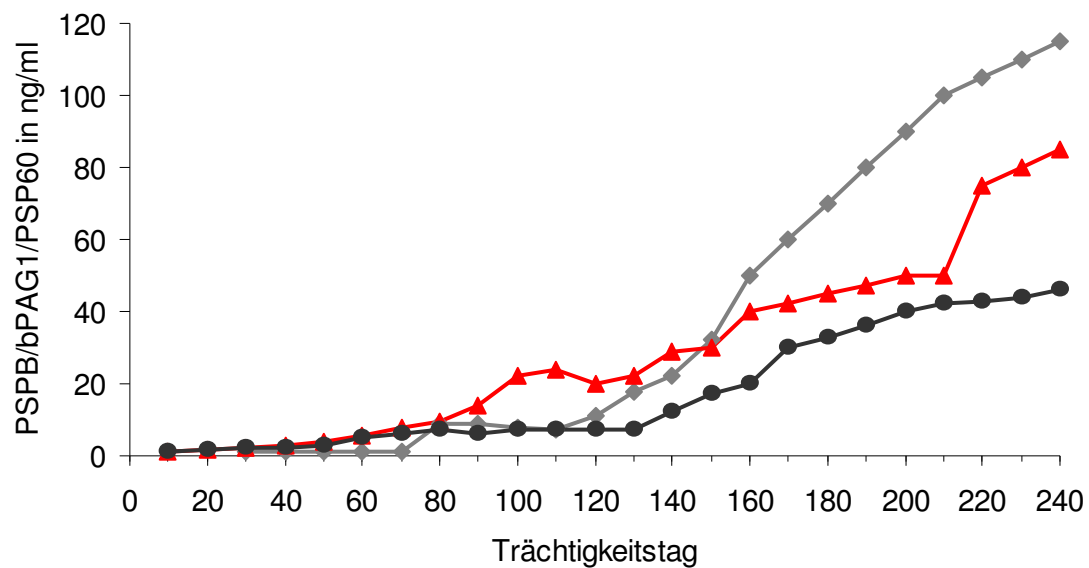
## Literaturübersicht



**Abbildung 2:** PAG-Konzentrationsprofil vom 20. – 260. Trächtigkeitstag (2a) bzw. 20 Tage ante partum bis 100 Tage post partum (2b) bei Anwendung von drei unterschiedlichen RIAs: ▲–▲ Zoli et al. 1992b (boPAG1), ◆–◆ Sasser et al. 1986 (PSPB), ●–● Mialon et al. 1993 (PSP60).

## Literaturübersicht

Bei Patel et al. (1995; 1997; 1998) kamen nacheinander offensichtlich alle drei Tests zur Anwendung. Wie Abbildung 3 zeigt, ähneln sich auch hier die Konzentrationsprofile, wobei sich im 2. Trächtigkeits-Trimester Überschneidungen der drei Kurven ergeben und sich im letzten Drittel der Trächtigkeit eine gleichbleibende Reihenfolge entwickelt. Anders als in Abbildung 2 dargestellt, zeigt Abbildung 3, dass die höchsten Werte mit dem PSPB-RIA gemessen werden, gefolgt von boPAG1-RIA497 und PSP60-RIA.



**Abbildung 3:** PAG-Konzentrationsprofil von fünf Holstein-Friesian-Kühen zwischen dem 20. und 240. Trächtigkeitstag bei Anwendung von drei unterschiedlichen RIAs: ▲—▲ Patel et al.1997 (boPAG1), ◆—◆ Patel et al. 1995 (PSPB), ●—● Patel et al. 1998 (PSP60).

### 2.3.3.2.9 Vergleich der Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Verwendung von drei PAG-RIAs zur Graviditätsdiagnose beim Rind

Ziel bisheriger Untersuchungen war es, mit dem PAG-RIA eine möglichst frühe und sichere Untersuchung auf Trächtigkeit durchführen zu können. Bei Anwendung der drei homologen RIAs (PSPB; boPAG1; PSP60) ergaben sich für den Zeitpunkt um den 30. Tag nach der KB die in Tabelle 3 wiedergegebenen Zuverlässigkeitskenndaten Sensitivität, Spezifität und cut off-Punkt. Bei dem cut off-Punkt handelt es sich um den PAG-Grenzwert, der die Tiere in „tragend“ bzw. „nicht tragend“ einteilt (siehe auch Kapitel 2.3 bzw. 3.6.2).

**Tabelle 3:** Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Verwendung von drei PAG-RIAs zur Graviditätsdiagnostik beim Rind (Referenz: transrektale Palpation).

	<b>PSPB-RIA</b> (Humblot et al., 1988a; 1988b)		<b>boPAG1-RIA497</b> (Zoli et al., 1992b)	<b>PSP60-RIA</b> (Mialon et al., 1994)	
<b>Tag nach KB</b>	30. – 35. Tag		35. Tag	35. Tag	
<b>Rinder</b>	French-Friesian 78 Färsen   97 Kühe		Holstein-Friesian 430 Färsen (Embryotransfer)	Charolais 341 Färsen   558 Kühe	
<b>Sensitivität</b>	95,5 %	85,7 %	93,0 %	91,5 %	77,8 %
	90,2 %			83,7 %	
<b>Spezifität</b>	100 %	100 %	97,9 %	94,1 %	98,7 %
	100 %			97,8 %	
<b>cut off-Punkt</b>	0,5 ng/ml		0,5 ng/ml	0,2 ng/ml	

Daraus ergibt sich, dass – bei alleiniger Berücksichtigung der Färsen – die Zuverlässigkeit beim PSPB-RIA, dicht gefolgt vom boPAG1-RIA497, am besten ausfiel. In Tabelle 4 werden diese beiden Tests noch einmal direkt miteinander verglichen; während sich für den boPAG1-RIA497 eine höhere Sensitivität ergab, ergab sich für den PSPB-RIA eine deutlich höhere Spezifität.

**Tabelle 4:** Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Verwendung von PSPB-RIA und boPAG1-RIA497 zur Graviditätsdiagnostik beim Rind: Direkter Vergleich (Szenci et al. 1998a).

	<b>PSPB-RIA</b>	<b>boPAG1-RIA497</b>
<b>Tag nach der KB</b>	29./30. Tag	
<b>Rinder</b>	138 Holstein-Friesian-Kühe	
<b>Sensitivität</b>	92,0 %	95,2 %
<b>Spezifität</b>	82,6 %	69,3 %
<b>cut off-Punkt</b>	0,8 ng/ml	0,8 ng/ml

### **2.3.3.2.10 Weitere Untersuchungen zur Vorverlegung des Zeitpunktes des Trächtignachweises**

Nachdem Green et al. (2000) zeigen konnten, dass boPAGs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Trächtigkeit exprimiert werden (siehe auch Kapitel 2.3.3.2.3) und boPAG1-mRNA-Transkripte erst ab dem 45. Tag nach der Konzeption nachweisbar sind, wurde angenommen, dass der homologe boPAG1-RIA497 am 30. Tag post inseminationem vermutlich andere PAG-Moleküle nachweist als boPAG1, also PAGs, die zu einem früheren Zeitpunkt exprimiert werden, aber gemeinsame Epitope mit boPAG1 aufweisen (Green et al., 2000; Perenyi et al., 2002b).

Aus dieser Beobachtung resultierte die Erwartung, dass sich die Testempfindlichkeit möglicherweise verbessern ließe, wenn für diese früher exprimierten boPAGs – wie für die bereits am 25. Trächtigkeitstag exprimierten boPAG4/5 und 9 – ein homologer RIA entwickelt werden würde (Green et al., 2000).

Eine andere Möglichkeit wurde darin gesehen, heterologe Tests zu verwenden, bei denen Antikörper zum Einsatz kommen, die gegen PAGs anderer Spezies gerichtet sind.

Perenyi et al. (2002b) entwickelten solche heterologen RIAs und verglichen diese mit dem homologen boPAG1-RIA497. Für die heterologen RIAs wurden, wie beim boPAG1-RIA497, als Standard und Tracer Aufreinigungen von boPAG1 verwendet, während gegen unterschiedliche caPAGs bzw. ovPAGs gerichtete Antikörper genutzt wurden. In den dazu durchgeführten Untersuchungen lieferte der heterologe boPAG1-RIA706 (siehe auch Kapitel 3.3), bei dem gegen caPAG<sub>55+62 kDa</sub> gerichtete Antikörper verwendet werden, die vielversprechendsten Ergebnisse. Mit diesem RIA konnten zwischen dem 25. und 50. Tag der Trächtigkeit höhere PAG-Konzentrationen im Blut von Kühen nachgewiesen und demnach frühere Formen von im Blut zirkulierenden PAGs erkannt werden als mit dem homologen boPAG1-RIA497.

Beide RIAs wurden in verschiedenen Studien miteinander verglichen (Perenyi et al., 2002b; Ayad et al., 2007; Lopez-Gatius et al., 2007a; Ayad et al., 2008). In Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Arbeiten gegenübergestellt.

## Literaturübersicht

**Tabelle 5:** PAG-Konzentrationen in verschiedenen Studien:  
boPAG1-RIA497 (homolog) und boPAG1-RIA706 (heterolog) im Vergleich.

Trächtigkeitstag	Perenyi et al. (2002b) (n = 49)		Lopez-Gatius et al. (2007a) (n = 80)		Ayad et al. (2008) (n = 27)	
	RIA497 <sup>1)</sup> : PAG in ng/ml	RIA706 <sup>2)</sup> : PAG in ng/ml	RIA497 <sup>1)</sup> : PAG in ng/ml	RIA706 <sup>2)</sup> : PAG in ng/ml	RIA497 <sup>1)</sup> : PAG in ng/ml	RIA706 <sup>2)</sup> : PAG in ng/ml
<b>30</b>	–	–	–	–	1,84 ± 1,17	5,29 ± 3,86
<b>32</b>	2,43 ± 0,81	4,3 ± 1,32	–	–	–	–
<b>35</b>	–	–	1,67 ± 0,07	3,29 ± 0,16	–	–
<b>42</b>	4,01 ± 1,48	5,56 ± 1,95	1,67 ± 0,09	2,91 ± 0,17	–	–
<b>45</b>	–	–	–	–	3,05 ± 1,29	7,92 ± 4,37
<b>49</b>	–	–	1,76 ± 0,09	2,94 ± 0,15	–	–
<b>56</b>	–	–	2,12 ± 0,10	3,34 ± 0,18	–	–
<b>60</b>	–	–	–	–	4,77 ± 2,46	8,82 ± 5,21
<b>63</b>	–	–	2,72 ± 0,13	4,02 ± 0,21	–	–
<b>80</b>	–	–	–	–	8,77 ± 7,08	18,7 ± 10,6
<b>nt<sup>3)</sup></b>	–	–	–	–	0,21 ± 0,04	0,27 ± 0,04

<sup>1)</sup> = boPAG1-RIA497; <sup>2)</sup> = boPAG1-RIA706; <sup>3)</sup> = nicht tragend (n = 294); Ayad et al. (2007)

Die Gegenüberstellung zeigt, dass die drei Autorengruppen bei tragenden Tieren mit dem boPAG1-RIA706 absolut höhere Werte messen konnten als mit dem boPAG1-RIA497, während sich in beiden RIA-Systemen bei nicht tragenden Tieren ein ähnlich niedriger analytischer Blindwert von 0,21 bzw. 0,27 ng/ml ergab.

#### **2.3.3.2.11 PAG-RIA Milch**

Wegen der Einfachheit der Probenentnahme wurde versucht, PAGs auch in der Kuhmilch nachzuweisen.

Metelo et al. (2004) und Gajewski et al. (2008) konnten bei der Kuh eine Beziehung zwischen dem PAG-Verlaufsprofil in Milch- und Blutproben feststellen, sie zeigten jedoch auch, dass die PAG-Konzentrationen in der Milch lediglich 3 % bzw. 4,5 % der Plasma-Konzentrationen betragen. So erreichen die PAG-Konzentrationen in der Milch bis zum 70. Tag der Trächtigkeit nur einen Wert von 0,1 – 0,3 ng/ml, das heißt, die Werte liegen an der unteren Nachweisgrenze des verwendeten boPAG1-RIA497. Ein früher Trächtigkeitsnachweis durch Bestimmung von PAGs in der Milch ist also nicht möglich. Erst ab dem 168. Trächtigkeitstag wird in der Milch ein PAG-Wert im Bereich von 1 ng/ml erhalten (Metelo et al., 2004; Gajewski et al., 2008).

Auch bei Ziege und Schaf sind PAGs sowohl im Blut als auch in der Milch nachweisbar. Die PAG-Konzentrationen in der Milch von Ziegen sind jedoch wesentlich höher als in der Milch von Kühen. Sie liegen bei circa 10 % der Plasmakonzentration. Wie auch beim Rind verlaufen Plasma- und Milchprofil parallel (Gonzalez et al., 2000b). Durch Erfassung von PAGs in der Milch ist nach Gonzalez et al. (2000b; 2001) ein Trächtigkeitsnachweis bei der Ziege mittels eines heterologen RIAs ab dem 32. bzw. 35. Tag der Gravidität möglich. Beim Schaf kann der PAG-RIA als Trächtigkeitsnachweis in der Milch ab dem 32. Tag der Trächtigkeit verwendet werden (El Amiri et al., 2003).

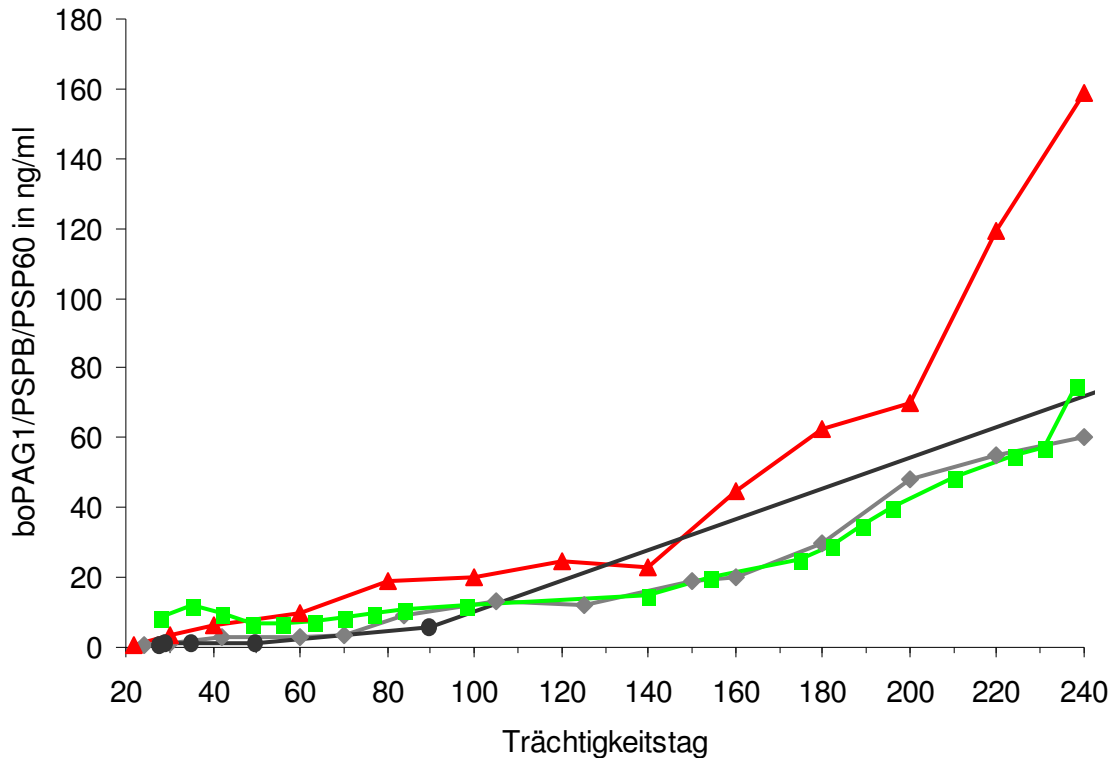
#### **2.3.3.2.12 PAG-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PAG-ELISA) Plasma**

Die Arbeitsgruppe um Sasser entwickelte 2003 in den USA nach Etablierung des PSPB-RIAs 1986 (siehe auch Kapitel 2.3.3.2.8) einen auch kommerziell erhältlichen ELISA namens BioPRYN, der PSPB im Serum von trächtigen Rindern nachweist. Das Testprinzip und die Grenzwerte des Tests werden nicht offen gelegt, der Test wurde aber unter anderem von Gabor et al. (2007), Breed et al. (2009) und von Romano und Larson (2010) validiert. Wie Tabelle 6 zeigt, lag die Sensitivität des BioPRYN-Tests bei Untersuchung von Blutproben, die am 30. Tag nach der KB entnommen wurden, bei 96,0 % und die Spezifität bei 93,9 % (Romano und Larson, 2010).

Von Green et al. (2005) wurde ein indirekter Sandwich-ELISA zur Erfassung von boPAG1 unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers entwickelt. Das sich aus



der Anwendung dieses boPAG1-ELISAs ergebende Konzentrationsprofil wird in Abbildung 4 den drei Konzentrationsprofilen der bereits in Kapitel 2.3.3.2.8 erwähnten drei RIAs gegenübergestellt. In Abbildung 4 ist deutlich zu erkennen, dass sich nach Anwendung des von Sasser et al. (1986) entwickelten PSPB-RIAs und dem von Green et al. (2005) entwickelten boPAG1-ELISAs nahezu identische Werte ergeben.



**Abbildung 4:** Gegenüberstellung des PAG-Konzentrationsprofils dreier PAG-RIAs (siehe Kapitel 2.3.3.2.8) mit dem boPAG1-ELISA; 20. – 240. Trächtigkeitstag:  
 ▲--▲ Zoli et al. 1992b (boPAG1-RIA), ◆--◆ Sasser et al. 1986 (PSPB-RIA),  
 ●--● Mialon et al. 1993 (PSP60-RIA) und ■--■ Green et al. 2005 (boPAG1-ELISA).

Um den boPAG1-ELISA zu vereinfachen, modifizierten Silva et al. (2007) den indirekten zu einem direkten Sandwich-ELISA und verwendeten poly- anstatt monoklonale Antikörper. Eine weitere Vereinfachung erreichten Green et al. (2009) durch Beschichtung der Teströhrchen mit monoklonalen Antikörpern, wodurch sie die Inkubationszeit des ursprünglich entwickelten Sandwich-ELISAs (Green et al., 2005) auf 90 min reduzieren konnten. Friedrich und Holtz (2008) verwendeten aufgereinigtes boPAG1 und spezifische Antikörper aus der Arbeitsgruppe Beckers, Liege, Belgien und entwickelten damit einen direkten, kompetitiven, heterogenen ELISA, mit dem ab dem 26. Tag nach der KB PAG im Serum von Rindern messbar ist.

## Literaturübersicht

In Tabelle 6 werden die einzelnen PAG-ELISA-Tests gegenübergestellt:

**Tabelle 6:** Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Verwendung von drei PAG-ELISA-Tests zur Graviditätsdiagnostik beim Rind.

	<b>BioPRYN</b> (Romano und Larson, 2010)	<b>boPAG1-ELISA</b> (Silva et al., 2007)	<b>boPAG1-ELISA</b> (Green et al., 2009)	<b>boPAG1-ELISA</b> (Friedrich und Holtz, 2008)
<b>Tag nach KB</b>	30.Tag	27.Tag	30. – 34.Tag	26. – 30.Tag
<b>Rinder</b>	Holstein-Friesian 246 Kühe und Kreuzungen	Holstein-Friesian 1042 Kühe	Holstein-Friesian ○ 539 Kühe ○ 173 Färsen,  Guernsey ○ 73 Kühe ○ 22 Färsen	397 Kühe
<b>Sensitivität</b>	96,0 %	93,5 – 96,3 %	100 %	87 %
<b>Spezifität</b>	93,9 %	91,7 – 96,8 %	95,1 ± 1,2 %	93 %
<b>cut off-Punkt</b>	0,02 ng/ml <sup>1)</sup>	0,92 ng/ml <sup>2)</sup>	0,92 ng/ml <sup>2)</sup>	1,50 ng/ml
<b>nicht tragend</b>	–	0,11 ± 0,4 ng/ml <sup>2)</sup>	0,11 ± 0,4 ng/ml <sup>2)</sup>	–

<sup>1)</sup>Gabor (2007); <sup>2)</sup>Green et al. (2005)

Wie zu erkennen ist, fällt die Zuverlässigkeit beim boPAG1-ELISA von Green et al. (2009) am besten aus, dicht gefolgt vom boPAG1-ELISA von Silva et al. (2007) und dem PSPB-ELISA (BioPRYN) von Romano und Larson (2010).

Piechotta et al. (2011) verglichen mit Blutproben, die zwischen dem 26. und 58. Tag post inseminationem bei 197 Holstein-Friesian-Kühen entnommen worden waren, die Zuverlässigkeit des von der Arbeitsgruppe um Sasser 2003 entwickelten BioPRYN-Tests (PSPB-ELISA) mit der Zuverlässigkeit des von Friedrich und Holtz (2008) entwickelten boPAG1-ELISAs. Als Referenz diente die TRUS.

Wie bei dem Vergleich von PSPB-RIA und boPAG1-RIA497 (Szenci et al., 1998a) fällt auch bei dem Vergleich vom BioPRYN-Test (PSPB-ELISA) mit dem boPAG1-ELISA auf, dass mit 97,8 bzw. 98,0 % die Sensitivität beider Tests nahezu identisch ist, die Spezifität jedoch mit 91,2 % beim boPAG1-ELISA niedriger ist als beim BioPRYN-Test (97,1 %).

### 2.3.3.2.13 PAG-ELISA Milch

Friedrich und Holtz (2008) konnten PAGs – ähnlich wie Metelo et al. (2004) bei Anwendung des boPAG1-RIA497 (siehe auch Kapitel 2.3.3.2.11) – in der Kuhmilch erst ab der 2. Trächtigkeitshälfte nachweisen.

### **2.3.3.2.14 Nachweis von PAGs und embryonale Mortalität**

#### **2.3.3.2.14.1 Embryonale Mortalität**

Die Embryonalperiode erstreckt sich von Beginn der Trächtigkeit bis zum Ende der Differenzierungsphase ca. sechs Wochen nach der Konzeption. Die sich anschließende Fetalperiode umfasst den Zeitraum bis zur Geburt (Schnorr und Kressin, 2006).

Man unterscheidet zwischen dem frühembryonalen Fruchttod, der vor dem maternalen Erkennen der Trächtigkeit am 15./17. Tag nach der KB stattfindet, und dem spät-embryonalen Fruchttod, der zwischen dem 15./17. Tag und dem 42. Tag stattfindet. Die Angaben zum Auftreten frühembryonaler Mortalität liegen – abhängig von der Studie – zwischen 20,5 und 43,6 % aller besamten Tiere, für den spät-embryonalen Fruchttod werden Zahlen zwischen 8 und 17,5 % genannt (Humblot, 2001).

Nichtaufnahme und frühembryonale Mortalität sind meist nicht voneinander unterscheidbar, da frühembryonale Mortalität nicht zu einer Verlängerung des Interöstrusintervalls führt (Humblot, 2001; Whitlock und Maxwell, 2008).

Stirbt der Embryo allerdings nach dem maternalen Erkennen der Trächtigkeit ab, kommt es frühestens drei Tage nach dem Fruchttod zu einer Rückbildung des Gelbkörpers (Kastelic et al., 1991), womit das Interöstrusintervall verlängert ist (Van Cleeff et al., 1991; Humblot, 2001). Als verlängertes Interöstrusintervall wird ein Wiedereintritt der Brunst nach 25 Tagen angesehen (Van Cleeff et al., 1991; Mialon et al., 1993; Humblot, 2001).

#### **2.3.3.2.14.2 Nachweis von embryonaler Mortalität mittels PAG-RIA/-ELISA**

Das Messen von PAG-Konzentrationen in Kombination mit anderen Analyseverfahren, wie z.B. der Erfassung von Progesteron im Blut bzw. der Anwendung von TRUS, kann wertvolle Informationen über das Auftreten von embryonaler und fetaler Mortalität bzw. Abort beim Rind liefern (Sousa et al., 2008).

Da PAGs erst zum Zeitpunkt der Implantation des Embryos vom Trophoblastgewebe gebildet werden, kann frühembryonale Mortalität, die beim Rind bereits vor dem Zeitpunkt des maternalen Erkennens der Trächtigkeit am 15./17. Tag nach der KB stattfindet, mittels PAG-RIA nicht diagnostiziert werden (Humblot et al., 1988b; Mialon et al., 1993; Humblot, 2001).

## Literaturübersicht

Die spätembryonale Mortalität hingegen lässt sich mit Hilfe von PAG-Konzentrationsmessungen bei Rind (Mialon et al., 1993; Szenci et al., 2000), Ziege (Zarrouk et al., 1999a; 1999b; Gonzalez et al., 2000a) und Schaf (Ranilla et al., 1998) nachweisen. Nach Induktion eines embryonalen Fruchttodes mittels *Arcanobacterium pyogenes*, Injektion von PGF<sub>2α</sub> bzw. Aglepristone oder aber auch anhand von Verlaufspuben von Tieren mit embryonaler Mortalität unbekannter Genese zeigte sich, dass PAG-Konzentrationen nach spätembryonalem Fruchttod langsam, aber stetig sinken (Semambo et al., 1992; Mialon et al., 1993; Szenci et al., 1998b; 2000; Alomar et al., 2003; Szenci et al., 2003; Breukelman et al., 2005). Das langsame Absinken ergibt sich aus der langen Halbwertszeit des Proteins (Mialon et al., 1993; siehe auch Kapitel 2.3.3.2.6).

Da der Zeitpunkt des Absinkens der PAG-Konzentrationen vom Zeitpunkt des Fruchttodes abhängt, werden zum Nachweis spätembryonaler Mortalität von einem Tier in der Regel drei Blutproben entnommen (Mialon et al., 1993).

Findet der Fruchttod sehr früh statt, sind PAG-Konzentrationen am 30. Tag nach der KB zwar noch nachweisbar, sie befinden sich aber in der Regel unterhalb des cut off-Punktes (Grenzwertes) für als tragend einzustufende Tiere (Mialon et al., 1993). Liegt der Wert am 30. Tag über dem cut off-Punkt, muss der Abfall durch weitere Messungen gezeigt werden, da diese Tiere sonst in der Statistik unter den falsch positiven Tieren auftauchen und damit die Spezifität des Tests erniedrigen (Szenci et al., 1998a).

Einige Autoren postulieren, dass embryonale Mortalität in der Frühträchtigkeit allein mittels einer einmaligen Beprobung und Bestimmung des PAG-Wertes im Blut vorausgesagt werden kann. So scheinen Kühe, bei denen am 35. Tag nach der KB sehr hohe bzw. niedrige PAG-Werte gemessen werden, ein höheres Risiko für embryonale Mortalität zu tragen als Tiere, die zu diesem Zeitpunkt nur mittlere PAG-Konzentrationen aufweisen (Lopez-Gatius et al., 2007b).

## **2.4 Ziel vorliegender Arbeit**

Ziel vorliegender Arbeit war es, die Anwendbarkeit des PAG-Tests unter hiesigen Bedingungen zu überprüfen und weitere Erkenntnisse zum spätembryonalen Fruchttod und damit zu einem bisher wenig erkundeten Phänomen zu erhalten.

Neben dem routinemäßig in Belgien eingesetzten boPAG1-RIA497 wurde im hiesigen Labor auch boPAG1-RIA706 etabliert und jede Probe in beiden RIA-Systemen gemessen. Damit sollten weitere Hinweise auf den Effekt unterschiedlicher Antisera auf die gemessene PAG-Konzentrationen gesammelt und die Zuverlässigkeit des jeweiligen Tests erhalten werden. Zudem sollte festgestellt werden, welcher der beiden RIAs für die frühe Graviditätsdiagnostik geeigneter erscheint.

Weiterhin sollten anhand der Bestimmung von Progesteron Hinweise auf den korrekten KB-Zeitpunkt erhalten werden.

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Versuchsdesign**

Für die vorgesehenen Untersuchungen wurden drei unterschiedliche Tierkollektive herangezogen.

##### **3.1.1 Tierkollektiv 1 (TK 1)**

Die Tiere stammten aus drei Milchvieh-Großbetrieben in Thüringen, die in Zusammenarbeit mit dem Tiergesundheitsdienst und dem LTR (Landesverband Thüringer Rinderzüchter) ausgesucht worden waren.

Von den insgesamt 1100 Kühen und Färsen wurden 296 zur KB anstehende Tiere in die Untersuchungen aufgenommen.

Am Tag der KB wurde eine Blutprobe entnommen, um die PAG- und Progesteron-Konzentration zum Zeitpunkt der KB zu ermitteln (1. Beprobung).

Sofern die Tiere in der Zwischenzeit nicht erneut zur KB vorgestellt worden waren, wurde am 29., 30. bzw. 31. Tag nach der KB eine weitere Blutprobe zur Bestimmung der PAG-Konzentration entnommen (2. Beprobung) und eine TRUS zur Trächtigkeitsdiagnose durchgeführt.

Wurde das Tier als tragend eingestuft, erfolgte zwischen dem 39. – 53. Tag nach der KB eine weitere Beprobung zur Bestimmung der PAG-Konzentration im Blut (3. Beprobung). In zwei der drei Betriebe erfolgte zwischen dem 49. und 56. Tag nach der KB eine transrektale Palpation zur Trächtigkeitsdiagnose durch den bestandsbetreuenden Tierarzt. In dem dritten Betrieb erfolgte diese erst später.

Aufgrund der unterschiedlichen Beprobungen ergaben sich drei Konstellationen:

- I. Rinder, bei denen nur eine Blutprobe entnommen wurde, weil die Tiere bis zum 29./30./31. Tag nach der KB erneut in Brunst gekommen waren.**
- II. Rinder, bei denen zwei Blutproben entnommen wurden, weil sie am 29./30./31. Tag nach der KB mittels TRUS als nicht tragend eingestuft wurden.**
- III. Rinder, bei denen drei Blutproben entnommen wurden, weil bei ihnen am 29./30./31. Tag nach der KB eine Trächtigkeit mittels TRUS diagnostiziert worden war.**

## Material und Methoden

Aufgrund der hohen PAG-Konzentrationen um die Geburt und der nur langsamen Elimination von PAG im Blut von bis zu 100 Tagen post partum, die sich durch die lange Halbwertszeit von PAG ergibt (siehe Kapitel 2.3.3.2.6), waren – um eine Aussage hinsichtlich einer eingetretenen Trächtigkeit treffen zu können – unterschiedliche Referenzwerte für nicht tragende und tragende Tiere in Abhängigkeit vom Abkalbezeitpunkt zu erwarten.

Dabei wurden folgende Gegebenheiten unterstellt:

<b>A</b>	1. Beprobung:	○ kein PAG bzw. nur Basalwert im Blut nachweisbar
	2. Beprobung:	○ Nachweis von PAG = Trächtigkeitsnachweis
	3. Beprobung:	○ Bestätigung der Trächtigkeit bei gestiegenen PAG-Werten bzw. Hinweis auf embryonalen Fruchttod bei abgefallenen PAG-Werten
<b>B</b>	1. Beprobung:	○ PAG nachweisbar
	2. Beprobung:	○ <b>bei Nichtträchtigkeit:</b> PAG nicht nachweisbar ○ <b>bei Trächtigkeit:</b> PAG nachweisbar
	3. Beprobung:	○ Ein weiterer Anstieg der PAG-Werte weist auf Fortbestand der Gravidität hin; ein Abfall der PAG-Konzentrationen ist ein Hinweis auf embryonalen Fruchttod.
<b>C</b>	1. Beprobung:	○ PAG deutlich nachweisbar
	2. Beprobung:	○ bei Nichtträchtigkeit: PAG aus letzter Gravidität abgefallen aber noch nachweisbar ○ bei Trächtigkeit: PAG-Werte aus letzter Trächtigkeit addieren sich mit PAG aus neuer Gravidität.
	3. Beprobung:	○ Ein weiterer Anstieg der PAG-Werte weist auf Fortbestand der Gravidität hin; ein Abfall der PAG-Konzentrationen ist ein Hinweis auf embryonalen Fruchttod.

Mittels der durchgeführten Untersuchungen sollten diese hypothetischen Konstellationen überprüft werden.

### **3.1.2 Tierkollektiv 2 (TK 2)**

Weitere Untersuchungen wurden in Klein- und Mittelbetrieben im Gießener Umland in Zusammenarbeit mit der Tierärztlichen Ambulanz der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, durchgeführt.

Es wurden insgesamt 197 zur KB anstehende Kühe und Färsen in die Untersuchungen aufgenommen. Am Tag der KB wurde zur Kontrolle des KB-Zeitpunktes eine Progesteron-Bestimmung durchgeführt, wozu bei den Kühen eine Milchprobe und bei den Färsen eine Blutprobe entnommen wurde. Sofern das Tier bis zum 29./30./31. Tag nach der KB nicht umgerindert hatte, wurde eine Blutprobe zur Bestimmung der PAG-Konzentration entnommen. Durch die Mitarbeiter der Ambulanz erfolgte eine abschließende Trächtigkeitsdiagnose mittels transrektaler Palpation. Im Rahmen dieser Untersuchungen erfolgte keine exakte Zuordnung des KB-Zeitpunktes im Hinblick auf das Abkalbedatum. Generelle Praxis in den durch die Ambulanz betreuten Betrieben ist jedoch, dass nicht vor dem 60. Tag post partum besamt wird.

### **3.1.3 Tierkollektiv 3 (TK 3)**

Um die beiden RIAs (siehe Kapitel 3.3) auch im Bereich höherer PAG-Werte hinsichtlich ihrer Aussagekraft und Vergleichbarkeit zu überprüfen, wurde der Verlauf der PAG-Konzentrationen über die gesamte Gravidität an jeweils sechs Kühen und einer Färse der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik, Justus-Liebig Universität Gießen, erfasst.

Die Blutprobenentnahmen erfolgten vom 30. – 42. Tag im zweitägigen, bis zum 140. Tag im einwöchigen und danach im dreiwöchigen Intervall bis zum 245. Trächtigkeitstag.

## **3.2 Blutproben- und Milchprobenentnahme**

Die Blutprobenentnahme erfolgte aus der Vena bzw. Arteria coccygea media. Es wurden 9 ml EDTA-Monovetten verwendet. Die gewonnenen Blutproben wurden unverzüglich bei 1500 g, 15 min lang zentrifugiert, der Plasmaüberstand in 3 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und bei –20 °C gelagert. Die Milchproben wurden in 13 ml Polypropylen-Probenröhrchen eingemolken und eine Dichromattablette zur Konservierung zugesetzt. Die Proben wurden dann bei –20 °C eingefroren.



### 3.3 RIAs (Radioimmunoassays) zur Bestimmung von PAG im Blutplasma

Zur Anwendung kamen zwei, von der Arbeitsgruppe Beckers, Liege, entwickelte RIAs:

- **boPAG1-RIA497 (RIA497)**  
(Zoli et al., 1992b), der in Liege routinemäßig zum Einsatz kommt.
- **boPAG1-RIA706 (RIA706)**  
(Perenyi et al., 2002a; 2002b; Ayad et al., 2007; 2008),  
siehe auch Kapitel 2.3.3.2.10.

Alle im Rahmen dieser Untersuchungen gewonnenen Blutproben wurden in diesen zwei unterschiedlichen RIA-Systemen gemessen.

Die Einarbeitung in die Verfahrensweise des Tests erfolgte in Professor J.-F. Beckers Labor für Reproduktionsphysiologie, Fakultät der Veterinärmedizin der Universität Liege, Belgien (Labor Beckers). Alle PAG-spezifischen Reagenzien zur Etablierung und Durchführung der beiden RIAs in Gießen wurden von diesem Labor zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um:

- **aufgereinigtes boPAG1, lyophilisiert**
- **Qualitätskontrollen (QCs): QC 1 und 2 (jeweils 1,1 ng/ml); QC 3 (2,1 ng/ml)**
- **PAG-freies Serum**
- **Standard-Ausgangslösung (25 ng/ml)**
- **gegen boPAG1 gerichtetes, polyklonales Antiserum (PAG-Antiserum 497-Vorverdünnung)**
- **gegen caPAG<sub>55+62 kDa</sub> gerichtetes, polyklonales Antiserum (PAG-Antiserum 706-Vorverdünnung)**
- **Schaf anti-Kaninchen IgG, lyophilisiert (2. Antikörper)**

Genaue Angaben zu den verwendeten Probengefäßen, Geräten, Reagenzien, Chemikalien und deren Lagerung finden sich in Kapitel 3.7 – 3.8.

### 3.3.1 Prinzip, Durchführung und Auswertung von boPAG1-RIA497 (RIA497) und boPAG1-RIA706 (RIA706)

Bei den eingesetzten RIAs handelte es sich um kompetitive Sequenztests (Strecker et al., 1979), die sich nur hinsichtlich des eingesetzten Antiserums unterschieden und ansonsten nach demselben Schema durchgeführt wurden.

Mit  $^{125}\text{J}$  markiertes boPAG1 (boPAG1-Tracer) konkurriert dabei mit nicht markiertem boPAG aus Standard bzw. aus zu untersuchender Probe um die Bindungsstellen am Antikörper. Mittels Zugabe des 2. Antikörper-Polyethylenglykol(PEG)-Gemisches wird die Fällung des Antikörper-gebundenen PAGs induziert und damit eine Trennung vom freien, gelösten PAG erreicht. Nach Zentrifugation und Waschung wird die ungebundene Fraktion (Überstand) entfernt und die gebundene Fraktion (Präzipitat am Boden des Röhrchens) im  $\gamma$ -Counter gemessen. Da ab dem 80. Tag der Trächtigkeit PAG-Konzentrationen oberhalb der eingesetzten Standard-Kurve zu erwarten waren, wurden die Proben des TK 3 ab diesem Trächtigkeitsstadium mit PAG-freiem Bullenserum verdünnt (1:2; 1:4; 1:5; 1:10; 1:20; 1:25; 1:50; 1:100) und erst daraufhin in den RIA eingesetzt (Ayad et al., 2007).

Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt.

Die Auswertung des Tests erfolgte über das an den  $\gamma$ -Counter angeschlossene Rechenprogramm.

Die Bezugsgrößen zur Durchführung dieses Rechenprogramms waren wie folgt:

<b>Totalaktivität (TA):</b>	entspricht der in den Testansatz insgesamt eingebrachten Radioaktivitätsmenge in cpm in Form des radioaktiv markierten Proteins.
<b>nichtspezifische Bindung (NSB):</b>	stellt den Teil der Radioaktivität dar, der bei Abwesenheit des 1. Antikörpers nach Durchführung der Reaktion noch im RIA-Röhrchen gemessen wird.
<b>Bindungsnullwert (Bo):</b>	gibt den Anteil des radioaktiv markierten Proteins an, der bei Abwesenheit des nicht markierten PAGs gebunden wird.
<b>Standard-Proben:</b>	dienen der Erstellung einer Eichkurve. Es wurden 7 Standards verwendet (12,5 ng/ml; 6,25 ng/ml; 3,13 ng/ml; 1,56 ng/ml; 0,78 ng/ml; 0,39 ng/ml; 0,2 ng/ml).

## Material und Methoden

Für die Kurvenanpassung (curve fit) wurde der Mittelwert der Standard-Punktwerte Logit-Log transformiert. Standard-Punkte, die zu weit von der Norm abwichen, wurden mittels Ausreißertest (modifizierter Nalimow-Test) ermittelt und nicht für die Kurve verwendet. Daraufhin wurden die Standard-Punkte – abhängig von Schwankungen zwischen den Replikaten – gewichtet und mittels LCF-Verfahren „gefittet“. Dazu wurde durch lineare, quadratische und kubische Regression jeweils ein curve fit erstellt und der Günstigste von ihnen vom Rechenprogramm als Fit ausgewählt. Die Darstellung der Kurve erfolgte im linear-log-Plot.

Weiterhin wurden bei jedem Test als QCs Proben von tragenden Kühen eingebracht. Drei dieser fünf Kontrollen waren Proben von Tieren, die im Labor Beckers zu einer standardisierten PAG-Konzentration gepoolt worden waren (QC 1 und 2: jeweils 1,1 ng/ml; QC 3: 2,1 ng/ml); die beiden anderen zwei waren von tragenden Kühen der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof gewonnene Proben (QC 4: OH Nr. 323, QC 5: OH Nr. 366), deren PAG-Gehalt sich aus den hier durchgeführten Messungen ergab. Der Testansatz und Inkubationsverlauf ergibt sich aus Tabelle 7.

Tabelle 7: Testansatz von RIA497 bzw. RIA706.

	<b>TA</b>	<b>NSB</b>	<b>Bo</b>	<b>Std<sup>2)</sup></b>	<b>QC</b>	<b>Proben</b>
<b>BSA<sup>1)</sup>-Puffer</b>	–	300 µl	200 µl	100 µl	200 µl	200 µl
<b>Standard-Proben</b>	–	–	–	100 µl	–	–
<b>PAG-freies Serum</b>	–	100 µl	100 µl	100 µl	–	–
<b>QC</b>	–	–	–	–	100 µl	–
<b>Unbekannte Proben</b>	–	–	–	–	–	100 µl
<b>Antiserum-Endverdünnung</b>	–	–	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
	<i>Inkubation über 16 h bei Raumtemperatur</i>					
<b>boPAG1-Tracer</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
	<i>Inkubation über 4 h bei Raumtemperatur</i>					
<b>2. Antikörper-PEG-Gemisch</b>	–	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
	<i>Inkubation über 30 min bei Raumtemperatur</i>					
<b>BSA<sup>1)</sup>-Puffer</b>	–	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
	<i>Zentrifugieren bei 4 °C, 1500 g, 20 min Überstand verwerfen</i>					
<b>BSA<sup>1)</sup>-Puffer</b>	–	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
	<i>Zentrifugieren bei 4 °C, 1500 g, 10 min Überstand verwerfen</i>					
	<i>Messen der <sup>125</sup>J-Impulse im Präzipitat (γ-Counter), 60 sec</i>					

<sup>1)</sup> Bovines Serum Albumin; <sup>2)</sup> Standard-Proben

### 3.3.2 Spezifität der verwendeten Antisera (Antiserum-Spezifität)

Beide Antisera wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen auf ihre Spezifität (Antiserum-Spezifität) untersucht (Zoli et al., 1991; Perenyi et al., 2002a; Ayad et al., 2007). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Kreuzreaktivität unterschiedlicher Substanzen mit den Antisera 497 und 706.

	Keine Kreuzreaktivität		Kreuzreaktivität	
	Antiserum 497	Antiserum 706	Antiserum 497	Antiserum 706
<b>Globuläre Proteine</b>	○ Albumin		–	–
<b>Gonadotropine</b> (Zoli et al., 1991; Ayad et al., 2007):	○ bLH ○ bPL ○ pFSH ○ hCG ○ eCG ○ α1-Fetoprotein ○ SP1	○ hCG ○ eCG	–	–
<b>Kohlenhydrate</b> (Ayad et al., 2007)	○ N-Acetyl-D-Galactosamin ○ N-Acetyl-D-Glucosamin ○ N-Acetyl-Neuraminsäure ○ D-Laktosemonohydrat ○ D-Glucose ○ Methyl-α-D-Mannopyranosid ○ Mannitol ○ D-Galactose		–	–
<b>Aspartasen</b> (Perenyi et al., 2002a)	○ Chymosin ○ Lab ○ Renin ○ Cathepsin D	○ Renin ○ Cathepsin D	○ Pepsinogen ab 1 mg/ml ○ Pepsin ab 1 mg/ml	○ Pepsinogen ab 50 µg/ml ○ Pepsin ab 500 µg/ml ○ Chymosin ab 1 mg/ml ○ Lab ab 1 mg/ml

Da erst bei sehr hohen Enzym- bzw. Proenzym-Konzentrationen Kreuzreaktionen beobachtet werden konnten und diese unter physiologischen Bedingungen im Blut in viel niedrigeren Konzentrationen vorliegen, kann unterstellt werden, dass RIA497 und RIA706 eine ausreichende Antiserum-Spezifität aufweisen (Perenyi et al., 2002a).

### **3.3.3 Herstellung des mit $^{125}\text{J}$ markierten boPAG1 (boPAG1-Tracer)**

#### **3.3.3.1 Prinzipielle Vorgehensweise**

Die Kopplungsreaktion zwischen  $^{125}\text{J}$  und boPAG1 (Jodierung) erfolgte mittels einer im Labor Beckers modifizierten Laktoperoxidase(LPO)-Methode (Marchalonis, 1969; Morrison und Bayse, 1970; Thorell und Johansson, 1971).

boPAG1 besitzt 14 Tyrosinreste. An jedem Tyrosinrest können theoretisch jeweils zwei  $^{125}\text{J}$ -Atome eine Bindung eingehen. Das für die Kopplungsreaktion verwendete radioaktive Jod lag als Jodid ( $^{125}\text{J}^-$ ) vor.  $^{125}\text{J}^-$  selbst ist reaktionsträge (= inert) und musste, um an Tyrosin substituiert werden zu können, zunächst mit Hilfe von als Katalysator fungierender LPO und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oxidiert werden.

Die Trennung des boPAG1-Tracers (an boPAG1 gekoppeltes  $^{125}\text{J}$ ) vom freien  $^{125}\text{J}$  erfolgte auf einer Sephadex G-75-Gelsäule, deren Auftrennungsprinzip auf der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit größerer und kleinerer Partikel basiert. Größere Partikel wie der boPAG1-Tracer werden schneller eluiert als kleinere Partikel wie das freie  $^{125}\text{J}$ , welches durch die Poren der Gelpartikel wandert und damit länger auf der Säule retiniert wird.

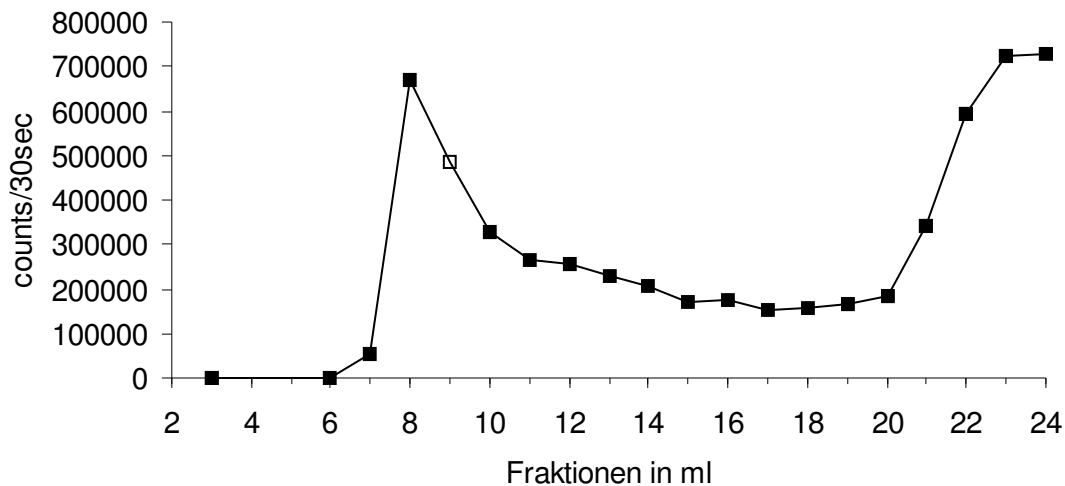
#### **3.3.3.2 Durchführung der Kopplungsreaktion zwischen $^{125}\text{J}$ und boPAG1 (Jodierung) und der Säulenchromatographie**

Am Abend vor der Jodierung wurde die Säule mit Sephadexgel befüllt, das 24 Stunden zuvor angerührt, erhitzt und entgast worden war. Die Gelsäule wurde über Nacht so stehen gelassen, dass ein Überstand von 2 cm Aqua destillata (dest.) über der Säule das Austrocknen verhinderte. Am nächsten Morgen wurde die Säule mit lauwarmem Bovinen Serum Albumin(BSA)-Puffer gespült, um die unspezifischen Bindungsstellen des Gelbettes mit BSA abzusättigen. Kurz vor der Jodierung wurde der überstehende BSA-Puffer abgelassen, 1 ml Tris-Puffer aufgetragen und die flüssige Phase so weit abgelassen, bis der Flüssigkeitsspiegel den oberen Rand des Säulenbettes erreicht hatte.

In das Reaktionsröhrchen, in dem die Jodierungsreaktion stattfinden sollte, wurden 25  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7,66), 10  $\mu\text{l}$  aufgereinigte boPAG1-Lösung, 10  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{J}^-$ -Lösung, 10  $\mu\text{l}$  frisch angesetzte LPO-Lösung und 5  $\mu\text{l}$  einer 0,05 %igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung einpipettiert. Die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  startete die Reaktion. Nach langsamem Voretexen über 1 min und 50 sec wurden erneut 5  $\mu\text{l}$  der 0,05 %igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung in das Reaktionsröhrchen einpipettiert und das Inkubationsgemisch erneut über 1 min

50 sec langsam gevoretext.

Danach wurde das Reaktionsgemisch zügig mittels einer Insulinspritze auf das Gelbett der vorbereiteten Sephadex G-75-Säule übertragen, das Reaktionsröhrchen nochmals mit 0,5 ml Trispuffer gespült und diese Waschlösung ebenfalls auf das Gelbett übertragen. Nach Eindringen des Reaktionsgemisches in das Gelbett wurden weitere 0,5 ml Trispuffer aufgetragen; erst dann wurde die Elution mit BSA-Puffer fortgeführt. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt und am Schulmessplatz (siehe Kapitel 3.7.2) gemessen. Ein typisches Elutionsprofil zeigt Abbildung 5. Im 1. Peak (Proteinpeak) befand sich der boPAG1-Tracer, im 2. Peak (Salzpeak) das freie  $^{125}\text{J}$ . Das Kopplungsprodukt trat frühestens mit der 7. Fraktion in Erscheinung.



**Abbildung 5:** Beispiel einer Elutionskurve nach Auftrag des Reaktionsgemisches (6. Jodierung). Im 1. Peak (Proteinpeak, Fraktion 7 – 12) befand sich das an boPAG1 gekoppelte  $^{125}\text{J}$  (boPAG1-Tracer), im 2. Peak (Salzpeak, ab Fraktion 20) das freie  $^{125}\text{J}$ . Bei dieser Jodierung wurde Fraktion 9 (□) später im RIA als Tracer eingesetzt.

### **3.3.3.3 Tracerauswahl**

Die Fraktionen aus dem Proteinpeak wurden so mit BSA-Puffer verdünnt, dass sich eine Konzentration zwischen 25.000 und 30.000 cpm/100 µl ergab. Danach wurde jede dieser Fraktionen in einem Schnelltest auf ihre Bindungseigenschaften überprüft. Der Ansatz ergab sich wie folgt:

#### **TA:**

- 100 µl verdünnte Fraktion

#### **nichtspezifische Bindung des boPAG1-Tracers (TNSB):**

- 100 µl verdünnte Fraktion
- 400 µl BSA-Puffer

#### **Bindungsnullwert des boPAG1-Tracers (TBo):**

- 100 µl verdünnte Fraktion
- 300 µl BSA-Puffer
- 100 µl Antiserum 497 bzw. 706-Endverdünnung

Nach einer Vorinkubation über Nacht wurde das 2. Antikörper-PEG-Gemisch hinzugegeben, über 30 min inkubiert, das Röhrchen mit 2 ml BSA-Puffer aufgefüllt, bei 1500 g, 4 °C über 20 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, erneut mit 3 ml BSA-Puffer gewaschen, bei 1500 g und 4 °C 10 min zentrifugiert und das Präzipitat im  $\gamma$ -Counter gemessen. Die eluierte Fraktion mit der niedrigsten TNSB (Zielvorstellung: < 5 %) und dem höchsten TBo (Zielvorstellung: > 30 %) wurde für den Einsatz als Tracer im PAG-RIA ausgewählt.

### **3.4 Radioimmunologische Bestimmung von Progesteron im Blutplasma bzw. in der Magermilch**

#### **3.4.1 Prinzip des Progesteron-RIAs**

Der RIA zur Bestimmung von Progesteron wird nach Standard Operation Procedures (SOPs) routinemäßig im hormonanalytischen Labor der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz in Gießen durchgeführt und entspricht dem von Hoffmann und Hamburger (1973) bzw. Hoffmann et al. (1973) beschriebenen Verfahren.

Der Test ist als kompetitiver Gleichgewichtstest (Equilibriumstest) angelegt. Es wurde der Progesteron-Gehalt in Blut bzw. Milch bestimmt.

Es wurden alle Proben (TA, NSB, Bo, Standard, Leerwert (LW), QCs und unbekannte Proben) im Doppelansatz bestimmt.

Es wurden acht Standard-Lösungen verwendet (40, 80, 160, 320, 640, 1280, 1920, 2560 fmol/100 µl). Als Tracer kam [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-Progesteron (Progesteron-Tracer) zur Anwendung.

#### **3.4.2 Antiserum-Spezifität**

Das Antiserum (GI P<sub>4</sub> IV Progesteron-Gießen) stammt aus einer Immunisierung von Kaninchen mit 11αOH-Progesteron-Hemicuccinat-BSA als Antigen aus dem Jahr 1986. Es handelt sich um ein hoch spezifisches Antiserum. Die Kreuzreaktion des Antiserums mit Progesteron beträgt bei Androstendion < 0,01 %, bei Cortisol < 0,01 %, Estradiol-17β < 0,01 %, Estron < 0,01 %, Pregnenolon 0,69 %, 17α-Hydroxyprogesteron 0,49 % und Testosteron 0,37 %. Die Assoziationskonstante liegt bei  $K_A = 3,42 \times 10^9$  l/mol.

#### **3.4.3 Vorbereitung der Milchproben**

Da ein unterschiedlicher Fettgehalt der Milch die Progesteron-Konzentration beeinflusst (siehe Kapitel 2.3.2.1), wurde der Test mit Magermilch durchgeführt. Die durch Abmelken gewonnenen und, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, behandelten Milchproben wurden nach Auftauen im Rotationsmischer für 10 min gut durchgeschwenkt und danach bei 2700 g, 4 °C über 10 min zentrifugiert. Mittels Pasteurpipette wurde der Fettüberstand durchstoßen, die Magermilch in ein 3 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und erneut bei -20 °C eingefroren.



### 3.4.4 Durchführung des Progesteron-RIAs

a) Extraktion der Magermilch- und Blutplasmaproben:

100 µl Probe/Extraktionsröhrchen

2 ml n-Hexan

*Rotationsmischer, auf niedrigster Stufe, 15 min*

*Abzentrifugieren bei 2700 g, Raumtemperatur*

*Abfrieren der wässrigen Phase im Trockeneisbad*

*Dekantieren des Überstands in ein RIA-Teströhrchen*

*Wiederholung des Extraktionsvorgangs*

*Niedertrocknen der gepoolten Extrakte an einem Vortex-Evaporator*

b) Testansatz wie folgt:

	TA	NSB	Bo	Std <sup>1)</sup>	LW <sup>2)</sup>	QCs <sup>2)</sup>	Proben <sup>2)</sup>
<b>Standard-Proben</b>	–	–	–	100 µl	–	–	–
<b>BSA-Phosphat-Puffer</b>	500 µl	500 µl	100 µl	–	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Antiserum GIP<sub>4</sub>IV<sup>3)</sup></b>	–	–	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
<b>Progesteron-Tracer</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

*Schütteln en bloc, 30 sec*

*Wärmeschüttelbad, 37 °C, 20 min*

*Eiswasserbad 0 – 4 °C, mindestens 60 min*

c) Trennung von gebundenem und freiem Progesteron durch Holzkohleabsorption:

<b>Aqua dest.</b>	200 µl	–	–	–	–	–	–
<b>Kohle-Suspension</b>	–	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

*Schütteln en bloc, 30 sec*

*Inkubation in vorgekühlter Zentrifuge, 0 °C, 10 min*

*Zentrifugieren (2200 g, 0 °C, 15 min)*

d) Zählung der <sup>3</sup>H-Impulse in der gebundenen Fraktion:

*Mittels Dispenser-Diluter Abheben von 0,6 ml des Überstandes bei gleichzeitiger Zugabe von 3 ml Szintillatorflüssigkeit und Überführung in 5 ml Polypropylenröhrchen*

<b>Szintillatorflüssigkeit</b>	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
--------------------------------	------	------	------	------	------	------	------

*Schwenken der Polypropylenröhrchen; 10 min warten*

*Messen der <sup>3</sup>H-Impulse im β-Counter bis zu 2 min*

<sup>1)</sup> Standard-Proben <sup>2)</sup> RIA-Röhrchen mit niedertrocknetem Extrakt

<sup>3)</sup> Antiserum GIP<sub>4</sub>IV-Endverdünnung

### **3.4.5 Auswertung der Progesteron-RIAs**

Die Auswertung erfolgte mittels des dem  $\beta$ -Counter angeschlossenen Auswerteprogramms weitgehend analog zur Auswertung der PAG-RIAs (siehe Kapitel 3.3.1). Für die Progesteron-Bestimmung im Plasma ergab sich ein Interassay-Variationskoeffizient (VK) ( $n = 18$ ) von 8,4 % bzw. 6,1 %. Die Bestimmung des Intraassay-VKs für Milchproben ergab nach Auswertung zweier biologischer Kontrollproben ( $n = 20$ ) einen Wert von 8,0 % bzw. 11,3 %, der Interassay-VK ( $n = 7$ ) betrug 16,9 % bzw. 6,3 %.

### **3.5 Untersuchungsgang der TRUS (transrektalen Ultraschalluntersuchung) zur Trächtigkeitsdiagnostik**

Nach Ausräumen des Mastdarms, ohne dabei unnötig Luft einzubringen, Vorverlagern des Uterus in das Becken und einer manuellen transrektalen Untersuchung der Cervix und des Uterus erfolgte die Untersuchung mittels Ultraschall. Der Schallkopf wurde mit Gleitgel benetzt, unter Handschutz durch den Anus eingeführt und am Rektumbogen nach kranial geschoben. Die Ultraschallsonde wurde dorsal dem Uterus aufgelegt und die beiden Uterushörner durch mäßiges Schwenken nach rechts und links sichtbar gemacht (Kähn, 1997). Beide Hörner wurden von kaudal nach kranial bis in die Spitzen untersucht (Heuwieser und Müller, 2000).

Eine Trächtigkeit wurde diagnostiziert, wenn am 29., 30. bzw. 31. Tag nach der KB eine 10 – 20 mm dicke, sich über das gesamte gravide Uterushorn ausdehnende Fruchtblase mit Pseudoampullen und ein 5 – 12 mm langer Embryo mit Herzaktion sichtbar waren.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte zum größten Teil mithilfe der Arbeitsgruppe Biomathematik des Fachbereichs 10 der Justus-Liebig Universität Gießen.

#### **3.6.1 Zweistichproben-t-Test**

Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde bei vorliegender Normalverteilung und gleicher Standardabweichung (SD) beider Grundgesamtheiten ein unpaarer Zweistichproben t-Test durchgeführt, bei dem die Mittelwerte beider Grundgesamtheiten auf Ungleichheit hin untersucht wurden. Waren die Grundgesamtheiten normalverteilt aber die SD ungleich, wurde ein Welch-Test durchgeführt, bei Nichtvorhandensein einer Normalverteilung der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, ein parameterfreier Test.

Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Mit ihr wird untersucht, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Bei Normalverteilung aller untersuchten Gruppen wurde eine einfaktorielle ANOVA angewendet, sofern eine der Gruppen keine Normalverteilung aufwies, wurde eine parameterfreie ANOVA (Kruskal-Wallis Test) durchgeführt.

#### **3.6.2 Erfassung der Zuverlässigkeitskenndaten (Sensitivität und Spezifität) der beiden RIAs**

Sensitivität und Spezifität sind Parameter, die zur Charakterisierung der Zuverlässigkeit von RIA497 und RIA706 im Hinblick auf deren Anwendung als Trächtigkeitsdiagnostikverfahren abgeleitet wurden.

Die Sensitivität definiert den Anteil der Tiere, die vom Test als „korrekt tragend“ eingestuft werden, die Spezifität den Anteil der Tiere, die als „korrekt nicht tragend“ eingestuft werden (siehe auch Kapitel 2.3).

Die Spezifität kann dabei auch aus der sogenannten Falsch-Positiv-Rate berechnet werden (Falsch-Positiv-Rate = 1 – Spezifität). Diese entspricht dem Anteil der als „nicht korrekt tragend“ diagnostizierten Tiere.

Entscheidend für den Erhalt dieser Parameter ist dabei der cut off-Punkt (Grenzwert), der die untersuchten Tiere in „tragend“ und „nicht tragend“ einteilt. Alle Tiere, deren PAG-Werte unter diesem cut off-Punkt liegen, gelten als „nicht tragend“, alle Tiere, deren PAG-Werte über diesem Grenzwert liegen, als „tragend“. Der cut off-Punkt

stellt einen veränderbaren Parameter dar. Wird er herabgesetzt, erhöht sich der Anteil der als „tragend“ diagnostizierten Tiere, wird er heraufgesetzt, sinkt dieser. Durch Vergleich mit den Ergebnissen eines bekannt sicheren Trächtigkeitsdiagnostikverfahrens (transrektale Palpation bzw. TRUS) werden die für jeden möglichen cut off-Punkt erhaltenen Aussagen „tragend“ bzw. „nicht tragend“ schließlich auf ihre Korrektheit hin überprüft.

Bei einem niedrigen cut off-Punkt ist zu erwarten, dass zwar alle tragenden Tiere vom RIA als „korrekt tragend“ erkannt werden (hohe Sensitivität), jedoch auch, dass viele Tiere vom RIA als „nicht korrekt tragend“ (hohe Falsch-Positiv-Rate) bzw. wenige Tiere als „korrekt nicht tragend“ beurteilt werden (niedrige Spezifität). Bei einem hohen cut off-Punkt ist hingegen eine eher niedrige Sensitivität zusammen mit einer niedrigen Falsch-Positiv-Rate bzw. hohen Spezifität zu erwarten.

Ein geeigneter cut off-Punkt für die jeweiligen PAG-RIAs wurde mithilfe eines Receiver Operating Characteristic(ROC)-Analyse-Programms ermittelt (DeLong et al., 1988). Das Programm berechnete für jeden möglichen cut off-Punkt die dazugehörige Sensitivität und Falsch-Positiv-Rate, indem es die PAG-Werte der Tiere, die über dem jeweiligen Grenzwert lagen („tragend“), jeweils mit den Ergebnissen des bekannt sicheren Trächtigkeitsdiagnostikverfahrens verglich (Überprüfung der Aussage „tragend“ auf Korrektheit). Daraus wurde dann für den jeweiligen cut-off-Punkt der Anteil der Tiere, die vom RIA als „korrekt tragend“ eingestuft wurden (Sensitivität), und der Anteil der Tiere, die vom RIA als „nicht korrekt tragend“ eingestuft wurden (Falsch-Positiv-Rate), berechnet. Trägt man nun für jeden möglichen cut off-Punkt das zugehörige Wertepaar Sensitivität und Falsch-Positiv-Rate in ein Koordinatensystem ein, wobei die Sensitivität der Ordinate und die Falsch-Positiv-Rate ( $1 - \text{Spezifität}$ ) der Abszisse entspricht, so erhält man bei hoher Zuverlässigkeit des RIAs eine ROC-Kurve mit einem steilen Anstieg. Ein niedriger cut off-Punkt ist dabei in der oberen rechten Hälfte des Diagramms, ein hoher cut off-Punkt dementsprechend in der unteren linken Hälfte des Diagramms zu finden (siehe Abbildung 6).

Wenn ein Test keine 100 %ige Sensitivität bzw. Spezifität verlangt, also beide Parameter gleichgewichtet werden, ist der PAG-Wert, der im Koordinatensystem am weitesten von der Winkelhalbierenden entfernt ist, als cut off-Punkt auszuwählen.

## Material und Methoden

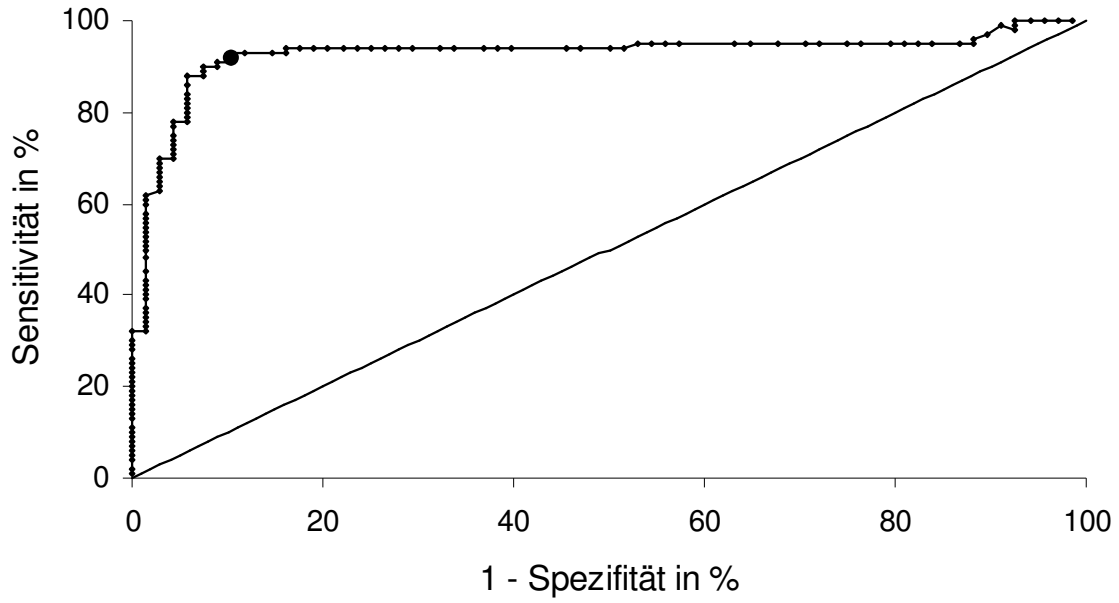


Abbildung 6: Beispiel einer ROC-Kurve. Der große Punkt gibt den PAG-Wert wieder, der am weitesten von der Winkelhalbierenden (Gerade) entfernt ist und damit das günstigste Wertepaar „Sensitivität/Falsch-Positiv-Rate“ besitzt. Dieser PAG-Wert dient als cut off-Punkt.

### 3.7 Gerätschaften

#### 3.7.1 Probengefäße

Blutproben:	EDTA-MONOVETTEN, 9 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Milchproben:	POLYPROPYLENRÖHRCHEN, 13 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Plasma bzw. Magermilch:	POLYPROPYLENRÖHRCHEN, 3 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
PAG-RIA:	POLYSTYROLRÖHRCHEN, 3 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Progesteron-RIA Extraktion:	SCHRAUBGLÄSER, 13ml (Wheaton, Millville, USA)
Progesteron-RIA Teströhrchen:	GLASRÖHRCHEN 75 x 11,5 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Progesteron-RIA:	POLYPROPYLENRÖHRCHEN Mini 2000, 5 ml (Zinsser Analytic, Frankfurt)

#### 3.7.2 Gerätschaften zur Herstellung des boPAG1-Tracers

GLASSÄULE (32 cm x 1 cm) Konisch ausgezogen, Auslauf Ø 2 mm (Sonderanfertigung MAGV, Rabenau)	Als Fritte diente mit Aqua dest. angefeuchtete Glaswolle; der Auslauf wurde mittels eines aufgesetzten Polyurethanschlauches und einer Arterienklemme reguliert.
SAUGFLASCHE ERLÉNMEYERKOLBEN Duran 50, 250 ml (Schott & Gen, Mainz)	zum Entgasen des Gels mit Hilfe einer Saugpumpe
SAUGPUMPE DDA-V153-BN (Gast; USA)	zur Herstellung eines Vakuums in der Saugflasche
MAGNETRÜHRER COMBIMAG RCT (IKA, Staufen)	zum Erhitzen des Sephadexgels
SCHULMESSPLATZ LB 2010 mit $^3\text{NaJ}$ -Sonde  Distanz 10 cm, Silena Varro, Nettopeakfläche 20 – 40 keV (Berthold, Bad Wildbad)	Da die Radioaktivität der Elutionsfraktionen so hoch war und dadurch die Fraktionen im $\gamma$ -Counter nicht messbar waren, wurden diese am Schulmessplatz gemessen.

### 3.7.3 Sonstige Geräte

---

ULTRASCHALLGERÄT Tringa Linear mit Linearschallkopf (5 – 10 MHz)  
(Esaote Pie Medical, Maastricht)

---

ZENTRIFUGE Varifuge K  
(Heraeus Christ, Hanau)

---

PH-METER inoLab mit pH-Elektrode SenTix21  
(WTW, Weilheim)

---

WAAGE LabStyle3002  
(Mettler-Toledo, Gießen)

---

FEINWAAGE AE160  
(Mettler-Toledo, Gießen)

---

ROTATIONSMISCHER  
(Heidolph, Schwabach)

---

VORTEX-EVAPORATOR MicroDancer  
(Zinsser Analytic, Frankfurt)

---

WÄRMESCHÜTTELBAD  
(GFL, Burgwedel)

---

VORTEXER REAX 2000  
(Heidolph, Schwabach)

---

DISPENSER MicroLab500 series  
(Hamilton, Höchst)

---

$\beta$ -COUNTER (Flüssigkeitsszintillationszähler LS 5000 TD)  
(Beckman, Krefeld)

---

$\gamma$ -COUNTER (Multi-Kristall- $\gamma$ -Zähler LB 2111)  
(Berthold, Bad Wildbad)

---

### 3.8 Reagenzien und Chemikalien

Soweit nicht besonders vermerkt und wo zutreffend, waren alle Reagenzien und Chemikalien der Qualität pro analysi.

#### 3.8.1 Reagenzien und Chemikalien für die Herstellung des boPAG1-Tracers

SEPHADEXGEL	
Sephadex G-75 Pulver (VWR)	2 g
NaN <sub>3</sub> (Merck)	0,05 g
Aqua dest.	50 ml
TRIS-PUFFER (0,025 M)	
Tris (Roth)	0,3 g
HCl (Fluka, Salzsäure rauchend 37 %)	7 – 8 Tropfen ad pH 7,5
Aqua dest.	100 ml
PHOSPHATPUFFER (0,5 M, pH 7,6)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (Fluka)	15,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka)	1,5 g
Aqua dest.	200 ml
PHOSPHATPUFFER (0,05 M, pH 7,6)	
Phosphatpuffer (0,5 M)	3 ml
Aqua dest.	27 ml
LPO AUS BOVINER MILCH (Sigma)	
L2130-500UN; 066k3798; Suspension in 3,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH ~ 7,0); 2,41 ml; 77 units/mg protein; 2,7 mg protein/ml	
LPO-LÖSUNG	
LPO aus boviner Milch (Sigma)	50 µl
Phosphatpuffer (0,05 M)	1350 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -LÖSUNG (1:60, 0,5 %ig)	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (VWR, 30 %, Suprapur)	10 µl
Aqua dest.	590 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -LÖSUNG (1:500, 0,05 %ig)	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1:60)	10 µl
Aqua dest.	4990 µl
BOPAG1-LÖSUNG	
boPAG1, lyophilisiert	180 µg
Phosphatpuffer (0,5 M)	180 µl



## Material und Methoden

---

$^{125}\text{J}$  (Perkin Elmer)

NEZ033A; 1 mCi/10 $\mu\text{l}$ ; 1 mCi = 37 MBq; in  $10^{-5}$  M NaOH (pH 8 – 11);  
reduktionsmittelfrei; Halbwertszeit 60,14 Tage; 17 Ci (629 GBq/mg)

### 3.8.2 Reagenzien und Chemikalien für die Durchführung von RIA497 bzw. RIA706

---

BSA-PUFFER (0,025 M)

Tris (Roth)	3 g
NaN <sub>3</sub> (Merck)	0,2 g
BSA Fraction V (MP Biomedicals)	1 g
HCl (Fluka, Salzsäure rauchend 37 %)	75–80 Tropfen ad pH 7,5
Aqua dest.	1000 ml

---

ANTISERUM 497-ENDVERDÜNNUNG (1 : 200 000)

Antiserum 497-Vorverdünnung (1 : 20 000) polyklonal, gegen boPAG1 gerichtete Antikörper (Antiserum-Spezifität siehe 0)	1 ml
BSA-Puffer	9 ml

---

ANTISERUM 706-ENDVERDÜNNUNG (1 : 80 000)

Antiserum 706-Vorverdünnung (1 : 5 000) polyklonal, gegen caPAG <sub>55+62 kDa</sub> gerichtete Antikörper (Antiserum-Spezifität siehe 0)	1 ml
BSA-Puffer	15 ml

---

2.ANTIKÖRPER-PEG-GEMISCH

Polyethylenglykol 6000 (VWR)	40 g
BSA Fraction V (MP Biomedicals)	4 g
Cellulose, mikrokristalline (VWR)	0,5 g
2. Antikörper (Schaf anti-Kaninchen IgG, lyophilisiert, lot 20091001)	1 Fläschchen
Aqua dest.	1000 ml

---

### 3.8.3 Reagenzien und Chemikalien für die Durchführung des Progesteron-RIAs

---

DICHROMATTABLETTE

(Merck, Darmstadt)

---

n-HEXAN

(Merck)

---

BSA-PHOSPHAT-PUFFER (pH 7,2; 78,6 mM)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	8,356 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka)	2,686 g
BSA (Sigma, minimum 98%, electrophoresis)	1,000 g
NaN <sub>3</sub> (Merck)	0,325 g
Aqua dest.	1000 ml

---

[1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-PROGESTERON-STAMMLÖSUNG

NET381250UC (Perkin Elmer); 250 µCi (= 9,25 MBq); in 250µl Ethanol;  
96,6 Ci/mmol (= 3,5742 TBq/mmol),  
aufgenommen in 10 ml Methanol, reinst (Merck)

---

PROGESTERON-TRACER

(angestrebte Aktivität: 9 500 cpm/100µl)

<sup>3</sup> H-Progesteron-Stammlösung	90 µl
BSA-Puffer	20 ml

---

ANTISERUM GIP<sub>4</sub>IV PROGESTERON-GIESSEN

polyklonal, gegen 11αOH-Progesteron-Hemicuccinat-BSA gerichtete Antikörper (1986)

---

ANTISERUM GIP<sub>4</sub>IV-ENDVERDÜNNUNG (1:50 000)

Vorverdünnung (1:100)	10 µl Antiserum + 990 µl BSA-Puffer
Endverdünnung (1:50 000)	10 µl Vorverdünnung + 4990 µl BSA

---

KOHLE-SUSPENSION

Norit A	0,5 g
Dextran	0,05 g
Aqua dest.	100 ml

---

SZINTILLATORFLÜSSIGKEIT Aquasafe 300plus

(Zinsser analytic)

---

### 3.8.4 Lagerung der angewendeten Reagenzien und Chemikalien für RIA497 bzw. RIA706

Tabelle 9: Lagerung der Reagenzien und Chemikalien für RIA497 bzw. RIA706.

Raumtemperatur	Kühlschrank (4 °C)	Gefrierfach (-20 °C)
SEPHADEX G-75 PULVER (VWR)	2. ANTIKÖRPER in einem mit Silikonfett abgedichteten Exsikkator gefüllt mit Silicagel	BOPAG1-LÖSUNG (Liege) aufgeteilt in 10 µl Glasfläschchen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (Fluka)	BOPAG1, LYOPHYLISIERT in einem mit Silikonfett abgedichteten Exsikkator gefüllt mit Silicagel	QCs
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka)	BSA-PUFFER	PAG-FREIES SERUM (Liege)
TRIS (Roth)	2. ANTIKÖRPER-PEG-GEMISCH	STANDARDS
NaN <sub>3</sub> (Merck)	ANTISERUM-ENDVERDÜNNUNGEN	ANTISERUM 497-VORVERDÜNNUNG
POLYETHYLENGLYKOL 6000 (VWR)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (VWR)	ANTISERUM 706-VORVERDÜNNUNG
CELLULOSE, MIKROKRISTALLINE (VWR)	LPO (Sigma); lichtgeschützt	
HCL (Fluka)	BSA (Sigma)	
<sup>125</sup> J (Perkin Elmer)		
PHOSPHATPUFFER (0,5M)		

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Auswertung der Methodik

#### 4.1.1 Bei der Herstellung der boPAG1-Tracer erzielte TBo-Werte und im RIA erhaltene Bo-Werte

Trotz der Bereitstellung der RIA-spezifischen Reagenzien durch das Labor Beckers und die dort erfolgte Einarbeitung in die Methodik gestaltete sich die Etablierung der beiden RIAs im hiesigen Labor als problematisch. So wurde ein angestrebter TBo von > 30 % mit den hergestellten boPAG1-Tracern (siehe auch Kapitel 3.3.3.3) nur in einem Fall erreicht. Ab der 9. Tracerherstellung war der TBo so niedrig, dass auf den Einsatz des boPAG1-Tracers im RIA zunächst verzichtet wurde. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die TBo-Werte der boPAG1-Tracer, die nach der im Kapitel 3.3.3 beschriebenen Methode hergestellt wurden, über die Nummern (Nr.) der mit dem jeweiligen boPAG1-Tracer durchgeführten RIAs und über die in diesen Tests erhaltenen mittleren Bo-Werte.

Tabelle 10: TBo-Werte der boPAG1-Tracer und mittlere Bo-Werte der RIAs, die mit dem entsprechenden Tracer durchgeführt wurden.

Nr. der Tracerherstellung	boPAG1-Tracer			mit dem boPAG1-Tracer durchgeführte RIAs		
	Fraktion	TNSB <sup>1)</sup> in %	TBo <sup>1)</sup> in %	RIA-Nr.	mittlerer Bo-Wert der RIAs in %	
					RIA497	RIA706
3	10	3,58	29,31	1. – 4.	21,79	10,50
5	10	3,34	26,16	5. – 18.	19,35	13,73
6	9	4,79	35,16	19. – 28.	25,10	19,24
7	10	2,82	22,65	29. – 33.	17,47	13,55
8	10	3,00	19,64	34. – 35.	–	10,25
9	10	3,70	6,85	Kein RIA	–	–
10	9	2,17	13,31	Kein RIA	–	–
11	8,5	2,38	8,53	Kein RIA	–	–
14	10	3,66	12,04	Kein RIA	–	–
16	10	1,29	7,69	Kein RIA	–	–
21	17	1,48	6,90	Kein RIA	–	–
22	10	2,07	9,37	37. – 39.	15,59	11,27
23	10	1,83	8,43	40. – 42.	14,40	14,10
24	11	1,42	7,32	43. – 46.	13,90	–
25	10	1,78	9,77	47. – 50.	–	11,75

<sup>1)</sup> ohne Zusatz von PAG-freiem Serum (siehe Kapitel 3.3.3.3)

## Ergebnisse

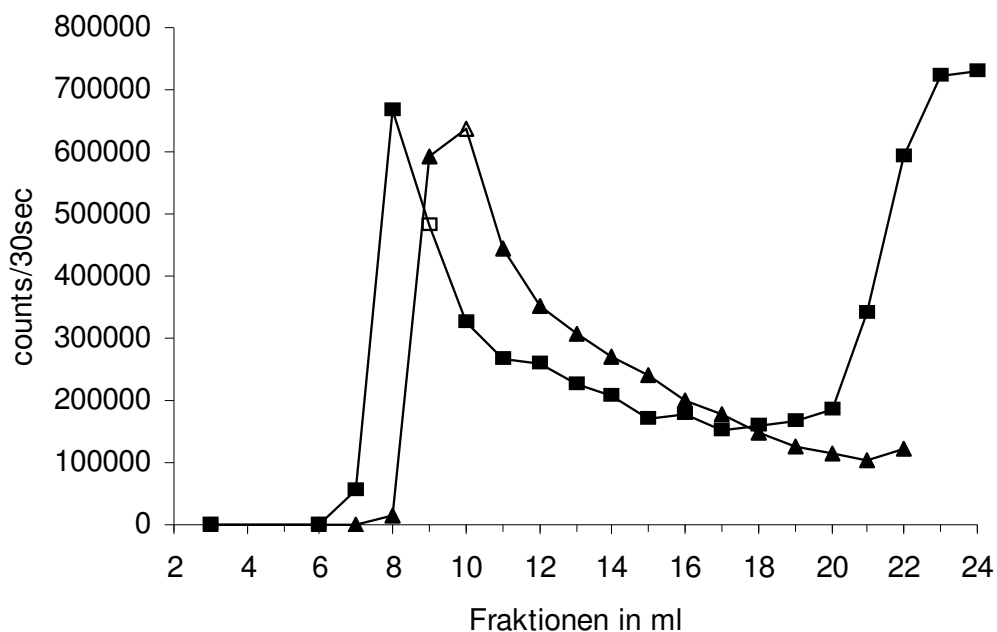
Die Tabelle zeigt, dass die TBo-Werte ab der 9. Tracerherstellung nur noch zwischen 6,85 und 13,31 % lagen. Um Hinweise auf die zu unterstellenden Probleme zu erhalten, wurden deshalb im Verlauf der weiteren Untersuchungen einzelne Schritte der Methodik überprüft.

### 4.1.2 Überprüfung der einzelnen Schritte der Methodik

#### 4.1.2.1 Überprüfung der Herstellung der boPAG1-Tracer

##### 4.1.2.1.1 Vergleich zweier Elutionsprofile

Abbildung 7 zeigt die Elutionsprofile aus zwei Tracerherstellungen (Nr. 6 und 16), bei denen mit 35,16 % bzw. 7,69 % deutlich unterschiedliche maximale TBo-Werte erreicht wurden. Die Area under the curve (AUC) der 6. Tracerherstellung zwischen Fraktion 7 – 12 ergab eine  $AUC_{\blacksquare 7-12}$  von 1 873 750, die AUC der 16. Tracerherstellung zwischen Fraktion 8 – 13 eine  $AUC_{\blacktriangle 8-13}$  von 2 185 760; die Fläche unter dem Proteinpeak ist demnach für beide Elutionsprofile nahezu identisch.



**Abbildung 7:** Vergleich zweier Elutionsprofile bei der Herstellung des boPAG1-Tracers.

■—■ Elutionsprofil der 6. Tracerherstellung, bei dem die 9. Fraktion (□) bei der Tracerauswahl einen TBo von 35,16 % erreichte; ▲—▲ Elutionsprofil der 16. Tracerherstellung, bei dem die 10. Fraktion (Δ) einen TBo-Wert von 7,69 % erreichte.

Eine Proteinfällungsreaktion mit Trichloressigsäure bestätigte, dass 93 % der im Proteinpeak gemessenen Aktivität in gebundener Form vorlag.

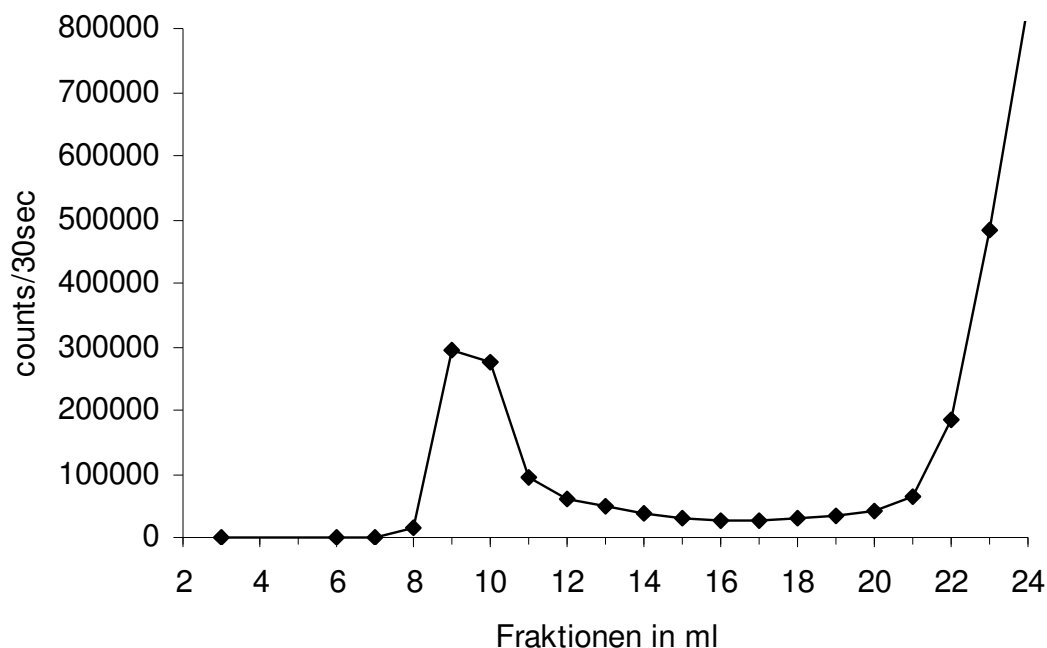
#### 4.1.2.2 Überprüfung der Jodierung

##### 4.1.2.2.1 Reagenzien zur Jodierung

Auch durch Austausch (Neubeschaffung) der Reagenzien LPO und  $H_2O_2$  und strenge Beachtung der Aufbewahrungsvorschriften ergab sich lediglich ein TBo von 12,04 % (14. Jodierung).

##### 4.1.2.2.2 Jodierung ohne Einsatz von boPAG1

Da es sich bei LPO und BSA um Proteine handelt, wurde überprüft, ob und in welchem Ausmaße diese beiden Proteine möglicherweise anstelle bzw. gemeinsam mit boPAG1 jodiert werden und im Proteinpeak erscheinen. Dazu wurde die Tracerherstellung, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, durchgeführt, nur ohne Einsatz von boPAG1. Es war ein Proteinpeak nachweisbar; wie Abbildung 8 zeigt, war die  $AUC_{\text{8-13}}$  mit 755 938 (gemessen von Fraktion 8 – 13) jedoch um ca. zwei Drittel niedriger als mit Zusatz von boPAG1 (siehe Abbildung 7); das Ergebnis lässt erkennen, dass neben boPAG1 auch andere Proteine jodiert wurden.



**Abbildung 8:** Elutionsprofil nach Durchführung einer Jodierung ohne Einsatz von boPAG1. Es sind ein 1. Peak (Proteinpeak) mit an Protein gekoppeltem  $^{125}J$  und ein 2. Peak (Salzpeak) mit freiem  $^{125}J$  darstellbar.

### **4.1.2.2.3 Jodierung mittels Jodogen-Methode nach Chizzonite**

Nachdem bei der Kopplung von  $^{125}\text{J}$  an boPAG1 mittels einer direkt oxidierenden Methode (LPO), gemessen an dem TBo, vielfach unbefriedigende Resultate erzielt wurden, wurde versucht, mit einem ebenfalls schonenden Verfahren, der von Fraker und Speck (1978) entwickelten und nach Chizzonite (1992) modifizierten Jodogen-Methode, einen Tracer herzustellen.

Bei der Jodogenmethode wird ein mit im Wasser unlöslichem Jodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycouril) beschichtetes Pierce-Jodierungsröhrchen (Thermo scientific) zur Oxidierung des  $^{125}\text{J}$  verwendet. Die Beschichtung und die Unlöslichkeit des Jodogens haben den Vorteil, dass durch einfaches Dekantieren die Oxidierungsreaktion terminiert werden kann. Bei der nach Chizzonite (1992) modifizierten Jodogenmethode kommt zudem ausschließlich  $^{125}\text{J}$  in Kontakt mit dem Jodogen und wird nach einer bestimmten Reaktionszeit dem Protein zugeführt, wodurch das Protein zu keiner Zeit Kontakt zum Jodogen hat und somit oxidative Schäden am Protein vermieden werden. Zusätzlich dazu wurde die Kopplungsreaktion mittels Zugabe von Tyrosin abgestoppt.

Zur Überprüfung des Verfahrens wurde zunächst mit  $\beta$ -Ependymin als Protein gearbeitet. Die Jodierung war erfolgreich, die säulenchromatographische Trennung ergab jeweils einen eindeutigen Peak für das Protein-gebundene und für das freie  $^{125}\text{J}$ . Bei derselben Vorgehensweise unter Verwendung von einer neuen Charge boPAG1 als Protein ergab sich zwar ebenfalls ein eindeutiger 1. Peak (Proteinpeak) mit  $^{125}\text{J}$  markiertem Protein, der TBo-Wert lag jedoch nur bei 2,87 %.

### **4.1.2.3 Überprüfung der Säulenchromatographie**

#### **4.1.2.3.1 PD-10 Fertigsäule**

Um Hinweise zu bekommen, ob möglicherweise die angewandte säulenchromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches nach der Jodierung eine Fehlerquelle darstellt, wurde auf Anraten<sup>1)</sup> eine PD-10 Fertigsäule (GE Healthcare) verwendet. Die Säule wurde mit BSA-Puffer abgesättigt und die Kopplungsreaktion, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, durchgeführt. Der TBo-Wert der besten Fraktion lag jedoch bei lediglich 8,49 %. Es wurde daher für die weiteren Versuche vom Einsatz einer Fertigsäule Abstand genommen.

<sup>1)</sup> von Herrn Weigand, wissenschaftlicher Mitarbeiter der ZBB, Gießen.

#### 4.1.2.4 Überprüfung von boPAG1 und der Antisera

Um zu überprüfen, ob die vom Labor Beckers erhaltenen und in Gießen gelagerten RIA-spezifischen Reagenzien eine Qualitätsminderung erfahren hatten, wurden diese wieder in das Labor Beckers verbracht. Dort wurde mit dem aus Gießen rückverbrachten boPAG1 eine Tracerherstellung vorgenommen und der TBo-Wert mit „original“ Antiserum überprüft. Weiterhin wurde der TBo-Wert eines im Labor Beckers hergestellten boPAG1-Tracers mit den aus Gießen rückverbrachten Antisera überprüft. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tabelle 11.

Tabelle 11: Überprüfung des nach Gießen verbrachten und dort gelagerten boPAG1 bzw. Antiserums im Labor Beckers.

		<b>Im Labor Beckers hergestellter boPAG1- Tracer bei Verwendung von im Labor Beckers gelagertem boPAG1</b>	<b>Im Labor Beckers hergestellter boPAG1- Tracer bei Verwendung von aus Gießen rückverbrachtem boPAG1</b>
<b>Antiserum 497</b>  <b>im Labor Beckers gelagert</b>	<b>TA in cpm</b>	24316	24503
	<b>TNSB in %</b>	2,22	3,99
	<b>TBo in %</b>	18,23	11,66
<b>Antiserum 497</b>  <b>aus Gießen rückverbracht</b>	<b>TA in cpm</b>	24604	24561
	<b>TNSB in %</b>	2,31	4,09
	<b>TBo in %</b>	17,99	12,37
<b>Antiserum 706</b>  <b>im Labor Beckers gelagert</b>	<b>TA in cpm</b>	24276	25254
	<b>TNSB in %</b>	2,34	3,9
	<b>TBo in %</b>	19,21	14,27
<b>Antiserum 706</b>  <b>aus Gießen rückverbracht</b>	<b>TA in cpm</b>	24847	25372
	<b>TNSB in %</b>	2,26	3,76
	<b>TBo in %</b>	17,27	12,22



## Ergebnisse

Während sich die im hiesigen Labor gelagerten Antisera bei Inkubation mit im Labor Beckers hergestelltem boPAG1-Tracer von den im Labor Beckers gelagerten Antisera in ihrer Qualität kaum unterschieden, fiel der TBo bei Verwendung des aus Gießen rückverbrachten boPAG1 zur Tracerherstellung deutlich niedriger aus (RIA497: 11,66 %) als der TBo unter Verwendung des im Labor Beckers gelagerten boPAG1 (RIA497: 18,23 %). Allerdings wurde in dieser Versuchsreihe auch mit den im Labor Beckers hergestellten bzw. gelagerten Testreagenzien kein TBo > 30 % erreicht (siehe Kapitel 3.3.3.3).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgende Jodierung neues boPAG1 aus dem Labor Beckers sowie neue H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und neue LPO verwendet. Ebenso wurde für den Testansatz neues Antiserum aus dem Labor Beckers frisch verdünnt und das 2. Antikörper-PEG-Gemisch frisch angesetzt. Trotz dieser Änderungen ergab sich in der nun folgenden Tracerherstellung (16.) bei der Tracerauswahl (siehe Kapitel 3.3.3.3) nur ein TBo von 7,69 %.

In einem weiteren Versuch wurde ein im Labor Beckers hergestellter boPAG1-Tracer, mit dem dort ein TBo-Wert von 30,02 % erreicht worden war, in das hiesige Labor verbracht und mit den weiteren, hier gelagerten Reagenzien der TBo-Wert überprüft. Dieser lag mit 6,90 % weit niedriger als im Labor Beckers. Das wurde als Hinweis interpretiert, dass die Ursache für den niedrigen TBo-Wert möglicherweise bei der Durchführung des RIAs selbst zu finden sei.

## Ergebnisse

### 4.1.2.5 Problemsuche bei Durchführung des RIAs

Die Untersuchungen wurden als eine Screeninguntersuchung mit dem im Labor Beckers hergestellten boPAG1-Tracer durchgeführt. Dabei wurde dem Ansatz erstmals PAG-freies Serum hinzugegeben (siehe auch Kapitel 3.3.3.3). Weiterhin wurden die Inkubationszeiten, Temperaturbedingungen, Anzahl der Waschungen sowie die g-Zahl der Zentrifugation variiert. Tabelle 12 gibt einen Überblick.

**Tabelle 12:** Variationen im Testansatz bei Verwendung des im Labor Beckers hergestellten und ins hiesige Labor überführten boPAG1-Tracers.

	Ansatz als Equilibriumstest <sup>1)</sup>				Ansatz als Sequenztest <sup>2)</sup>			
<b>PAG-freies Serum</b>	–	–	–	+	–	+	+	+
<b>Temperatur Inkubationsdauer (Antiserum + Tracer)</b>	RT <sup>3)</sup> 14 h	4 °C 24 h	4 °C 24 h	RT <sup>3)</sup> 18 h	–	–	–	–
<b>Temperatur Inkubationsdauer Antiserum Inkubationsdauer nach Tracerzugabe</b>	–	–	–	–	RT <sup>3)</sup> 16,5 h 4 h	RT <sup>3)</sup> 16,5 h 4 h	RT <sup>3)</sup> 16,5 h 4 h	RT <sup>3)</sup> 16,5 h 4 h
<b>Inkubation 2. Antikörper- PEG-Gemisch Temperatur Dauer</b>	RT <sup>3)</sup> 30 min	RT <sup>3)</sup> 60 min	RT <sup>3)</sup> 60 min	RT <sup>3)</sup> 60 min	RT <sup>3)</sup> 60 min	RT <sup>3)</sup> 60 min	RT <sup>3)</sup> 30 min	RT <sup>3)</sup> 60 min
<b>Waschungen Temperatur Anzahl</b>	RT <sup>3)</sup> zweimal	RT <sup>3)</sup> einmal	RT <sup>3)</sup> zweimal	RT <sup>3)</sup> zweimal	RT <sup>3)</sup> Zweimal	RT <sup>3)</sup> zweimal	RT <sup>3)</sup> zweimal	RT <sup>3)</sup> zweimal
<b>Abzentrifugation Temperatur g-Zahl</b>	1 °C 1500 g	1 °C 2700 g	1 °C 2700 g	1 °C 2700 g	1 °C 2700 g	10 °C 2700 g	1 °C 2700 g	1 °C 2700 g
<b>TNSB in %</b>	1,48	4,70	1,23	1,54	1,29	1,39	1,49	1,77
<b>TBo in %</b>	6,90	8,00	8,26	17,79	7,56	13,88	12,46	13,80

<sup>1)</sup> Antiserum- und Tracerzugabe gleichzeitig; <sup>2)</sup> Inkubationsdauer Antiserum mit darauffolgender Tracerzugabe; <sup>3)</sup> Raumtemperatur

Wie Tabelle 12 zeigt, hatten die Testansatzmodifikationen bis auf die Zugabe von PAG-freiem Serum keinen Einfluss auf die TBo-Werte. Lediglich der Zusatz von PAG-freiem Serum zum Inkubationsansatz ergab mit 12,46 – 17,79 % höhere TBo-Werte als Ansätze ohne Zusatz (6,90 – 8,26 %). Dieser positive Effekt des Zusatzes von PAG-freiem Serum bestätigte sich in einem Folgeversuch, in dem – unabhängig von der Inkubationsdauer – bei Zusatz von PAG-freiem Serum ein mittlerer TBo-Wert von 23,3 % ± 2,3 % erreicht wurde, ohne Zusatz von PAG-freiem Serum lag er bei 9,4 %.

## Ergebnisse

### 4.1.2.5.1 Überprüfung unterschiedlicher Chargen von PAG-freiem Serum

Nachdem der positive Effekt des Zusatzes von PAG-freiem Serum auf den Bo-Wert gezeigt werden konnte, sollte in einem Folgeversuch der Einfluss unterschiedlicher Chargen von PAG-freiem Serum auf den Bo-Wert untersucht werden.

Tabelle 13: Einfluss unterschiedlicher Chargen von PAG-freiem Serum auf den NSB- und Bo-Wert bei Verwendung der 10. Fraktion der 23. Tracerherstellung als boPAG1-Tracer.

<b>Charge PAG-freies Serum</b>	<b>12.08.09 Färsenpool 1, Liege</b>	<b>10.12.09 Färsenpool 2, Liege</b>	<b>22.04.10 Färsenpool 3, Liege</b>	<b>16.03.10 Bulle Horst, Gießen</b>
<b>Inkubation</b>	18 h	18 h	18 h	18 h
<b>2. Antikörper-PEG-Gemisch</b>	30 min	30 min	30 min	30 min
<b>NSB</b>	3,42 %	1,52 %	2,68 %	3,22 %
<b>Bo</b>	16,75 %	15,24 %	15,83 %	18,04 %

Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen PAG-freien Sera im Hinblick auf den Bo-Wert, der zwischen 15,24 und 18,04 % lag.

#### 4.1.2.5.2 Überprüfung der Bindungseigenschaften der Antisera 497 und 706

Da die Qualität eines Immunoassays in hohem Maße auch von den Bindungseigenschaften (Assoziationskonstante) des verwendeten Antiserums abhängt, sollte in einem Tastversuch auf diese Eigenschaften der beiden zur Verfügung gestellten Antisera geschlossen werden. Dazu wurden die beiden vom Labor Beckers zur Verfügung gestellten Antiserum-Vorverdünnungen (siehe Kapitel 3.8.2) bis zu 1:10 (RIA497) bzw. 1:16 (RIA706) weiterverdünnt und der TBo bei einer konstant bleibenden TA-Menge (29820 cpm) überprüft.

Wie Abbildung 9 zeigt, ergab sich ein mehr oder weniger flacher Anstieg des TBo-Werts; der Übergang in ein Plateau, das bei den beiden Antiserum-Vorverdünnungen auf einen Überschuss an Bindungsstellen hinweisen würde, wurde nicht erreicht.

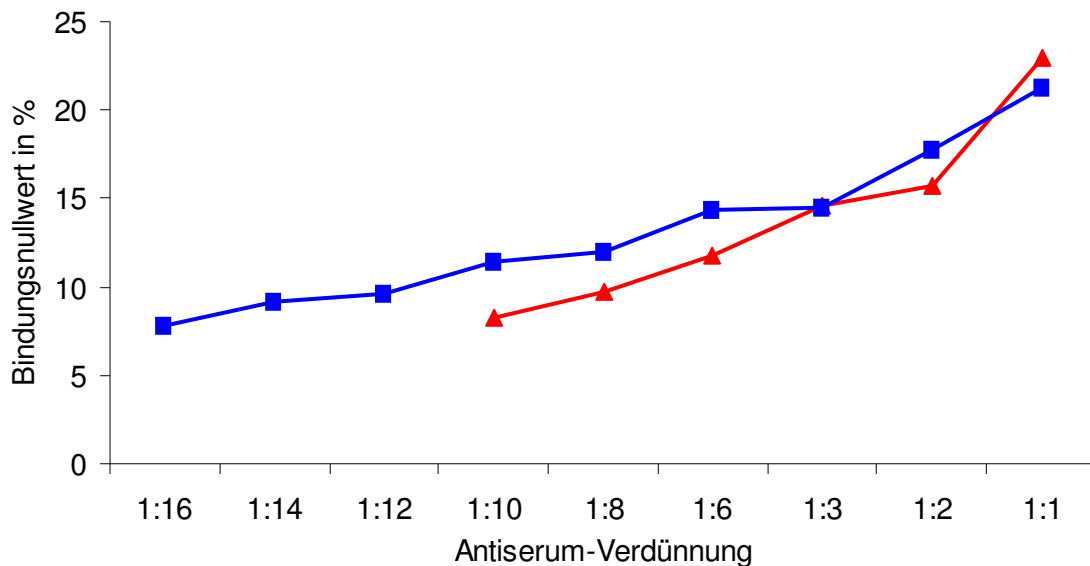


Abbildung 9: Bo-Reihe bei Verwendung des im Labor Beckers hergestellten und ins hiesige Labor überführten boPAG1-Tracers (▲-▲ Antiserum 497; ■-■ Antiserum 706).

### **4.1.3 Ergebnisse der Qualitätskriterien (Interassayvariabilität, Absolute und Relative Bindung) bei der Bestimmung von PAG im Plasma**

Die Probleme, bei einem boPAG1-Tracer einen ausreichend hohen TBo-Wert zu erhalten, traten erst nach Messung der Proben der TK 1 und TK 2 auf. Da das methodische Problem des niedrigen TBo-Werts unlösbar schien, mussten die PAG-Werte bei TK 3 zwangsläufig mit RIAs gemessen werden, die einen nicht zufriedenstellenden Bo-Wert aufwiesen.

Um die beiden Testserien hinsichtlich ihrer Aussagekraft vergleichen zu können, wurden daher die Qualitätskriterien Interassayvariabilität sowie Absolute und Relative Bindung getrennt erstellt, wobei der Relativen Bindung für den Vergleich eine besondere Aussagekraft zukam.

Die Interassayvariabilität wurde anhand der QC-Proben, Absolute und Relative Bindungen anhand der Standard-Kurven-Werte der RIAs bestimmt.

Bei den QC-Proben handelte es sich einmal um Proben aus dem Labor Beckers mit Angaben des dort gemessenen PAG-Gehaltes (QC 1 – 3) sowie um zwei Proben von tragenden Kühen der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof (QC 4 und 5), deren PAG-Gehalt sich aus den hier durchgeführten Messungen ergab (siehe auch Kapitel 3.3.1).

## Ergebnisse

### 4.1.3.1 Qualitätskriterien RIAs TK 1 und TK 2

#### 4.1.3.1.1 RIA497

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 14, 15 und 16 wiedergegeben.

Tabelle 14: TK 1/2 RIA497: Interassayvariabilität gemessen mit QC-Proben.

	QC 1 (n = 8) Labor Beckers 1,1 ng/ml <sup>1)</sup>	QC 2 (n = 6) Labor Beckers 1,1 ng/ml <sup>1)</sup>	QC 3 (n = 14) Labor Beckers 2,1 ng/ml	QC 4 (n = 14) hiesiges Labor	QC 5 (n = 14) hiesiges Labor
Mittelwert (MW)	1,29 ng/ml	0,92 ng/ml	2,76 ng/ml	2,62 ng/ml	4,49 ng/ml
SD	0,12 ng/ml	0,08 ng/ml	0,15 ng/ml	0,14 ng/ml	0,21 ng/ml
VK	9,2 %	8,8 %	5,3 %	5,2 %	4,7 %

<sup>1)</sup> unterschiedliche Chargen aus dem Labor Beckers

Tabelle 15: TK 1/2 RIA497: Absolute Bindung der Standards (n = 14).

	Bo	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 n g/ml	12,5 ng/ml
MW	21,1 %	20,5 %	20,0 %	18,7 %	16,1 %	11,1 %	4,9 %	2,0 %
SD	3,8 %	3,6 %	3,7 %	3,4 %	2,8 %	2,0 %	1,0 %	0,6 %
VK	18,2 %	17,8 %	18,3 %	18,0 %	17,4 %	18,1 %	20,4 %	27,8 %

Tabelle 16: TK 1/2 RIA497: Relative Bindung der Standards (n = 14).

	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 ng/ml	12,5 ng/ml
MW	97,4 %	95,0 %	88,7 %	76,5 %	53,1 %	23,4 %	9,7 %
SD	1,6 %	2,4 %	2,6 %	4,6 %	6,3 %	4,9 %	2,7 %
VK	1,6 %	2,5 %	3,0 %	6,0 %	11,9 %	20,9 %	27,7 %

Tabelle 14 zeigt, dass bei VK-Werten zwischen 5,3 und 9,2 % die im Labor Beckers gemessenen PAG-Konzentrationen mit hinreichender Genauigkeit bestätigt wurden. Für die eigenen QCs ergaben sich VK-Werte von 4,7 und 5,2 %. Aus den Tabellen 15 und 16 ergibt sich, dass die Bindung vom niedrigsten bis zum höchsten Punkt der Standard-Kurve einen konstanten Abfall aufwies. Anders als bei der Absoluten Bindung (siehe Tabelle 15) ergaben sich für die VK-Werte der Relativen Bindung Messwertschwankungen von über 10 % erst ab 3,13 ng/ml (siehe Tabelle 16).

## Ergebnisse

### 4.1.3.1.2 RIA706

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 17, 18 und 19 wiedergegeben.

Tabelle 17: TK 1/2 RIA706: Interassayvariabilität gemessen mit QC-Proben.

	QC 1 (n = 7) Labor Beckers 1,1 ng/ml <sup>1)</sup>	QC 2 (n = 7) Labor Beckers 1,1 ng/ml <sup>1)</sup>	QC 3 (n = 14) Labor Beckers 2,1 ng/ml	QC 4 (n = 14) hiesiges Labor	QC 5 (n = 14) hiesiges Labor
MW	1,34 ng/ml	1,26 ng/ml	2,99 ng/ml	3,51 ng/ml	6,65 ng/ml
SD	0,22 ng/ml	0,12 ng/ml	0,26 ng/ml	0,34 ng/ml	0,78 ng/ml
VK	16,1 %	9,7 %	8,6 %	9,8 %	11,7 %

<sup>1)</sup> unterschiedliche Chargen aus dem Labor Beckers

Tabelle 18: TK 1/2 RIA706: Absolute Bindung der Standards (n = 14).

	Bo	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 ng/ml	12,5 ng/ml
MW	15,9 %	15,1 %	14,7 %	13,5 %	11,5 %	8,4 %	4,4 %	1,8 %
SD	2,9 %	2,6 %	2,6 %	2,4 %	1,9 %	1,4 %	0,6 %	0,4 %
VK	18,0 %	17,4 %	17,6 %	18,1 %	16,6 %	16,4 %	14,7 %	21,5 %

Tabelle 19: TK 1/2 RIA706: Relative Bindung der Standards (n = 14).

	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 ng/ml	12,5 ng/ml
MW	95,2 %	92,9 %	85,0 %	72,7 %	53,1 %	27,9 %	11,3 %
SD	1,9 %	1,5 %	2,1 %	2,5 %	2,7 %	2,2 %	2,4 %
VK	2,0 %	1,6 %	2,5 %	3,4 %	5,0 %	8,0 %	21,5 %

Tabelle 17 zeigt, dass die VK-Werte aller QCs zwischen 8,6 % und 16,1 % schwankten und damit höher lagen als die mit RIA497 gemessenen QCs (vergleiche Tabelle 14 mit 17). Dennoch konnten die PAG-Mengen mit noch akzeptabler Genauigkeit wiedergefunden werden. Wie Tabelle 18 und 19 zeigen, wiesen die Bindungen auch im RIA706 vom niedrigsten zum höchsten Standard einen konstanten Abfall auf. Im Gegensatz zum RIA497 wies nur der VK des höchsten Standard-Werts (12,5 ng/ml) eine Messwertschwankung von über 20 % auf, wobei die VK-Werte der Relativen Bindung bis zum Standardkurvenpunkt 6,25 ng/ml bei < 10 % lagen.

## Ergebnisse

### 4.1.3.2 Qualitätskriterien RIAs TK 3 (40. – 49. RIA)

#### 4.1.3.2.1 RIA497

In den Tabellen 20, 21 und 22 sind die von RIA497 erhaltenen Werte zusammengefasst.

Tabelle 20: TK 3 RIA497: Interassayvariabilität gemessen mit QC-Proben (n = 5).

	QC 2 Labor Beckers 1,1 ng/ml	QC 3 Labor Beckers 2,1 ng/ml	QC 4 hiesiges Labor	QC 5 hiesiges Labor
MW	1,61 ng/ml	3,63 ng/ml	3,97 ng/ml	6,11 ng/ml
SD	0,23 ng/ml	0,27 ng/ml	0,61 ng/ml	0,41 ng/ml
VK	14,4 %	7,5 %	15,4 %	6,7 %

Tabelle 21: TK 3 RIA497: Absolute Bindung der Standards (n = 5).

	Bo	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 ng/ml	12,5 ng/ml
MW	13,8 %	13,4 %	13,1 %	12,3 %	10,5 %	7,7 %	3,5 %	1,2 %
SD	0,4 %	0,4 %	0,2 %	0,3 %	0,6 %	0,9 %	0,9 %	0,4 %
VK	2,8 %	2,7 %	1,6 %	2,3 %	5,9 %	12,0 %	25,3 %	38,5 %

Tabelle 22: TK 3 RIA497: Relative Bindung der Standards (n = 5).

	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 ng/ml	12,5 ng/ml
MW	97,0 %	94,0 %	88,8 %	76,3 %	55,9 %	25,2 %	8,4 %
SD	1,1 %	1,9 %	1,5 %	4,5 %	6,8 %	6,6 %	3,3 %
VK	1,1 %	2,1 %	1,7 %	5,9 %	12,2 %	26,1 %	38,5 %

Tabelle 20 zeigt, dass der VK der QCs zwischen 6,7 und 15,4 % schwankte. Allerdings ergab sich eine Überschätzung der QC-Werte um den Faktor 1,35 im Vergleich zu den QC-Werten, wie sie bei TK 1 und TK 2 gemessen worden waren (vergleiche Tabelle 14 und 20).

Die Tabellen 21 und 22 zeigen, dass die Bindung vom niedrigsten zum höchsten Standard einen konstanten Abfall aufwies. Der VK der beiden höchsten Standardwerte (6,25 und 12,5 ng/ml) lag bei über 25 % (Absolute und Relative Bindung).



## Ergebnisse

### 4.1.3.2.2 RIA706

Die Tabellen 23, 24 und 25 geben die bei Anwendung von RIA706 erhaltenen Werte wieder.

Tabelle 23: TK 3 RIA706: Interassayvariabilität gemessen mit QC-Proben (n = 4).

	QC 2 Labor Beckers 1,1 ng/ml	QC 3 Labor Beckers 2,1 ng/ml	QC 4 hiesiges Labor	QC 5 hiesiges Labor
MW	2,38 ng/ml	4,47 ng/ml	6,44 ng/ml	10,05 ng/ml
SD	0,39 ng/ml	0,38 ng/ml	1,28 ng/ml	0,24 ng/ml
VK	16,5 %	8,6 %	19,9 %	2,4 %

Tabelle 24: TK 3 RIA706: Absolute Bindung der Standards (n = 4).

	Bo	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 ng/ml	12,5 ng/ml
MW	12,4 %	11,9 %	11,6 %	11,0 %	9,6 %	7,5 %	4,3 %	1,5 %
SD	1,3 %	1,1 %	1,2 %	0,9 %	0,8 %	0,6 %	0,4 %	0,2 %
VK	10,4 %	9,0 %	10,2 %	8,5 %	8,3 %	7,5 %	8,8 %	14,3 %

Tabelle 25: TK 3 RIA706: Relative Bindung der Standards (n = 4).

	0,20 ng/ml	0,39 ng/ml	0,78 ng/ml	1,56 ng/ml	3,13 ng/ml	6,25 ng/ml	12,5 ng/ml
MW	96,7 %	93,9 %	89,0 %	77,7 %	61,1 %	35,3 %	12,1 %
SD	2,2 %	2,9 %	2,8 %	4,1 %	5,3 %	4,5 %	0,7 %
VK	2,3 %	3,1 %	3,2 %	5,2 %	8,8 %	12,7 %	6,0 %

Tabelle 23 zeigt, dass sich für die Messung der QCs VK-Werte zwischen 2,4 und 19,9 % ergaben. Im Vergleich zu deren Bestimmung bei TK 1 und TK 2 ergab sich eine Überschätzung um den Faktor 1,80 (vergleiche Tabelle 17 und 23).

Aus den Tabellen 24 und 25 ergibt sich, dass die Bindungen vom niedrigsten bis zum höchsten Punkt der Standard-Kurve einen konstanten Abfall aufwiesen und die VK-Werte der einzelnen Bindungen zwischen 7,5 und 14,3 % (Absolute Bindung) bzw. 2,3 und 12,7 % (Relative Bindung) schwankten.

#### 4.1.3.3 Vergleich der Qualitätskriterien aus den Testreihen TK 1 und TK 2 mit TK 3 bei Anwendung von RIA497 und RIA706

Wie bereits in Kapitel 4.1.3.2 erläutert, zeigt sich bei Vergleich beider Testreihen (siehe Tabelle 14 und 20 bzw. 17 und 23), dass die Werte der QC-Proben, die bei den Messungen von TK 3 erhalten wurden, signifikant ( $p < 0,01$ ) höher lagen als die Werte, die bei den Messungen von TK 1 und TK 2 erhalten wurden. Allerdings fiel die Überschätzung bei Anwendung von RIA497 mit einem Faktor von ca. 1,35 deutlich geringer aus als bei Anwendung von RIA706, für den sich ein Faktor von 1,80 ergab. Wie sich aus den Tabellen 15 und 21 sowie 18 und 24 ergibt, sind die Bo-Werte und folglich auch die Absoluten Bindungen der RIAs, die zur Messung der Proben aus TK 3 zur Anwendung kamen, hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) niedriger als bei den RIAs, mit denen die Proben von TK 1 und TK 2 gemessen wurden.

Bei Gegenüberstellung der Relativen Bindungen von TK 1 und TK 2 mit TK 3 in Tabelle 26 zeigt sich jedoch, dass diese bei RIA497 nahezu identisch sind.

Bei RIA706 ergibt sich für die Relativen Bindungen der RIAs, mit denen die Proben des TK 3 gemessen wurden, ein deutlich schwächerer Abfall, wobei sich im oberen Bereich Unterschiede von bis zu 8 % ergeben (Tabelle 26, RIA706, Standard 3,13 ng/ml). Dies erklärt die deutliche Überschätzung der QCs (Faktor 1,80; siehe Kapitel 4.1.3.2.2) bei Anwendung von RIA706 für die Messungen der Proben von TK 3.

Tabelle 26: Gegenüberstellung der Relativen Bindungen von TK 1 und TK 2 mit TK 3 bei Anwendung von RIA497 und RIA706.

	RIA497		RIA706	
	TK 1 und TK 2	TK 3	TK 1 und TK 2	TK 3
<b>Bo</b>	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>0,20 ng/ml</b>	97,4 ± 1,6 %	97,0 ± 1,1 %	95,2 ± 2,0 %	96,7 ± 2,2 %
<b>0,39 ng/ml</b>	95,0 ± 2,4 %	94,0 ± 1,9 %	92,9 ± 1,6 %	93,9 ± 2,9 %
<b>0,78 ng/ml</b>	88,7 ± 2,6 %	88,8 ± 1,5 %	85,0 ± 2,5 %	89,0 ± 2,8 %
<b>1,56 ng/ml</b>	76,5 ± 4,6 %	76,3 ± 4,5 %	72,7 ± 3,4 %	77,7 ± 4,1 %
<b>3,13 ng/ml</b>	53,1 ± 6,3 %	55,9 ± 6,8 %	53,1 ± 5,0 %	61,1 ± 5,3 %
<b>6,25 ng/ml</b>	23,4 ± 4,9 %	25,2 ± 6,6 %	27,9 ± 8,0 %	35,3 ± 4,5 %
<b>12,5 ng/ml</b>	9,7 ± 2,7 %	8,4 ± 3,3 %	11,3 ± 21,5 %	12,1 ± 0,7 %

## Ergebnisse

### 4.2 Ergebnisse bei der Bestimmung von PAG im Blut

#### 4.2.1 PAG-Werte im Verlauf der Trächtigkeit (TK 3)

Es wurden eine Färse und sechs Kühe vom 30. Tag bis zum 245. Tag der Trächtigkeit beprobt und der PAG-Wert dieser Tiere mit RIA497 und RIA706 bestimmt. Abbildung 10 zeigt den Verlauf der PAG-Konzentrationen bis zum 245. Tag, Abbildung 11 den Verlauf bis zum 120. Tag der Gravidität.

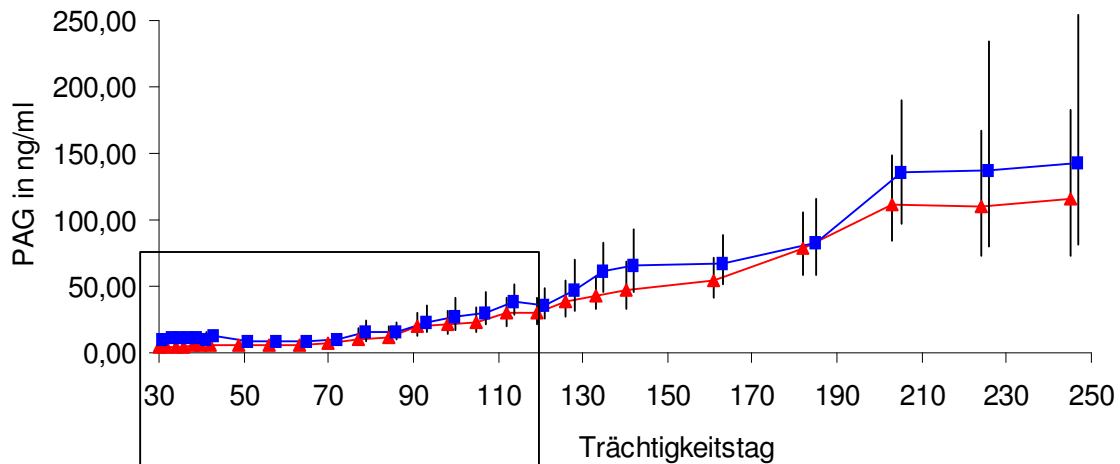


Abbildung 10: Verlauf der PAG-Werte von sechs Kühen und einer Färse im Verlauf der Trächtigkeit (30. – 245. Tag der Trächtigkeit): ▲–▲ RIA497 ■–■ RIA706 (Werte dargestellt als  $x_g \cdot SF^{\pm 1}$ ).

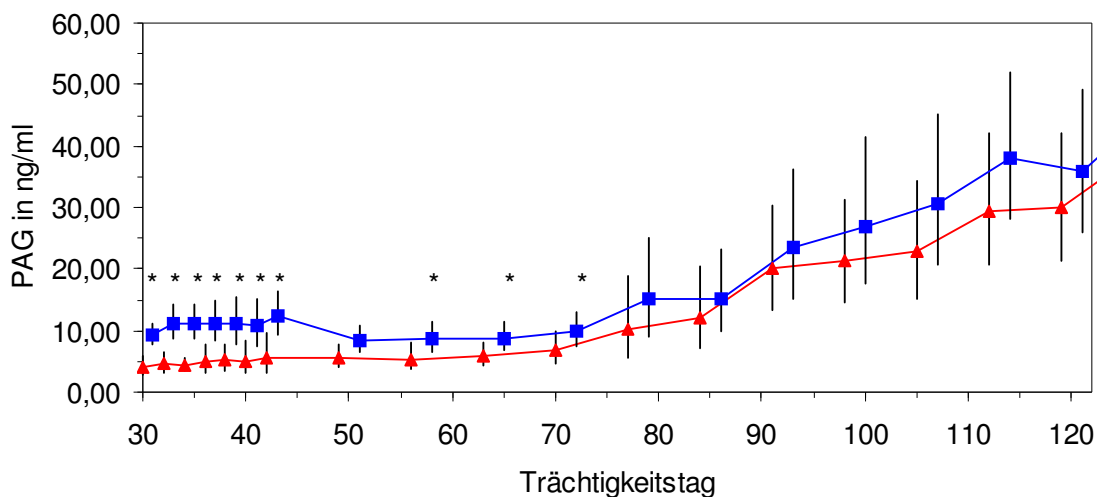


Abbildung 11: Ausschnitt aus Abbildung 10: PAG-Werte im Verlauf der Trächtigkeit (30. – 120. Tag der Trächtigkeit) ▲–▲ RIA497 ■–■ RIA706 (Werte dargestellt als  $x_g \cdot SF^{\pm 1}$ ); \* kennzeichnen signifikante Unterschiede in der PAG-Konzentration zwischen den beiden RIAs.

## Ergebnisse

Wie in Abbildung 10 dargestellt, stiegen die PAG-Konzentrationen vom 30. Tag bis zum 245. Tag der Trächtigkeit von 4,40 ng/ml auf 126,80 ng/ml bei Anwendung von RIA497 bzw. von 9,56 ng/ml auf 165,92 ng/ml bei Anwendung von RIA706 kontinuierlich an. Bei Anwendung von RIA706 ergaben sich generell höhere durchschnittliche PAG-Konzentrationen als bei Anwendung von RIA497. Beide Konzentrationskurven verliefen annähernd parallel. Signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen PAG-Konzentrationen bei Anwendung der beiden RIAs zeigten sich insbesondere zu Beginn der Trächtigkeit (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Unterschiede zwischen den gemessenen PAG-Konzentrationen bei Anwendung von RIA497 und RIA706 (p-Werte).

<b>Trächtigkeitstag</b>	<b>Unterschied (p-Wert)</b>
30	$p \leq 0,001$
32	$p \leq 0,001$
34	$p \leq 0,001$
36	$p \leq 0,001$
38	$p \leq 0,01$
40	$p \leq 0,01$
42	$p \leq 0,01$
49	$p > 0,05$
56	$p \leq 0,01$
63	$p \leq 0,01$
70	$p \leq 0,05$
77 – 245	$p > 0,05$

#### 4.2.2 Erfassung der Elimination von PAG post partum (TK 1)

In den Abbildungen 12 und 13 ist der mit RIA497 bzw. RIA706 gemessene Verlauf der PAG-Konzentrationen post partum dargestellt; dazu wurden die PAG-Werte der Proben, die am Tag der KB entnommen worden waren (1. Beprobung), erfasst (siehe Kapitel 3.1.1).

Die halblogarithmische Darstellung zeigt, dass die Elimination einer Kinetik 1. Ordnung folgt und der Evasionsvorgang aus zwei sich überlappenden Prozessen besteht, einer schnellen und einer langsamen Evasion, die in Form zweier Geraden dargestellt werden kann (Forth et al., 1987).

Darüber hinausgehend wurden die Messwerte einer nicht linearen Regressionsanalyse mit den quantitativen Variablen „PAG-Konzentration am Tag der KB“ und „Tag post partum zum Zeitpunkt der KB“ unterzogen. Daraus ergaben sich für die beiden RIAs folgende, den Eliminationsprozess beschreibende Funktionen:

- **RIA497:  $y = 0,74 + 972,9 e^{-0,08745 t}$**
- **RIA706:  $y = 0,35 + 453,9 e^{-0,07215 t}$**

Dabei entspricht y dem zu erwartenden PAG-Wert am Tag t post partum.

Die Funktionen ergeben eine Exponentialkurve, die auf der Abzisse einem sogenannten Endwert entgegenläuft, der im Falle von RIA497 bei 0,74 ng/ml und im Falle von RIA706 bei 0,35 ng/ml liegt.

Der bei den Färsen zum Zeitpunkt der KB ermittelte PAG-Wert (Hintergrundwert) lag bei 0,66 ng/ml (RIA497) bzw. 0,50 ng/ml (RIA706) und unterschied sich damit praktisch nicht von dem für Kühe ermittelten Endwert.

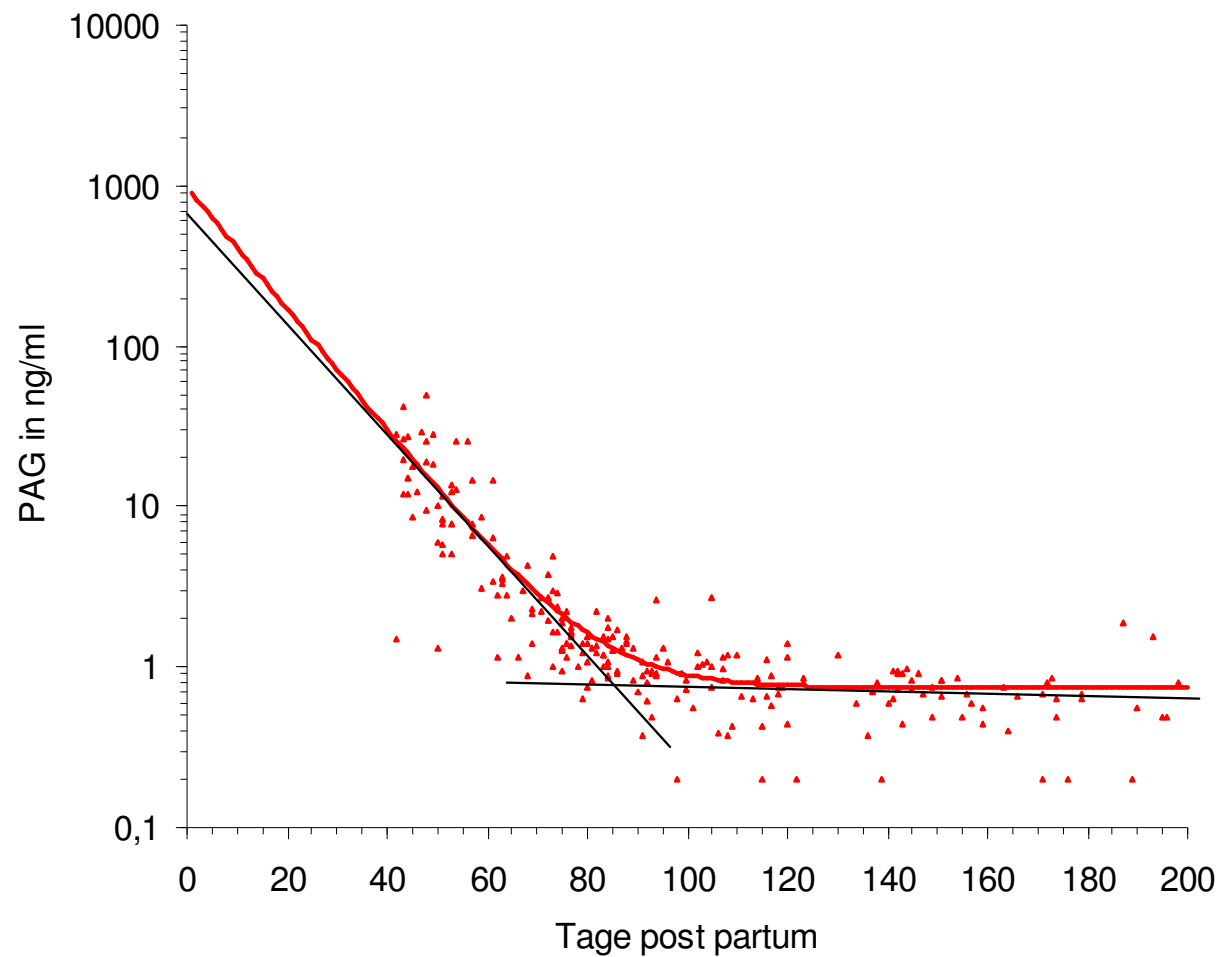
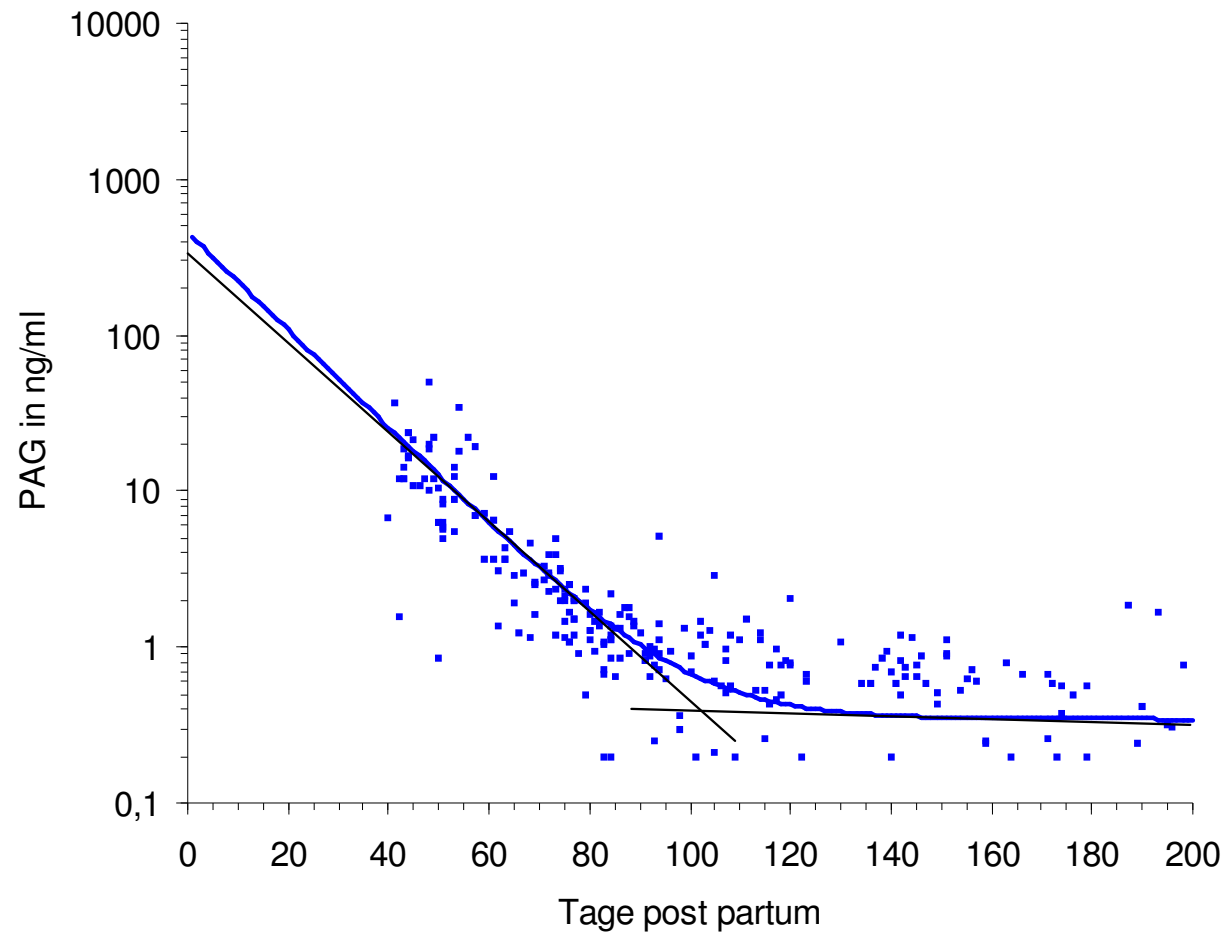


Abbildung 12: Postpartaler Abfall der PAG-Konzentration (RIA497) im maternalen Blut bei 258 Kühen. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte (Punktwolke), schnelle und langsame Evasion (schwarze Geraden) und die aus den Messwerten mittels nicht linearer Regressionsanalyse errechnete Exponentialfunktion  $y = 0,74 + 972,9 e^{-0,08745 t}$  (rote Kurve).



**Abbildung 13:** Postpartaler Abfall der PAG-Konzentration (RIA706) im maternalen Blut bei 258 Kühen. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte (Punktwolke), schnelle und langsame Evasion (schwarze Geraden) und die aus den Messwerten mittels nicht linearer Regressionsanalyse errechnete Exponentialfunktion  $y = 0,35 + 453,9 e^{-0,07215 t}$  (blaue Kurve).

#### 4.2.2.1 Zuordnung der Tiere des TK 1 in die Gruppen A, B und C

Die in Abbildung 12 und 13 durch jeweils zwei Linien dargestellten Geraden der langsamen und schnellen Evasion schneiden sich bei RIA497 bei ca. 85 Tagen und bei RIA706 bei ca. 100 Tagen. Das heißt, dass – auch im Hinblick auf den bei Färsen gemessenen Hintergrundwert – ab diesem Zeitpunkt nicht mehr mit einem gravierenden Absinken der PAG-Werte gerechnet werden kann.

Bei Kühen, die ab dem 91. Tag post partum besamt wurden, steigt also die PAG-Konzentration bei eingetretener Trächtigkeit von der 1. zur 2. Beprobung an, und erhöhte PAG-Konzentrationen ca. 30 Tage nach der KB (2. Beprobung) lassen damit grundsätzlich auf eine Gravidität schließen. Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Zuordnung dieser Kühe zur Gruppe A. Die Kühe, bei denen die PAG-Konzentration bei der 2. Beprobung, ca. 30 Tage nach der KB, bei Nichtträchtigkeit dem Endwert nahe kommen und bei Trächtigkeit eindeutig darüber liegen sollten, werden der Gruppe B zugeordnet. Es handelt sich also um Kühe, die zwischen dem 61. und 90. Tag post partum besamt wurden. Alle früher besamten Kühe bilden die Gruppe C. Die Zuordnung in diese Gruppen zeigt die Übersicht in Tabelle 28.

Tabelle 28: Zuordnung der Kühe und Färsen des TK 1 in Gruppen.

	<b>1. Beprobung (KB)</b>	<b>2. Beprobung (29/30/31 Tage nach der KB)</b>
<b>Gruppe A (Kühe)</b>	> 90 Tage post partum	> 120 Tage post partum
<b>Gruppe B (Kühe)</b>	61 – 90 Tage post partum	91 – 120 Tage post partum
<b>Gruppe C (Kühe)</b>	40 – 60 Tage post partum	70 – 90 Tage post partum
<b>Färsen</b>		

#### 4.2.3 PAG-Werte von als tragend bzw. nicht tragend diagnostizierten Kühen der Gruppen A, B und C sowie der Färsen (TK 1)

Die zum Zeitpunkt der 2. Beprobung ca. 30 Tage nach der KB gemessenen PAG-Konzentrationen sind in den Tabellen 29 und 30 bzw. den Abbildungen 14 und 15 wiedergegeben. Gegenübergestellt sind dabei Werte jener Tiere, bei denen das Ergebnis der TRUS für (+) bzw. gegen (-) eine Gravidität sprach. Zum Vergleich sind zusätzlich die Werte von jenen Tieren aufgeführt, bei denen zwischen den Tagen 70 – 90, 91 – 120 bzw. > 120 Tagen post partum eine 1. Beprobung im Zusammenhang mit der KB (nicht tragend) durchgeführt wurde. Bei den Färsen wurden als Vergleich die PAG-Werte aus der 1. Beprobung herangezogen.

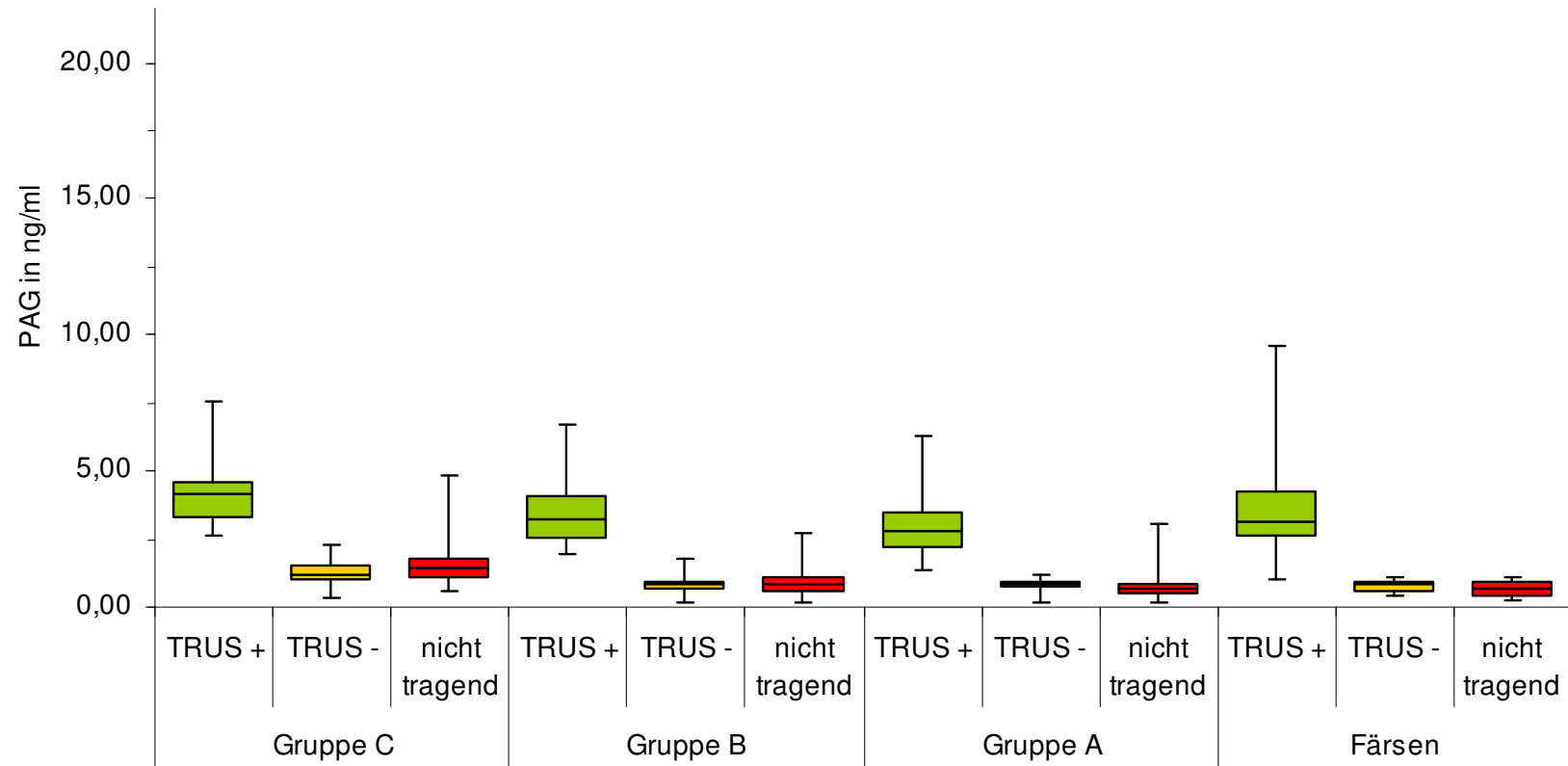


**Tabelle 29:** PAG-Konzentrationen (RIA497) von zum Zeitpunkt der 2. Beprobung als tragend (TRUS+) bzw. nicht tragend (TRUS-) eingestuftten Kühen (Gruppen A, B, C) und Färsen und in denselben postpartalen Zeitraum fallende Werte nicht tragender Tiere zum Zeitpunkt der KB (nicht tragend).

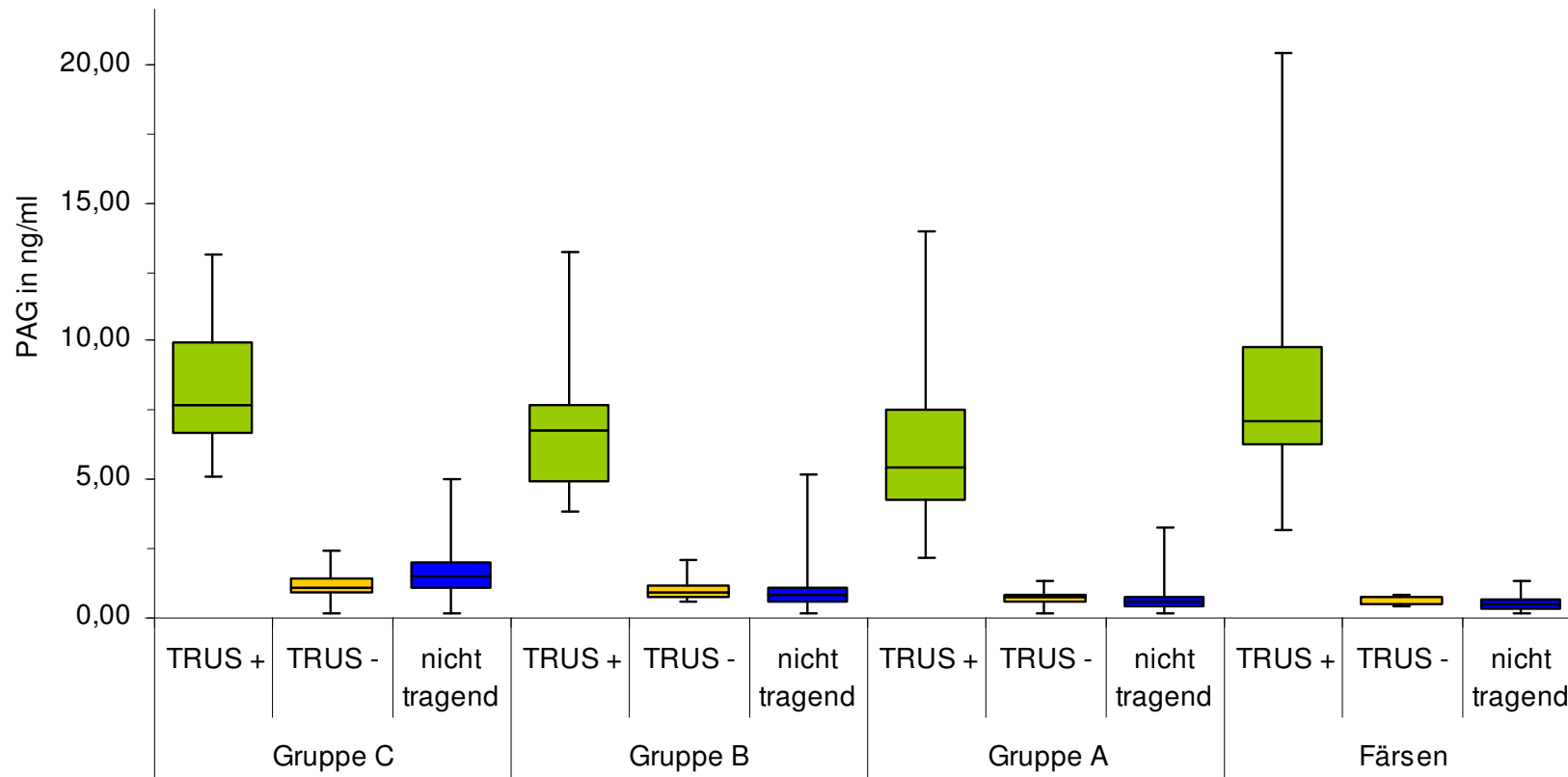
	Gruppe C			Gruppe B			Gruppe A			Färsen		
	TRUS +	TRUS -	nicht tragend	TRUS +	TRUS -	nicht tragend	TRUS +	TRUS -	nicht tragend	TRUS +	TRUS -	nicht tragend
<b>n</b>	18	15	65	26	26	52	54	27	79	28	5	40
<b>Median (ng/ml)</b>	4,13	1,20	1,42	3,26	0,86	0,86	2,82	0,83	0,71	3,18	0,85	0,64
<b>1. Quantil (ng/ml)</b>	3,31	1,01	1,13	2,57	0,70	0,63	2,23	0,73	0,55	2,65	0,59	0,44
<b>3. Quantil (ng/ml)</b>	4,61	1,54	1,75	4,05	0,93	1,07	3,49	0,93	0,84	4,29	0,97	0,90
<b>Minimum (ng/ml)</b>	2,61	0,34	0,63	1,96	0,20	0,20	1,36	0,20	0,18	0,98	0,46	0,24
<b>Maximum (ng/ml)</b>	7,52	2,30	4,85	6,72	1,78	2,75	6,30	1,23	3,07	9,56	1,10	1,10

**Tabelle 30:** PAG-Konzentrationen (RIA706) von zum Zeitpunkt der 2. Beprobung als tragend (TRUS+) bzw. nicht tragend (TRUS-) eingestuftten Kühen (Gruppen A, B, C) und Färsen und in denselben postpartalen Zeitraum fallende Werte nicht tragender Tiere zum Zeitpunkt der KB (nicht tragend).

	Gruppe C			Gruppe B			Gruppe A			Färsen		
	TRUS +	TRUS -	nicht tragend	TRUS +	TRUS -	nicht tragend	TRUS +	TRUS -	nicht tragend	TRUS +	TRUS -	nicht tragend
<b>n</b>	18	15	65	26	26	52	54	27	79	28	5	40
<b>Median (ng/ml)</b>	7,73	1,08	1,48	6,75	0,95	0,82	5,40	0,76	0,59	7,10	0,52	0,50
<b>1. Quantil (ng/ml)</b>	6,71	0,89	1,11	4,91	0,76	0,56	4,28	0,62	0,40	6,24	0,52	0,34
<b>3. Quantil (ng/ml)</b>	9,94	1,46	2,04	7,70	1,16	1,10	7,55	0,84	0,77	9,81	0,73	0,66
<b>Minimum (ng/ml)</b>	5,14	0,20	0,20	3,87	0,56	0,20	2,14	0,20	0,20	3,16	0,40	0,20
<b>Maximum (ng/ml)</b>	13,12	2,39	5,02	13,24	2,07	5,22	13,99	1,30	3,23	20,41	0,80	1,37



**Abbildung 14:** PAG-Werte (RIA497) von zum Zeitpunkt der 2. Beprobung mittels transrektaler Ultraschalluntersuchung als tragend (TRUS+) ■ und nicht tragend (TRUS-) ■ eingestuftem Kühen der Gruppen A, B, C und Färsen sowie PAG-Werte von im selben postpartalen Zeitraum zum Zeitpunkt der KB beprobten Tieren (nicht tragend) ■; Darstellung im Box-Plot: Whisker- = Minimum, Whisker+ = Maximum.



**Abbildung 15:** PAG-Werte (RIA706) von zum Zeitpunkt der 2. Beprobung mittels transrektaler Ultraschalluntersuchung als tragend (TRUS+) ■ und nicht tragend (TRUS-) ■ eingestuftten Kühen der Gruppen A, B, C und Färsen sowie PAG-Werte von im selben postpartalen Zeitraum zum Zeitpunkt der KB beprobten Tieren (nicht tragend) ■; Darstellung im Box-Plot: Whisker- = Minimum, Whisker+ = Maximum.

## Ergebnisse

In Tabelle 31 sind die p-Werte, getrennt für RIA497 und RIA706, bei Vergleich von TRUS+ und TRUS- sowie von TRUS- und nicht tragend beurteilten Tieren (1. Beprobung) dargestellt. Die Tabelle zeigt, dass sich in allen vier Gruppen für beide RIAs mit  $p < 0,0001$  hochsignifikant niedrigere Werte bei den als nicht tragend (TRUS-) im Vergleich zu den als tragend diagnostizierten Tieren (TRUS+) ergaben.

Sofern sich signifikante Unterschiede bei den PAG-Konzentrationen zwischen den mittels TRUS als nicht tragend diagnostizierten Tieren (TRUS-) und den nicht tragenden Tieren (nicht tragend) ergaben, wiesen diese in unterschiedliche Richtungen (TRUS-/nicht tragend: RIA497 1x höher; RIA706 2x höher und 1x niedriger).

Tabelle 31: Unterschiede zwischen den Beobachtungen innerhalb der Gruppen (p-Werte).

Vergleich	RIA497				RIA706			
	Gruppe C	Gruppe B	Gruppe A	Färsen	Gruppe C	Gruppe B	Gruppe A	Färsen
TRUS+/TRUS-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TRUS-/nicht tragend	ns <sup>1)</sup>	ns <sup>1)</sup>	< 0,01	ns <sup>1)</sup>	< 0,05	< 0,05	< 0,01	ns <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> nicht signifikant

In Tabelle 32 ist dargestellt, inwieweit sich signifikante Unterschiede in den PAG-Konzentrationen zwischen den Gruppen bezüglich TRUS+ bzw. TRUS- ergaben. Erwartungsgemäß lagen die PAG-Konzentrationen für TRUS+ bei Gruppe C höher als bei Gruppe A (beide RIAs); bei den Färsen ergaben sich bei Anwendung von RIA706 höhere PAG-Konzentrationen als bei den Kühen der Gruppe A, bei Anwendung von RIA497 zeigte sich eine entsprechende Tendenz. Hinsichtlich TRUS- weisen die gemachten Beobachtungen auf eine fallende Tendenz von Gruppe C über die Gruppen B und A zu den Färsen hin, wobei sich teilweise signifikante Unterschiede ergaben (siehe auch Tabellen 29 und 30).

Tabelle 32: Unterschiede zwischen den Gruppen bezogen auf TRUS+ bzw. TRUS- (p-Werte).

RIA		TRUS+			TRUS-		
		Gruppe B	Gruppe A	Färsen	Gruppe B	Gruppe A	Färsen
RIA497	Gruppe C	ns <sup>1)</sup>	< 0,001	ns <sup>1)</sup>	< 0,05	< 0,01	ns <sup>1)</sup>
RIA706		ns <sup>1)</sup>	< 0,01	ns <sup>1)</sup>	ns <sup>1)</sup>	< 0,05	< 0,05
RIA497	Gruppe B	/	ns <sup>1)</sup>	ns <sup>1)</sup>	/	ns <sup>1)</sup>	ns <sup>1)</sup>
RIA706		/	ns <sup>1)</sup>	ns <sup>1)</sup>	/	ns <sup>1)</sup>	< 0,05
RIA497	Gruppe A	/	/	ns <sup>1)</sup>	/	/	ns <sup>1)</sup>
RIA706		/	/	< 0,001	/	/	ns <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> nicht signifikant

Bei Vergleich der mit RIA497 gemessenen PAG-Werte mit den Werten, die mit RIA706 gemessen wurden, lagen die PAG-Konzentrationen für die als tragend diagnostizierten Färsen und Kühe (TRUS+) bei Anwendung von RIA706 mit  $p = < 0,0001$  signifikant höher als bei Anwendung von RIA497, während sich die PAG-Konzentrationen von den als nicht tragend diagnostizierten Tieren (TRUS-) in den beiden RIAs nicht signifikant unterschieden.

#### **4.2.4 Beurteilung der Zuverlässigkeitskenndaten (Sensitivität, Spezifität) bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik**

Um die Zuverlässigkeit der beiden RIAs im Hinblick auf ihre Eignung zu untersuchen, tragende Tiere von nicht tragenden Tieren richtig unterscheiden zu können, wurden die PAG-Werte der am 29./30./31. Tag nach der KB gewonnenen Blutproben mit den Ergebnissen der am selben Tag durchgeführten TRUS verglichen.

##### **4.2.4.1 Gruppenübergreifende Erfassung aller Kühe und Färsen aus TK 1**

Da die Rest-PAG-Konzentration im Blut, insbesondere bei Kühen der Gruppe C, die früh nach Kalbung zur KB vorgestellt worden waren, als Störgröße angesehen wurde, wurden Färsen und Kühe getrennt ausgewertet.

Die Kühe der Gruppen A, B und C wurden zunächst als eine Gruppe behandelt und die Störgröße „Rest-PAG im Blut“ herausgerechnet. Dazu wurde von dem am 29./30./31. Tag nach der KB gemessenen PAG-Wert (2. Beprobung) der bei nicht trächtigen Kühen zum selben Zeitpunkt nach der Abkalbung ermittelte PAG-Wert subtrahiert. Letzterer wurde aus der mittels nicht linearer Regressionsanalyse errechneten Exponentialfunktion (siehe Kapitel 4.2.2) ermittelt. Mit Hilfe einer ROC-Analyse (siehe Kapitel 3.6.2) wurde für jeden der drei Datensätze (PAG-Werte von Färsen, unkorrigierte und korrigierte PAG-Werte von Kühen), für RIA497 und RIA706, jeweils der cut off-Punkt, Sensitivität und Spezifität berechnet. Die Ergebnisse dieser Berechnungen finden sich für Kühe in Tabelle 33, für Färsen in Tabelle 34 wieder.

## Ergebnisse

**Tabelle 33:** Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei Kühen der Gruppen A, B und C.

	<b>Kühe</b>			
	<b>unkorrigierter PAG-Wert</b>		<b>korrigierter PAG-Wert</b>	
	<b>RIA497</b>	<b>RIA706</b>	<b>RIA497</b>	<b>RIA706</b>
<b>cut off-Punkt in ng/ml</b>	1,50	2,50	0,64	2,11
<b>Sensitivität in %</b>	93,9	92,9	92,9	92,9
<b>Spezifität in %</b>	85,3	94,1	89,7	94,1

**Tabelle 34:** Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei Färsen.

	<b>Färsen</b>	
	<b>RIA497</b>	<b>RIA706</b>
<b>cut off-Punkt in ng/ml</b>	0,98	1,90
<b>Sensitivität in %</b>	97,5	96,6
<b>Spezifität in %</b>	100	100

Wie sich aus Tabelle 33 ergibt, hat das Herausrechnen der Störgröße „Rest-PAG im Blut“ keinen (RIA706) bzw. nur einen sehr geringen Einfluss (RIA497) auf die Parameter Sensitivität und Spezifität. RIA706 ergab mit einer Spezifität von 94,1 % (korrigiert und unkorrigiert) deutlich bessere Werte als RIA497, wo die Werte bei 85,3 % (unkorrigiert) bzw. 89,7 % (korrigiert) lagen. Für die Sensitivität lagen die Werte einheitlich bei ca. 93 %. Für Färsen ergibt sich eine Spezifität von 100 %, die Sensitivität lag für beide RIAs bei ca. 97 % (siehe Tabelle 34).

### 4.2.4.2 Selektive Erfassung der Kühe von Gruppe A und B (TK 1)

Bei der Einengung der ROC-Analyse auf die Gruppen A und B wurde davon ausgegangen, dass bei der Gruppe C trotz des Herausrechnens der Störgröße „Rest-PAG im Blut“ die – wenn auch nicht signifikant – in einem höheren Bereich liegenden Rest-PAG-Konzentrationen (siehe Abbildungen 12 und 13) die Zuverlässigkeit des Tests negativ beeinflussen können. Die Berechnung wurde mit den unkorrigierten Werten der Gruppen A und B durchgeführt. In Tabelle 35 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tabelle 35:** Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei Kühen der Gruppen A und B.

	<b>Kühe der Gruppen A und B: unkorrigierte PAG-Werte</b>	
	<b>RIA497</b>	<b>RIA706</b>
<b>cut off-Punkt in ng/ml</b>	1,50	3,37
<b>Sensitivität in %</b>	94,9	93,7
<b>Spezifität in %</b>	90,9	96,4

## Ergebnisse

Bei Vergleich der Daten aus Tabelle 33 (unkorrigierte PAG-Werte) und Tabelle 35 zeigt sich, dass der cut off-Punkt bei RIA497 auch ohne Einbeziehung der Gruppe C bei einer PAG-Konzentration von 1,50 ng/ml liegt, wohingegen sich der cut off-Punkt bei RIA706 von 2,50 ng/ml auf 3,37 ng/ml erhöht. Die Sensitivität liegt mit 94,9 % (RIA497) bzw. 93,7 % (RIA706) auf einem ähnlich hohen Niveau wie unter Einbeziehung von Gruppe C (RIA497: 93,9 %; RIA706: 92,9 %), während sich die Spezifität ohne Verwendung der Daten von Gruppe C beim RIA497 von 85,3 % auf 90,9 % und beim RIA706 von 94,1 % auf 96,4 % erhöht.

### 4.2.4.3 Übergreifende Erfassung der Färsen und Kühe aus TK 1 (Gruppen A, B) und TK 2

Da bei TK 2 ausschließlich die transrektale Palpation zur Bestätigung einer Gravidität diente, wurde – anders als bei der gruppenübergreifenden Erfassung aller Kühe bzw. Färsen aus TK 1 (siehe Kapitel 4.2.4.1) – der Befund der transrektalen Palpation bei der ROC-Analyse als Zielvariable verwendet.

Analog zur Vorgehensweise in Kapitel 4.2.4.2 wurde auch hier die Gruppe C (TK 1) nicht weiter berücksichtigt, da die Kühe des TK 2, wie in Kapitel 3.1.2 erläutert, nicht vor dem 60. Tag post partum besamt wurden. In die Analyse gingen demnach nur Daten von Tieren ein, bei denen die Störgröße „Rest-PAG im Blut“ zum Zeitpunkt der 2. Beprobung vernachlässigt werden konnte. Das Ergebnis zeigt Tabelle 36.

Tabelle 36: Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei Färsen bzw. Kühen des TK 1 (Gruppe A und B) und TK 2.

	Färsen		Kühe	
	RIA497	RIA706	RIA497	RIA706
<b>cut off-Punkt in ng/ml</b>	0,98	1,98	1,26	2,01
<b>Sensitivität in %</b>	100	100	99,3	99,3
<b>Spezifität in %</b>	100	100	90,6	93,1

Wie aus den Tabellen 34 und 36 ersichtlich ist, ergeben sich für die Färsen nahezu identische cut off-Punkte. Sensitivität und Spezifität liegen bei 100 %.

Bei den Kühen (siehe Tabellen 35 und 36) fällt der cut off-Punkt von 1,50 ng/ml auf 1,26 ng/ml (RIA497) bzw. von 3,37 ng/ml auf 2,01 ng/ml. Die Sensitivität erhöht sich von 94,9 % auf 99,3 % (RIA497) bzw. von 93,7 % auf 99,3 % (RIA706), die Spezifität verändert sich bei Anwendung von RIA497 nicht wesentlich (90,9 % bzw. 90,6 %), bei Anwendung von RIA706 fällt sie von 96,4 % auf 93,1 %.

#### 4.2.5 Vergleich der PAG-Werte von als tragend diagnostizierten Tieren der Tierkollektive TK 1 und TK 2 mit denen von TK 3

Wie in Kapitel 4.1.3.3 dargelegt, unterschieden sich die bei TK 1 und TK 2 zur Anwendung gekommenen RIAs hinsichtlich der analytischen Qualitätskriterien von den RIAs zur Messung der PAG-Konzentrationen von TK 3. Im Hinblick auf diese methodischen Probleme wurde daher überprüft, ob sich die PAG-Werte bei den als tragend diagnostizierten Tieren unterschieden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

Tabelle 37: Unterschiede in den gemessenen PAG-Konzentrationen ( $x_g \pm SF$ ) von als tragend diagnostizierten Tieren aus TK 1/2 und TK 3 bei Anwendung von RIA497 und RIA706.

Trächtigkeitstag	RIA497: PAG in ng/ml			RIA706 PAG in ng/ml		
	TK 3	TK 1/TK 2	Unterschied (p-Wert)	TK 3	TK 1/TK 2	Unterschied (p-Wert)
30	4,08 ± 1,46	3,11 ± 1,58	< 0,05	9,42 ± 1,20	6,50 ± 1,53	< 0,01
38	5,17 ± 1,51	3,22 ± 1,20	< 0,05	11,03 ± 1,41	6,80 ± 1,23	< 0,01
40	5,05 ± 1,63	5,16 ± 1,58	ns <sup>1)</sup>	10,70 ± 1,43	10,08 ± 1,53	ns <sup>1)</sup>
42	5,52 ± 1,74	4,19 ± 1,63	ns <sup>1)</sup>	12,32 ± 1,34	8,54 ± 1,72	ns <sup>1)</sup>
49	5,51 ± 1,39	3,73 ± 1,59	ns <sup>1)</sup>	8,39 ± 1,27	5,94 ± 1,64	ns <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> nicht signifikant

Wie Tabelle 37 zeigt, wurden die PAG-Werte der aus TK 3 stammenden Proben sowohl bei Anwendung von RIA497 als auch bei Anwendung von RIA706 am 30. und 38. Tag leicht überschätzt.

#### 4.2.6 Eintreten einer Gravidität und Progesteron-Wert zum Zeitpunkt der Besamung (KB)

Mithilfe von Messungen des Progesteron-Werts in Proben vom Tag der KB (1. Beprobung) sollte bei den TK 1 und TK 2 der korrekte KB-Zeitpunkt und damit die Qualität der Brunstbeobachtung überprüft werden. Dazu waren bei den Kühen des TK 2 Magermilchproben, bei den Färsen des TK 1 und TK 2 und den Kühen des TK 1 Blutplasmaproben gewonnen worden.

Es wurde dann von einem korrekten KB-Zeitpunkt ausgegangen, wenn die Progesteron-Konzentration in der Magermilch bzw. im Blutplasma unter 0,5 ng/ml lag (Hoffmann et al., 1976).



## Ergebnisse

### 4.2.6.1 Beobachtungen TK 2

Insgesamt standen 24 Färsen und 173 Kühe zur KB an. Wie Tabelle 38 zeigt, wurden dabei zwei Färsen und 12 Kühe zum falschen Zeitpunkt besamt. Für die zum korrekten Zeitpunkt besamten Färsen ergab sich ein Progesteron-Wert im Blutplasma von  $0,22 \pm 0,12$  ng/ml, bei den Kühen lag der Wert in der Magermilch bei  $0,10 \pm 0,08$  ng/ml.

Tabelle 38: TK 2: Beobachtungen bezüglich des Eintretens einer Gravidität bei Färsen bzw. Kühen, deren Progesteron-Wert zum KB-Zeitpunkt oberhalb des Grenzwertes lag.

Tier-Nr. TK 2	Färse/Kuh	Progesteron im Blut bzw. in der Milch zum Zeit- punkt der KB (ng/ml)	erneutes Vorstellen zur KB vor dem 29./30./31. Tag nach der KB	RIA497: PAG 29/30/31 Tage nach der KB (ng/ml)	RIA706: PAG 29/30/31 Tage nach der KB (ng/ml)	Bestäti- gung durch RTU <sup>1)</sup>
A56	Färse	5,17	ja	–	–	–
A179	Färse	3,17	ja	–	–	–
A13	Kuh	3,17	ja	–	–	–
A24	Kuh	0,98	ja	–	–	–
A30	Kuh	0,72	ja	–	–	–
A38	Kuh	2,17	ja	–	–	–
A53	Kuh	1,17	ja	–	–	–
A54	Kuh	0,83	ja	–	–	–
A65	Kuh	0,83	ja	–	–	–
A20	Kuh	4,91	nein	0,70	0,81	RTU-
A77	Kuh	0,81	nein	0,18	0,30	RTU-
A86	Kuh	0,56	nein	0,38	0,75	RTU-
A84	Kuh	0,83	nein	1,51	2,94	RTU+
A137	Kuh	1,91	nein	13,92	14,94	RTU+

<sup>1)</sup> RTU = transrektale Palpation

Wie Tabelle 38 zeigt, wurden von den 14 Tieren, die zum Zeitpunkt der KB einen aktiven Gelbkörper besaßen, zwei Färsen und sieben Kühe vor dem 29./30./31. Tag nach der KB erneut zur KB vorgestellt. Bei drei der fünf nicht wieder vorgestellten Tiere wurde ca. 30 Tage nach der KB in beiden RIAs ein unter dem cut off-Punkt liegender PAG-Wert (RIA497: 1,50 ng/ml; RIA706: 2,50 ng/ml; siehe Tabelle 33) gemessen (A20, A77, A86), und die später durchgeführte transrektale Palpation bestätigte die Diagnose „nicht tragend“.

Bei zwei Kühen lag der PAG-Wert in beiden RIAs ca. 30 Tage nach der KB jedoch deutlich über dem cut off-Punkt. Diese Tiere stellten sich auch bei der später durchgeführten transrektalen Palpation als trächtig heraus. Bei diesen beiden Tieren ist davon auszugehen, dass zumindest Kuh A137 von einer früheren KB tragend gewor-

## Ergebnisse

den ist. Da das Abkalbedatum jedoch nicht bekannt ist, kann diese Vermutung nicht weiter verifiziert werden.

### 4.2.6.2 Beobachtungen TK 1

In TK 1 wurden 36 von 38 Färsen und 230 von 258 Kühen zum korrekten KB-Zeitpunkt besamt (Progesteron-Wert im Plasma: Färsen  $0,14 \pm 0,10$  ng/ml; Kühe  $0,13 \pm 0,09$  ng/ml). Die Progesteron-Werte der nach den gemachten Vorgaben nicht zum korrekten Zeitpunkt besamten zwei Färsen (5,3 %) und 28 Kühe (10,9 %) zeigt Tabelle 39.

Tabelle 39: TK 1: Beobachtungen bezüglich des Eintretens einer Gravidität bei Färsen bzw. Kühen, deren Progesteron-Wert zum KB-Zeitpunkt oberhalb des Grenzwertes lag.

Tier-Nr. TK 1	Gruppenzugehörigkeit	Progesteron im Blut in ng/ml (1. BP <sup>1)</sup> )	erneutes Vorstellen zur KB vor 2.BP <sup>2)</sup>	RIA497: PAG in ng/ml (2.BP <sup>2)</sup> )	RIA706: PAG in ng/ml (2.BP <sup>2)</sup> )	Bestätigung durch TRUS <sup>3)</sup> bzw. RTU <sup>4)</sup>
T76	Färsen	0,51	ja			
T139	Färsen	1,56	nein	0,97	0,80	TRUS-
T6	B	5,08	ja	–	–	–
T40	A	0,91	ja	–	–	–
T66	A	3,99	ja	–	–	–
T99	B	0,75	ja	–	–	–
T127	B	5,99	ja	–	–	–
T135	B	1,66	ja	–	–	–
T194	B	0,82	ja	–	–	–
T197	B	1,48	ja	–	–	–
T203	B	0,92	ja	–	–	–
T217	A	5,13	ja	–	–	–
T218	B	1,44	ja	–	–	–
T236	B	4,66	ja	–	–	–
T266	A	0,78	ja	–	–	–
T268	B	1,03	ja	–	–	–
T271	A	2,72	ja	–	–	–
T275	A	5,04	ja	–	–	–
T282	A	8,28	ja	–	–	–
T56	B	0,97	nein	0,60	0,70	TRUS-
T91	A	2,50	nein	0,93	0,76	TRUS-
T167	A	0,50	nein	0,83	0,94	TRUS-
T179	B	2,33	nein	0,77	1,09	TRUS-
T187	A	4,15	nein	1,15	0,75	TRUS-
T201	B	0,95	nein	0,79	0,74	TRUS-
T225	B	0,52	nein	0,91	0,84	TRUS-
T228	A	7,63	nein	0,82	0,79	TRUS-
T267	A	0,63	nein	0,68	0,54	TRUS-
T69	A	3,61	nein	1,29	1,42	TRUS-/RTU+
T90	B	5,99	nein	6,72	7,58	TRUS+/RTU+

<sup>1)</sup> 1. BP = 1. Beprobung am Tag der KB; <sup>2)</sup> 2. BP = 2. Beprobung 29/30/31 Tage nach der KB

<sup>3)</sup> TRUS = transrektale Ultraschalldiagnostik 29/30/31 Tage nach der KB;

<sup>4)</sup> RTU = transrektale Palpation 49 – 56 Tage nach der KB

## Ergebnisse

Wie Tabelle 39 zeigt, wurden 17 dieser 28 Kühe (60,7 %) und eine Färse innerhalb von 30 Tagen nach der 1. Beprobung erneut zur KB vorgestellt.

Neun der 28 Kühe wurden ca. 30 Tage nach der KB mittels TRUS als nicht tragend beurteilt, wiesen in beiden RIAs unter dem cut off-Punkt (RIA497: 1,50 ng/ml; RIA706: 2,50 ng/ml; siehe Tabelle 33) liegende PAG-Konzentrationen auf und wurden entweder erneut besamt oder bei der transrektalen Palpation 49 – 56 Tage nach der KB für nicht tragend befunden. Zwei Kühe wurden jedoch mittels transrektaler Palpation als tragend diagnostiziert. Die Nachfrage ergab, dass Kuh T69 sechs Tage nach der 1. Beprobung erneut besamt worden war. Somit ist davon auszugehen, dass das Tier von dieser späteren KB tragend wurde. Dies erklärt zum einen den negativen Trächtigkeitsbefund durch die TRUS, da 23 Tage nach der KB eine Trächtigkeitsdiagnose mittels Ultraschall noch nicht sicher möglich ist (siehe Kapitel 2.3.1.2), zum anderen auch den PAG-Wert, der in beiden RIAs unter dem cut off-Punkt ( $< 1,50$  ng/ml bzw.  $< 2,50$  ng/ml; siehe Tabelle 33) lag.

Die Kuh T90 wurde trotz eines hohen Progesteron-Werts im Blut am Tag der KB (5,99 ng/ml) sowohl 30 Tage nach der KB durch TRUS als auch durch eine transrektale Palpation 49 – 56 Tage nach der KB als tragend eingestuft. Bei dieser Kuh wurde bei Anwendung von RIA497 mit 6,72 ng/ml die höchste PAG-Konzentration aller TRUS+ diagnostizierten Kühe der Gruppe B gemessen (siehe Tabelle 29). Es ist daher davon auszugehen, dass dieses Tier von der 23 Tage zuvor stattgefundenen KB tragend geworden war.

#### 4.2.7 Untersuchung auf embryonale Mortalität

##### 4.2.7.1 Erfassung spätembryonaler Mortalität durch mehrmalige Beprobung einer Kuh und Bestimmung von PAG und Progesteron im Blut (TK 3)

Bei einer Kuh des TK 3 konnte anhand des Verlaufs der Progesteron- und PAG-Werte der Eintritt eines spätembryonalen Fruchttodes eindeutig nachgewiesen werden. Wie sich aus dem hohen Progesteron- und PAG-Werten zum Zeitpunkt der 1. Beprobung, 30 Tage nach der 5. KB, ergab (siehe Abbildung 16), war die Kuh zu diesem Zeitpunkt tragend. Ab dem 34. Tag nach der KB sistierte der zu erwartende weitere Anstieg der PAG-Werte, die Werte fielen langsam, aber stetig ab. Zwischen dem 42. und 50. Tag nach der KB konnte ein rapider Progesteron-Abfall festgestellt werden. Die Befunde zeigen, dass in dem vorliegenden Fall der Funktionsverlust des Trophoblasten der Luteolyse vorausging. Die Kuh wurde 63 Tage nach der 5. KB erneut be-samt, der Verlauf der PAG- und Progesteron-Werte zeigt, dass erneut eine Gravidität eintrat.

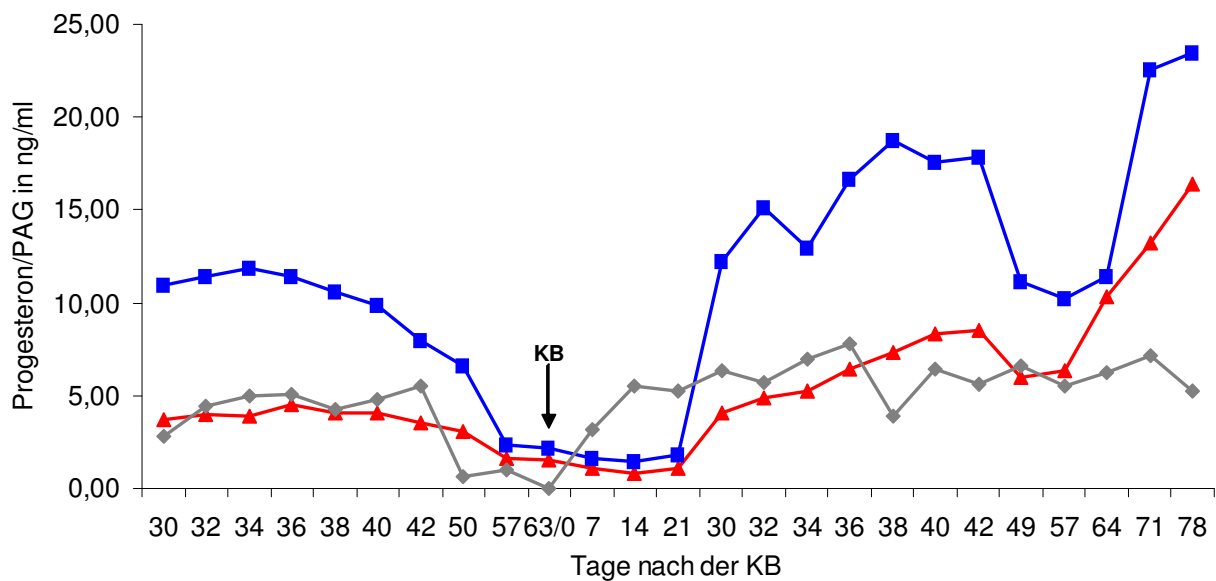


Abbildung 16: Nachweis embryonalen Fruchttodes bei einer Kuh.

▲—▲ = PAG in ng/ml (RIA497); ■—■ = PAG in ng/ml (RIA706);  
 ◆—◆ = Progesteron in ng/ml.

**4.2.7.2 Nachweis von embryonaler Mortalität anhand einer zweimaligen Beprobung und Messung von PAG sowie Feststellung der Trächtigkeit/Nichtträchtigkeit mittels TRUS (transrektaler Ultraschalluntersuchung) bzw. transrektaler Palpation (TK 1)**

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, sollten durch die Beprobungen am 29./30./31. Tag nach der KB (2. Beprobung) sowie zwischen den Tagen 39 – 53 nach der KB (3. Beprobung) Hinweise auf einen nach der 2. Beprobung eingetretenen spätembryonalen Fruchttod erhalten werden.

Von einer solchen Situation wurde dann ausgegangen, wenn bei der 2. Beprobung sowohl der PAG-Wert als auch der Ultraschallbefund für eine Trächtigkeit sprachen, bei der 3. Beprobung die PAG-Konzentration jedoch deutlich abgefallen war.

In vorliegender Arbeit wurde diese auf der PAG-Analytik basierende Diagnose dann als korrekt gewertet, wenn die transrektale Palpation zwischen dem 49. und 56. Tag nach der KB dieses Ergebnis bestätigte bzw. wenn eine erneute KB erfolgte.

Insgesamt ergaben sich sieben solcher Fälle (7,2 % der mittels TRUS als tragend diagnostizierten Kühe), die dazu gehörenden Daten finden sich in Tabelle 40 wieder.

Tabelle 40: PAG-Konzentrationen bei Kühen, bei denen spätembryonaler Fruchttod festgestellt wurde.

Tier-Nr.	Gruppenzugehörigkeit	RIA497: PAG in ng/ml		RIA706: PAG in ng/ml		Bestätigung durch RTU <sup>1)</sup> bzw. KB
		2.BP <sup>2)</sup>	3.BP <sup>2)</sup>	2.BP <sup>2)</sup>	3.BP <sup>2)</sup>	
T86	C	4,62	1,58	10,15	2,33	KB
T152	C	3,73	1,63	6,55	1,35	RTU-
T253	C	3,65	1,32	6,40	1,29	KB
T170	B	3,10	1,93	5,05	1,62	KB
T65	A	1,75	1,04	4,06	1,34	RTU-
T219	A	2,29	1,65	3,84	1,29	KB
T242	A	1,88	0,71	4,13	0,48	RTU-

<sup>1)</sup> RTU = transrektale Palpation; <sup>2)</sup> BP = Beprobung

Wie Tabelle 40 zeigt, können die Tiere T86, T152 und T253 der Gruppe C (am Tag der KB < 61 Tage post partum) zugeordnet werden, während das Tier T170 der Gruppe B (bei KB 61 – 90 Tage post partum) und die Kühe T65, T219 und T242 in Gruppe A (bei KB > 90 Tage post partum) fallen. Alle zum Zeitpunkt der 3. Beprobung erhaltenen Messwerte liegen nahe der für die beiden RIAs erhaltenen cut off-Punkte (RIA497: 1,50 ng/ml; RIA706 2,50 ng/ml; siehe Tabelle 33).

#### 4.2.8 Unterschiede zwischen den Gruppen des TK 1 hinsichtlich des KB-Erfolgs

Die Gruppen A, B und C sowie die Färsen des TK 1 wurden hinsichtlich des KB-Erfolgs verglichen. In die Bewertung flossen die Wahl des KB-Zeitpunktes, das erneute Vorstellen zur KB, ein negativer Trächtigkeitsbefund und das Auftreten spät-embryonaler Mortalität (siehe Kapitel 4.2.7.2) mit ein.

Von einem KB-Erfolg wurde dann ausgegangen, wenn sowohl die TRUS (ca. 30 Tage nach der KB) als auch die transrektale Palpation (49 – 56 Tage nach der KB) eine Trächtigkeit bestätigten. Von einem negativen Trächtigkeitsbefund wurde dann gesprochen, wenn weder bei der TRUS noch bei der transrektalen Palpation eine Trächtigkeit festgestellt werden konnte bzw. das Tier erneut zur KB vorgestellt worden war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 41 zusammengefasst.

Tabelle 41: Unterschiede zwischen den Gruppen A, B, C bzw. Färsen des TK 1 hinsichtlich der Qualität der Brunstbeobachtung, des KB-Erfolgs und des Auftretens spät-embryonaler Mortalität.

Gruppen zugehörigkeit	insgesamt	KB-Zeitpunkt inkorrekt (1. BP <sup>1)</sup> )	erneutes Vorstellen zur KB vor der 2. BP <sup>2)</sup>	negativer Trächtigkeitsbefund	Auftreten spät-embryonaler Mortalität	KB-Erfolg
C	43	0	10 (23,3 %)	15 (34,9%)	3 (7,0 %)	15 (34,9 %)
B	83	15 (18,1 %)	32 (38,6 %)	26 (31,3 %)	1 (1,2 %)	25 (30,1 %)
A	132	13 (9,8 %)	50 (37,9 %)	27 (20,5 %)	3 (2,3 %)	51 (38,6 %)
Färsen	38	2 (5,3 %)	6 (15,8 %)	4 (10,5 %)	0	28 (73,7 %)

<sup>1)</sup> 1. BP = 1. Beprobung am Tag der KB; <sup>2)</sup> 2. BP = 2. Beprobung 29/30/31 Tage nach der KB

Wie Tabelle 41 zeigt, ergab sich bei den Kühen für den Parameter „KB-Zeitpunkt inkorrekt“ (Progesteron > 0,5 ng/ml) für Gruppe C keine Fehlbeobachtung, während diese bei den Gruppen B und A bei 18,1 bzw. 9,8 % lagen. Der KB-Erfolg schwankte zwischen 30,1 (Gruppe B) und 38,6 % (Gruppe A). Es fällt auf, dass die offensichtlich bessere Wahl des KB-Zeitpunktes bei Gruppe A im Vergleich zu Gruppe B mit einem besseren KB-Erfolg verbunden ist.

Das Ergebnis bei den Färsen weicht mit einem KB-Erfolg von 73,7 % deutlich von dem der Kühe ab. Auch die Wahl des KB-Zeitpunktes weist mit 5,3 % deutlich weniger Fehlbeobachtungen auf.

## 5 DISKUSSION

Häufiger Abgangsgrund in Milchrinderherden sind Störungen der Fruchtbarkeit. So liegen die Abgänge wegen Unfruchtbarkeit zwischen 10 – 27 % (Pabst, 2005) bei einer Remontierungsrate in manchen Betrieben von deutlich über 40 % (Mansfeld et al., 2007). Nach Hoedemaker et al. (2007) sollte die Abgangsrate aufgrund von Fruchtbarkeitsstörungen jedoch bei maximal 7 % liegen.

Dem Fruchtbarkeitsmanagement in den Milchbetrieben und damit auch der Kontrolle des Besamungs(KB)-Erfolges kommt also eine Schlüsselrolle zu. Dabei geht es einmal darum, nicht tragend gewordene Tiere möglichst früh zu identifizieren, aber auch darum, Hinweise auf embryonalen Fruchttod zu erhalten.

Insbesondere in Großbetrieben mit mehreren hundert Kühen und Färsen stößt dabei die klassische Art der Graviditätsdiagnostik mittels transrektaler Palpation zunehmend an ihre Grenzen. Daraus resultiert der Bedarf nach Alternativen, wobei auch laborgestützten Verfahren zur Erfassung graviditätsspezifischer Bioindikatoren eine grundsätzliche Bedeutung zukommt.

Ziel vorliegender Untersuchungen war es daher, ein solches laborgestütztes Verfahren – mit einem zumindest aus theoretischer Sicht hohem Potential – hinsichtlich seiner Aussagekraft und Praktikabilität zu überprüfen, wobei gleichzeitig Informationen zur Bedeutung des spätembryonalen Fruchttodes für die Fertilitätslage gewonnen werden sollten. Als Bioindikatoren wurden die schon vom frühen Trophoblast sezernierten und in den maternalen Kreislauf abgegebenen Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) herangezogen. Die für die Etablierung der Methodik notwendigen spezifischen Reagenzien (unter anderem aufgereinigtes bovines PAG(boPAG)<sup>1</sup>, Antiserum 497 und 706) wurden von Professor J.-F. Beckers Labor für Reproduktionsphysiologie, Fakultät der Veterinärmedizin der Universität Liege, Belgien (Labor Beckers) bereitgestellt, im selben Labor erfolgte auch eine erste Einarbeitung der Autorin.

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.1 Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung von PAG im Blutplasma

Wie oben dargelegt, war es Ziel vorliegender Arbeit, die Anwendbarkeit eines PAG-Tests zur Frühträchtigkeitsdiagnostik beim Rind unter den hier gegebenen Bedingungen zu überprüfen. Dazu wurden im hiesigen Labor zwei radioimmunologische Verfahren (RIAs) zur direkten Bestimmung von PAG im Blutplasma von Rindern eingerichtet, boPAG1-RIA497 (RIA497) und boPAG1-RIA706 (RIA706). In beiden Tests konkurriert boPAG aus der Probe mit  $^{125}\text{J}$  markiertem boPAG1 (boPAG1-Tracer) um Bindungsstellen an polyklonalen Antikörpern (1. Antikörper), die bei RIA497 gegen boPAG1 und bei RIA706 gegen caprines PAG(caPAG)<sub>55+62 kDa</sub> gerichtet sind.

Während RIA497 im Labor Beckers, wie von Zoli et al. (1992b) beschrieben, routinemäßig durchgeführt wird, wurde RIA706 bisher nur im Rahmen von Studien über den Effekt unterschiedlicher Antisera auf die gemessenen PAG-Konzentrationen angewendet. Ein Teilziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher zu überprüfen, welcher der beiden RIAs geeigneter für eine frühe Trächtigkeitsdiagnose erscheint (siehe auch Kapitel 2.3.3.2.10). Um eine entsprechende Aussage treffen zu können, wurde daher jede Probe in beiden RIA-Systemen gemessen.

Voraussetzung zur Durchführung dieser vergleichenden Messungen an einem definierten Probenmaterial war jedoch zunächst, dass beide RIAs erfolgreich im hiesigen Labor etabliert werden konnten und diese den analytischen Qualitätskriterien entsprachen.

Das Messprinzip eines kompetitiven RIAs beruht darauf, dass nicht markiertes Antigen (Standard bzw. Antigen aus der zu untersuchenden Probe) von radioaktiv markiertem Antigen (Tracer) aus seiner Bindung am Antikörper verdrängt wird (Sequenztest) bzw. diese zeitgleich um Bindungsstellen am Antikörper konkurrieren (Equilibriumstest). Das diesem Prinzip zugrunde liegende Messpotenzial ergibt sich sekundär daraus, zu welchem Prozentsatz der Tracer gebunden wird und welche „Spannweite“ an „Verdrängungspotential“ sich daraus ergibt. Dabei kommt auch den Bindungseigenschaften des Antiserums (Assoziationskonstante) eine entscheidende Bedeutung zu. Das Antiserum sollte sich durch eine hohe Bindungsaffinität bei geringer Bindungskapazität auszeichnen (Kyrein, 1983); das heißt, im Versuch sollte bei gleichbleibender Tracermenge und steigender Antiserum-Konzentration ab einem gewissen Punkt ein Bindungsplateau des Tracers erkennbar sein (Hoffmann, 1977).



## Diskussion

Die Auswertung eines solchen Tests erfolgt über die Qualitätskriterien Interassayvariabilität, Absolute und Relative Bindung, wobei bei letzterer die Bindung des Tracers gleich 100 % gesetzt wird. Dadurch erhält das System eine gewisse Elastizität, das heißt Schwankungen in der Absoluten Bindung des Tracers machen sich nicht weiter bemerkbar, wenn bei jedem Test eine eigene Standard-Kurve angesetzt wird. Wie in Kapitel 4.1 ausgeführt, gestaltete sich die Etablierung der Methodik im hiesigen Labor als problematisch. Dies lag insbesondere daran, dass die angestrebte Bindung des Tracers im Bereich von ca. 30 % nicht bzw. nur einmal erreicht wurde. Das heißt, die „Spannweite“ bzw. das „Verdrängungspotential“ im RIA durch nicht markiertes boPAG1 mussten als zum Teil erheblich eingeschränkt betrachtet werden. Jedoch können auch mit niedrigen Bindungen korrekte Ergebnisse erzielt werden. So werden z.B. bei der radioimmunologischen Bestimmung von Steroidhormonen, insbesondere von Estradiol, mit Bindungen von 15 % gut validierte Ergebnisse erzielt (Moellmann, 1991; Hoffmann, persönliche Mitteilung).

Um Hinweise auf die zu unterstellenden Probleme zu erhalten, wurden die einzelnen Schritte der Methodik überprüft. Diesem Vorgehen waren jedoch Grenzen gesetzt, da Schlüsselsubstanzen wie boPAG1 und 1. Antikörper aus dem Labor Beckers bezogen wurden und damit nur in begrenztem Maße für die Untersuchungen zur Verfügung standen.

Zunächst wurde das Problem bei der Tracerherstellung gesucht.

Das Elutionsprofil einer Tracerherstellung, bei der ein Bindungsnullwert des boPAG1-Tracers (TBo) von 35,16 % erzielt worden war, unterschied sich jedoch nicht von dem Elutionsprofil einer Tracerherstellung, die einen TBo-Wert von 7,69 % erbrachte (siehe Kapitel 4.1.2.1.1). In beiden Elutionsprofilen war ein ähnlich hoher 1. Peak (Proteinpeak) nachweisbar, die Fläche unter diesen Proteinpeaks (AUC) war ähnlich groß. Das heißt, bei beiden Tracerherstellungen wurde eine ähnliche Menge von an Protein gekoppeltem  $^{125}\text{J}$  im Proteinpeak von der Säule eluiert. Dass im Proteinpeak kein zusätzliches freies  $^{125}\text{J}$  miteluiert wurde, bestätigte eine Proteinfällungsreaktion. Aus dieser Beobachtung resultierte die Überlegung, dass es sich bei dem Protein, an das  $^{125}\text{J}$  gekoppelt wurde, möglicherweise nicht nur um boPAG1, sondern um ein anderes in die Kopplungsreaktion eingebrachtes Protein handelte. Infrage kamen Laktoperoxidase (LPO) (16 Tyrosinreste), das als Enzym mit an der Kopplungsreaktion zwischen  $^{125}\text{J}$  und boPAG1 beteiligt ist, sowie Bovines Serum Albumin (BSA) (21 Tyrosinreste), das im Säulenpuffer gelöst ist; beide Proteine weisen mit 77,5 kDa (LPO)

und 66,4 kDa (BSA) eine ähnliche Molekülgröße wie boPAG1 auf.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde eine Jodierung ohne Zusatz von boPAG1 durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.2.2.2). Bei der säulenchromatographischen Auftrennung war ein Proteinpeak nachweisbar, die AUC dieses Peaks war jedoch wesentlich kleiner als bei der Herstellung des boPAG1-Tracers. Dieser Versuch gab also den eindeutigen Hinweis, dass neben boPAG1 auch ein anderes Protein jodiert wird. Dabei dürfte es sich wahrscheinlich um LPO handeln, das während der Kopplungsreaktion direkt mit reaktivem  $^{125}\text{J}$  in Kontakt kommt, während der Kontakt des Reaktionsgemisches zu BSA – wenn überhaupt – erst bei der säulenchromatographischen Auftrennung stattfindet, da bei der Säulenvorbereitung kurz vor der Jodierung durch Auftrag von 1 ml Tris-Puffer dieser Kontakt zu verhindern versucht wird (siehe auch Kapitel 3.3.3.2).

Um der Frage einer Kopplung von  $^{125}\text{J}$  an LPO weiter nachzugehen, wurde auf Anraten eines wissenschaftlichen Mitarbeiters der ZBB Gießen<sup>1)</sup> als Jodierungsmethode die nach Chizzonite (1992) modifizierte Jodogenmethode angewendet, wobei als Protein zunächst  $\beta$ -Ependymin herangezogen wurde (siehe Kapitel 4.1.2.2.3). Diese Methode weist gegenüber der LPO-Methode mehrere Vorteile auf. So wird Jodogen anstatt LPO zur Oxidierung des Jods verwendet. Dieses liegt als Schicht im Reaktionsgefäß vor, so dass oxidative Schädigungen des zu jodierenden Proteins weitgehend vermieden werden können. Zudem wird die Kopplungsreaktion vor Auftrag auf die Säule durch Zugabe von Tyrosin zum Reaktionsgemisch abgestoppt. Für diese Tracerherstellung ergab sich nach Auftrennung des Reaktionsgemisches auf der Sephadex G-75-Gelsäule ein eindeutiges Elutionsprofil, auch nach Verwendung von boPAG1 anstatt von  $\beta$ -Ependymin; der maximal erreichbare TBo-Wert lag jedoch bei nur 2,87 %. Aufgrund dieser insgesamt sehr enttäuschend verlaufenden Versuchsserie wurde angenommen, dass die beobachteten Probleme möglicherweise mit dem in die Jodierung eingebrachten boPAG1 bzw. den verwendeten Antisera in Verbindung standen.

Durch Rückverbringung der in das hiesige Labor verbrachten Reagenzien (boPAG1, Antiserum 497 und 706) in das Labor Beckers und vergleichender Austestung unter den dort gegebenen Standardbedingungen sollten Hinweise auf die hier möglicherweise vorhandenen „ortsspezifischen“ Probleme erhalten werden (siehe Kapitel 4.1.2.4).

<sup>1)</sup> Für diesen Hinweis bedanke ich mich herzlich bei Gerhard Weigand.

## Diskussion

Bei dieser Überprüfung stellte sich boPAG1 als nicht mehr vollwertig heraus. Trotz aller Sorgfalt musste davon ausgegangen werden, dass die Handhabung im hiesigen Labor zu einer Schädigung des boPAG1-Proteins geführt hatte. Die Antisera zeigten bei den Versuchen im Labor Beckers hingegen keine bzw. nur eine geringgradige Qualitätsminderung.

Zur weiteren Überprüfung der Qualität der Antisera wurden im hiesigen Labor die beiden Antisera-Vorverdünnungen weiterverdünnt und der TBo einer konstant bleibenden Totalaktivitäts(TA)-Menge überprüft (siehe Kapitel 4.1.2.5.2). Wie sich zeigte, wurde kein Plateau und damit kein Überschuss an Bindungsstellen erreicht; das heißt, dass bereits in der uns zur Verfügung gestellten Antiserum-Vorverdünnung die Antikörper im Unterschuss vorlagen.

Der Test wurde also mit einem Unterschuss an Bindungsstellen durchgeführt und entsprach damit den allgemeinen Vorgaben (Kyrein, 1983). Hinweise auf die Bindungsaffinität ergaben sich daraus jedoch nicht, so dass diesbezügliche Probleme nicht ausgeschlossen werden können. Eine verminderte Qualität des boPAG1-Tracers durch übermäßige Kopplung von <sup>125</sup>J-Molekülen an die Tyrosinreste des boPAG1-Proteins und damit eine Behinderung der Bindung des boPAG1-Moleküls an den Antikörper kann als Ursache ausgeschlossen werden, da dieser Versuch mit einem im Labor Beckers hergestellten und nach Gießen verbrachten boPAG1-Tracer durchgeführt worden war, der im Labor Beckers einen TBo von 30,02 % erreichte, im hiesigen Labor jedoch lediglich einen TBo-Wert von 6,90 %.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden auch Modifikationen im Testansatz durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.2.5). Dabei ergab sich, dass durch einen Zusatz von PAG-freiem Serum zum Inkubationsansatz deutlich höhere TBo-Werte (12,46 – 17,79 % statt 6,90 – 8,26 %) erhalten wurden. Unterschiede zwischen den einzelnen PAG-freien Seren zeigten sich nicht. Erklärt werden kann der höhere TBo-Wert bei Zusatz von PAG-freiem Serum mit dem Auftreten von sogenannten Serumeffekten, wonach Serum die Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes fördern kann. Ein Grund für das Auftreten dieses Effektes kann unter anderem in einer zu niedrigen Antiserum-Konzentration liegen (Ratcliffe, 1974).

Letztendlich konnten die niedrigen TBo-Werte anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig einer Ursache zugeordnet werden. Nachdem dieses methodische Problem insbesondere bei Messung der Proben aus Tierkollektiv 3 (TK 3) auftrat, wurde bei Erstellung der Qualitätskriterien zwischen den RIAs zur Messung der

Proben aus Tierkollektiv 1 (TK 1) und Tierkollektiv 2 (TK 2) (siehe Kapitel 4.1.3.1) und den RIAs zur Messung der Proben aus TK 3 (siehe Kapitel 4.1.3.2) differenziert. Bei Messung der Proben aus TK 1 und TK 2 ergaben sich für RIA497 Bindungsnullwerte (Bo) zwischen 16,2 und 27,8 % ( $21,1 \pm 3,8$  %), für RIA706 Bo-Werte zwischen 12,8 – 21,2 % ( $15,9$  %  $\pm 2,9$  %). Die Relative Bindung zeigte einen Abfall von 100 auf 9,7 % (RIA497) bzw. 100 auf 11,3 % (RIA706), die gleichbleibende Qualität der Standard-Kurven zeigte sich anhand der Variabilität der Relativen Bindungen der einzelnen Standard-Kurvenpunkte, die zwischen 1,6 und 27,7 % (RIA497) bzw. 1,6 und 21,5 % (RIA706) lag. In den zur Qualitätskontrolle herangezogenen Proben (QCs) konnten die im Labor Beckers gemessenen Werte weitestgehend bestätigt werden, die Interassayvariabilität lag unter Einbeziehung der eigenen QCs bei 4,7 – 9,2 % (RIA497) bzw. 8,6 – 16,1 % (RIA706). Die für die Proben aus TK 1 und TK 2 erhaltenen Ergebnisse entsprechen demnach den an die Qualitätskriterien gestellten Ansprüchen.

Die Proben von TK 3 wurden hingegen mit RIAs gemessen, bei denen die Bo-Werte bei Anwendung von RIA497 zwischen 13,3 und 14,2 % ( $13,8 \pm 0,4$  %) bzw. bei Anwendung von RIA706 zwischen 11,1 und 14,1 % ( $12,4 \pm 1,3$  %) schwankten. Wie sich jedoch zeigte, war auch hier trotz der niedrigen Bo-Werte ein konstanter Abfall der Relativen Bindung der Standard-Kurvenpunkte von 100 auf 8,4 % (RIA497) bzw. auf 12,1 % (RIA706) feststellbar. Auch die Interassayvariabilität war mit 6,7 – 15,4 % bei Anwendung von RIA497 und mit 2,4 – 19,9 % bei Anwendung von RIA706 noch akzeptabel (siehe auch Kapitel 4.1.3.2). Es zeigte sich lediglich eine Überschätzung der QC-Proben um den Faktor 1,35 (RIA497) bzw. 1,80 (RIA706) im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit RIAs zur Bestimmung der PAG-Konzentrationen der Proben aus TK 1 und TK 2 erhalten worden waren. Dies erklärt sich durch den schwächeren Abfall der Relativen Bindung vor allem bei Anwendung von RIA706 (siehe Kapitel 4.1.3.3). Damit wurden möglicherweise die PAG-Werte der Tiere des TK 3 – zumindest bei Anwendung von RIA706 – überschätzt; die Ergebnisse, die sich aus TK 3 ergeben, sind also mit Vorbehalt zu beurteilen.

### **5.1.2 Progesteron-Bestimmung in Magermilch bzw. Blutplasma**

Für die Bestimmung von Progesteron kamen etablierte und nach Standard Operation Procedures (SOPs) routinemäßig zur Anwendung kommende Verfahren zum Einsatz. Die Qualitätskriterien konnten auch für die vorliegenden Untersuchungen erfüllt werden (siehe Kapitel 3.4.5).

## **5.2 Ergebnisse der Untersuchungen am Tier (TK 1, TK 2, TK 3)**

Die Untersuchungen fanden an drei Tierkollektiven statt. Anhand der Beprobung von TK 3 sollte mit den verfügbaren Methoden der Verlauf der PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit dargestellt werden. Von besonderem Interesse war dabei, inwieweit die mit RIA706 erhaltenen PAG-Werte mit denen von RIA497 korrelierten, da von anderen Autoren – insbesondere in der Frühträchtigkeit – mit RIA706 höhere PAG-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten als mit RIA497.

Die Beprobungen und klinischen Untersuchungen von den Tierkollektiven TK 1 und TK 2 waren so angelegt, dass eine Aussage über die Anwendbarkeit der beiden RIAs zur frühen Trächtigkeitsdiagnose, 29/30/31 Tage nach der KB, getroffen werden konnte. Weiterhin sollten Informationen zur korrekten Wahl des KB-Zeitpunktes sowie zur embryonalen Mortalität erhalten werden.

### **5.2.1 Verlauf der PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit**

Die Untersuchungen erfolgten anhand der von TK 3 gewonnenen Blutproben. Wie bereits oben erläutert, erfüllten die bei diesen Untersuchungen zur Anwendung kommenden RIAs nur bedingt die an die analytischen Qualitätskriterien zu stellenden Ansprüche, da es zu einer scheinbaren Überschätzung der PAG-Werte bei den QC-Proben kam.

Bei Vergleich mit den PAG-Werten aus TK 1 und TK 2 zeigte sich jedoch, dass lediglich am 30. bzw. 38. Tag der Trächtigkeit der PAG-Wert in beiden RIAs leicht überschätzt wurde (siehe Kapitel 4.2.5). Die erstellten Verlaufskurven reflektieren daher die tatsächlich gegebene, physiologische Situation.

Die mit den beiden RIAs erstellten Kurven sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt. Der kontinuierliche Anstieg der PAG-Konzentrationen von 4,40 ng/ml am Tag 30 auf 126,80 ng/ml am Tag 245 (RIA497) bzw. von 9,56 ng/ml auf 165,92 ng/ml (RIA706) entspricht dem in der Literatur beschriebenen kontinuierlichen Anstieg der PAG-Konzentrationen während der gesamten Trächtigkeit (Zoli et al., 1992b).

Bei Vergleich mit den von Zoli et al. (1992b) beschriebenen Absolutwerten zeigt sich jedoch, dass die im hiesigen Labor mit RIA497 zwischen dem 30. – 80. Tag der Trächtigkeit gemessenen PAG-Konzentrationen eher unterschätzt, die zwischen dem 120. – 200. Tag der Trächtigkeit gemessenen Werte eher überschätzt wurden. Bei Vergleich mit den von anderen Autoren erhobenen Daten lagen die im hiesigen Labor mit RIA497 gemessenen PAG-Werte ausnahmslos höher. So waren die PAG-

Werte in den eigenen Untersuchungen bei Vergleich mit denen von Lopez-Gatius et al. (2007a) gemessenen PAG-Konzentrationen sogar zum Teil bis zu mehr als 3,3 mal so hoch (siehe Tabelle 5).

Für RIA706 sind nur Vergleichsdaten bis zum 80. Tag der Trächtigkeit vorhanden (siehe Tabelle 5). Auch hier sind die im hiesigen Labor gemessenen PAG-Werte ausnahmslos höher als von anderen Autoren angegeben (Perenyi et al., 2002b; Lopez-Gatius et al., 2007a; Ayad et al., 2008).

Die beiden RIAs unterschieden sich in den hier durchgeführten Untersuchungen darin, dass mit RIA706 generell höhere durchschnittliche PAG-Konzentrationen gemessen wurden als bei Anwendung von RIA497. Diese Differenz war besonders an den Tagen 30 – 36 deutlich ( $p < 0,001$ ), wo mit RIA706 2,4 – 2,5 mal höhere PAG-Werte gemessen wurden als mit RIA497.

Diese insbesondere in der Frühträchtigkeit mit RIA706 gemessenen höheren PAG-Konzentrationen können mit der Beobachtung von Perenyi et al. (2002b) erklärt werden, wonach aufgrund der unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten der beiden Antisera zu Beginn der Gravidität mit RIA706 höhere Konzentrationen von vermutlich qualitativ anderen PAGs gemessen werden als mit RIA497. Dies steht in Übereinstimmung mit den Angaben von Green et al. (2000), die über die Bildung unterschiedlicher PAGs in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium berichten.

Vom 42. – 49. Tag zeigte sich bei Anwendung von RIA706 zudem ein Absinken der PAG-Konzentrationen und damit ein Annähern der PAG-Werte an die mit RIA497 gemessenen PAG-Konzentrationen. Dies entspricht in etwa den Beobachtungen von Lopez-Gatius et al. (2007a), die ein Absinken der mit RIA706 gemessenen PAG-Konzentrationen vom 35. auf den 42. Tag der Trächtigkeit beschreiben.

### **5.2.2 Elimination von PAG und Zuordnung der Tiere des TK 1 in Gruppen**

Anhand der Blutproben, die bei den Kühen des TK 1 am Tag der KB gewonnen worden waren (1. Beprobung), konnte die Elimination von PAG im Blut post partum dargestellt werden.

Wie die halblogarithmische Darstellung der Elimination von PAG im Blut post partum zeigt (siehe Abbildungen 12 und 13), folgte die Elimination einer Kinetik 1. Ordnung mit einer schnellen und einer langsamen Evasion, die sich in Form zweier Geraden darstellen ließ. Der Schnittpunkt der beiden Geraden und damit der Zeitpunkt nach der Geburt, an dem nur noch ein sehr langsames Absinken der PAG-Konzentrationen im Blut stattfindet, lag bei RIA497 am Tag 85 post partum und bei RIA706 am

## Diskussion

Tag 100 post partum. Dieser Eliminationszeitraum stimmt in etwa mit den Angaben von Zoli et al. (1992b) überein, die für die Elimination von PAG post partum eine Zeitspanne von  $100 \pm 20$  Tagen bei Anwendung von RIA497 nennen.

Darüber hinausgehend wurden die aus den beiden RIAs erhaltenen PAG-Werte einer nicht linearen Regressionsanalyse unterzogen. Daraus ergab sich je eine Exponentialfunktion (RIA497:  $y = 0,74 + 972,9 e^{-0,08745 t}$ , RIA706:  $y = 0,35 + 453,9 e^{-0,07215 t}$ ), deren Kurve auf der Abzisse bei RIA497 dem Endwert 0,74 ng/ml bzw. 0,35 ng/ml bei RIA706 entgegenläuft (siehe Kapitel 4.2.2). Die Endwerte charakterisieren den Hintergrundwert (Rauschen) im Plasma. Bei den Färsen lagen die entsprechenden Hintergrundwerte bei 0,66 (RIA497) bzw. 0,50 ng/ml (RIA706).

Als Orientierungspunkt für die Gruppierung diente der Schnittpunkt der beiden Eliminationsgeraden. Anders als an anderer Stelle (Labor Beckers) wurden in den vorliegenden Untersuchungen auch Kühe einbezogen, die vor dem 70. Tag post partum – das heißt bereits ab Tag 40 – besamt wurden. Diese sehr früh nach der Kalbung durchgeführte KB entsprach den Gepflogenheiten der drei Großbetriebe, deren Tiere das TK 1 bildeten. Bei Einbeziehen von sehr früh nach Kalbung besamten Kühen ist jedoch davon auszugehen, dass ca. 30 Tage nach der KB, dem Zeitpunkt der 2. Beprobung, der Rest-PAG-Gehalt aus der letzten Gravidität noch so hoch ist, dass nicht tragende Kühe mittels PAG-Test fälschlicherweise als tragend diagnostiziert werden (Falsch-Positiv-Rate steigt, siehe Kapitel 3.6.2). Um daraus möglicherweise resultierende Fehler so gering wie möglich zu halten, wurden die Kühe aus TK 1 in Gruppen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der KB post partum eingeteilt (siehe Kapitel 4.2.2.1). Nachdem die Tage 85 (RIA497) bzw. 100 (RIA706) das Ende der schnellen und der Beginn der langsamen Elimination von PAG markierten, wurden alle nach Tag 90 zur KB vorgestellten Kühe der Gruppe A zugeteilt. Bei diesen Kühen war schon zum Zeitpunkt der 1. Beprobung (Tag der KB) nicht mehr mit Rest-PAG im Blut zu rechnen, so dass im Falle einer erhöhten PAG-Konzentration am Tag der 2. Beprobung von einer Trächtigkeit auszugehen war.

Bei Kühen, die zwischen dem 61. und 90. Tag nach der Kalbung besamt wurden, war nur bei der 1. Beprobung Rest-PAG im Blut zu erwarten, nicht jedoch bei der entscheidenden 2. Beprobung, bei der die Diagnose „tragend“/„nicht tragend“ gestellt wurde. Sie wurden der Gruppe B zugeordnet.

Bei allen Kühen, die vor dem 61. Tag post partum besamt wurden, bestand hingegen die Möglichkeit, dass auch noch zum Zeitpunkt der 2. Beprobung Rest-PAG im Blut vorhanden war; diese Kühe wurden der Gruppe C zugeordnet.

### **5.2.3 Ergebnisse nach Anwendung von RIA497 und RIA706 bei TK 1 und TK 2**

#### **5.2.3.1 Unterschiede zwischen den Gruppen des TK 1**

Unbeschadet der Rest-PAG-Konzentrationen im Blut ergab sich für beide RIAs für alle Gruppen ein signifikanter Unterschied in den PAG-Werten zwischen den mittels transrektaler Ultraschalluntersuchung (TRUS) als tragend (+) und nicht tragend (-) diagnostizierten Tieren (siehe auch Tabelle 31). Wie zu erwarten war, lagen die PAG-Konzentrationen bei den als tragend diagnostizierten Tieren (TRUS+) in der Gruppe C jedoch höher als bei den anderen beiden Gruppen; der Unterschied zu Gruppe A war mit  $p < 0,001$  (RIA497) bzw.  $p < 0,01$  (RIA706) signifikant (siehe Tabelle 32). Auch bei den als nicht tragend diagnostizierten Kühen (TRUS-) zeigte sich ein zum Teil signifikanter Abfall der PAG-Konzentration von Gruppe C zu A (siehe Tabelle 32). Ein Unterschied zwischen den als nicht tragend diagnostizierten Tieren (TRUS-) und den nicht tragenden Tieren innerhalb einer Gruppe zeigte sich bei RIA497 für Gruppe A, bei Anwendung von RIA706 ergab sich für alle Gruppen ein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 31). Ob dieser Beobachtung eine biologische Bedeutung zukommt, kann derzeit nicht gesagt werden. Im Hinblick auf die Interassayvariabilität von 4,7 – 9,2 % (RIA497) bzw. 8,6 – 16,1 % (RIA706) (siehe Kapitel 4.1.3.1) kann dieser Unterschied jedoch auch rein zufallsbedingt sein. Allerdings könnten höhere PAG-Werte bei besamten und ca. 30 Tage später mittels TRUS als nicht tragend diagnostizierten Tieren im Vergleich zu nicht tragenden Tieren auch auf spätembryonale Mortalität zwischen dem 22. und 30. Tag nach der KB schließen lassen, da PAG bereits ab dem 22. Tag der Trächtigkeit im Blut nachweisbar ist (Zoli et al, 1992b).



### **5.2.3.2 Sensitivität und Spezifität bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei TK 1**

Grundlage für die Berechnung von Sensitivität und Spezifität und damit der Zuverlässigkeit der beiden RIAs für die Trächtigkeitsdiagnostik war der mittels Receiver Operating Characteristic(ROC)-Analyse (siehe Kapitel 3.6.2) ermittelte Grenzwert (cut off-Punkt).

Dazu wurden zunächst alle Gruppen von Kühen (A,B,C) gleichermaßen berücksichtigt. Es ergab sich eine Sensitivität von 93,9 % für RIA497 bzw. 92,9 % für RIA706 und eine Spezifität von 85,3 % (RIA497) bzw. 94,1 % (RIA706) (siehe Tabelle 33). Damit lag die Sensitivität für beide RIAs auf ähnlich hohem Niveau wie bei Szenci et al. (1998a), während die Spezifität für beide RIAs deutlich höher lag; die von Szenci et al. (1998a) angegebenen Werte liegen bei einer Sensitivität von 95,2 % und einer Spezifität von 69,3 % (siehe auch Tabelle 4).

Bei den Färsen ergab sich für beide RIAs eine Spezifität von 100 %, die Sensitivität lag bei 97,5 (RIA497) bzw. 96,6 % (RIA706) (siehe Tabelle 34). Damit lag die Zuverlässigkeit der beiden RIAs für Färsen, wie auch schon von Zoli et al. (1992b) für RIA497 beschrieben (siehe Tabelle 3, Sensitivität 93,0 %, Spezifität 97,9 %), deutlich höher als für Kühe.

In den eigenen Untersuchungen wurde versucht, die Zuverlässigkeit des Tests bei Kühen zu verbessern, indem der zum Zeitpunkt der 2. Beprobung (29/30/31 Tage nach der KB) zu erwartende Rest-PAG-Gehalt mittels eines Korrekturfaktors herausgerechnet wurde. Dieser Korrekturfaktor wurde mittels der beiden bereits oben erwähnten Exponentialfunktionen berechnet (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.4.1). Wie aus Tabelle 33 hervorgeht, führte dies zwar zu einer deutlichen Erniedrigung der cut-off-Punkte, Sensitivität und Spezifität wurden jedoch dadurch nicht (RIA706) bzw. nur geringgradig (RIA497) verbessert. Diese nur marginale Verbesserung der Zuverlässigkeit des Diagnoseverfahrens durch Korrektur der im Blut von Kühen gemessenen PAG-Werte lässt ein solches Vorgehen nicht nötig erscheinen.

In einem nächsten Schritt wurden die Daten der Kühe aus Gruppe C nicht in die Berechnungen der Zuverlässigkeit miteinbezogen (siehe Kapitel 4.2.4.2, Tabelle 35). Die Sensitivität lag mit 94,9 (RIA497) und 93,7 % (RIA706) geringgradig höher als bei Einbeziehung aller Gruppen (RIA497: 93,9 %; RIA706: 92,9 %), der positive Effekt war für die Spezifität mit 90,9 % statt 85,3 % für RIA497 bzw. mit 96,4 % statt 94,1 % für RIA706 deutlicher ausgeprägt, insbesondere bei Anwendung von RIA497.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es vor allem bei Anwendung von RIA706 nicht notwendig erscheint, Kühe, die vor dem 61. Tag besamt wurden (Gruppe C), von der Analytik auszuschließen, wie es an anderer Stelle praktiziert wird (Labor Beckers: Ausschluss der Kühe, die vor dem 70. Tag post partum besamt wurden).

### 5.2.3.3 Sensitivität und Spezifität bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik bei TK 1 und TK 2

Da die Kühe in TK 2 in der Regel erst ab dem 60. Tag post partum besamt wurden, erschien es sinnvoll, die Tiere aus TK 2 sowie die Gruppen B und A aus TK 1 zusammenzufassen und in einem weiteren Rechengang die Zuverlässigkeit zu berechnen (siehe Kapitel 4.2.4.3). Bei den Färsen ergab sich sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität ein Wert von 100 % (RIA497 und RIA706), bei den Kühen lagen die Werte bei 99,3 bzw. 90,6 % (RIA497) sowie 99,3 bzw. 93,1 % (RIA706).

Damit wurden die bisher besten Ergebnisse erzielt, was möglicherweise damit zusammenhängt, dass als Zielvariable die transrektale Palpation verwendet wurde und damit die Trächtigkeitsdiagnose zu einem späteren Zeitpunkt als bei Anwendung der TRUS erfolgte und dies möglicherweise eine sicherere Aussage gestattete.

### 5.2.3.4 Zusammenfassende Bewertung von Sensitivität und Spezifität bei Anwendung von RIA497 und RIA706 zur Graviditätsdiagnostik

Tabelle 42 und 43 geben einen Überblick über die Zuverlässigkeitskenndaten beider RIAs unter Berücksichtigung unterschiedlicher Tierkollektive bzw. Gruppen.

Tabelle 42: Färsen: Überblick über die Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Anwendung von RIA497 und RIA706 unter Berücksichtigung unterschiedlicher Tierkollektive (TK 1/TK 2).

	RIA497		RIA706	
	TK 1	TK 1 und TK 2	TK 1	TK 1 und TK 2
<b>Sensitivität</b>	97,5 %	100 %	96,6 %	100 %
<b>Spezifität</b>	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabelle 43: Kühe: Überblick über die Kenndaten zur Beurteilung der Zuverlässigkeit bei Anwendung von RIA497 und RIA706 unter Berücksichtigung unterschiedlicher Tierkollektive (TK 1/TK 2) bzw. Gruppen (A/B/C).

	RIA497				RIA706			
	TK 1 (A/B/C) unkorr. <sup>1)</sup>	TK 1 (A/B/C) korr. <sup>2)</sup>	TK 1 (A/B)	TK 1 (A/B), TK 2	TK 1 (A/B/C) unkorr. <sup>1)</sup>	TK 1 (A/B/C) korr. <sup>2)</sup>	TK 1 (A/B)	TK 1 (A/B), TK 2
<b>Sensitivität</b>	93,9 %	92,9 %	94,9	99,3 %	92,9 %	92,9 %	93,7 %	99,3 %
<b>Spezifität</b>	85,3 %	89,7 %	90,9	90,6 %	94,1 %	94,1 %	96,4 %	93,1 %

<sup>1)</sup> unkorr. = unkorrigiert; <sup>2)</sup> korr. = korrigiert

## Diskussion

Wie ersichtlich, ist eine nahezu 100 % richtige Diagnostik bei Anwendung von RIA497 bzw. RIA706 nur bei den Färsen möglich.

Die generell niedrigere Zuverlässigkeit der Methodik bei Kühen ist ein Phänomen, das vermutlich mit deren Rest-PAG-Gehalt im Blut und der höheren embryonalen Mortalität zu erklären ist.

Bei Vergleich der Zuverlässigkeitskenndaten beider RIAs zeigt sich, dass RIA706 im Hinblick auf die Spezifität deutlich bessere Ergebnisse lieferte als RIA497, hinsichtlich der Sensitivität ergaben sich dagegen kaum Unterschiede. RIA706 weist also gegenüber RIA497 gewisse Vorteile auf. Dies liegt vermutlich daran, dass die mit RIA706 gemessenen PAG-Konzentrationen bei als tragend diagnostizierten Tieren generell höher und bei Nichtträchtigkeit ähnlich niedrig sind wie bei Anwendung von RIA497. So liegt selbst bei Einbezug der Kühe der Gruppe C des TK 1, bei denen am Tag der 2. Beprobung noch „Rest-PAG im Blut“ zu erwarten war, die Spezifität bei Anwendung von RIA706 um 8,8 % höher als bei Anwendung von RIA497. Das heißt, gerade im Hinblick auf Anwendung des PAG-Tests bei früh nach der Kalbung besamten Kühen – ab dem 40. Tag post partum – scheint RIA706 geeigneter zu sein. Dennoch: Generell sind beide Tests unter Einbeziehung aller Tiergruppen hinreichend zuverlässig. Die Anwendung des Tests und der Umfang seiner Anwendung bei Kühen sind in erster Linie betriebliche Entscheidungen.

Zu berücksichtigen ist bei der Beurteilung der beiden PAG-RIAs, dass auch die als Referenz dienenden Trächtigkeitsdiagnostikverfahren wie transrektale Palpation und TRUS mit Fehlern behaftet sind. So liegen Sensitivität und Spezifität des als „Goldstandard“ bezeichneten Verfahrens der TRUS auch „nur“ bei 97,7 % und 87,8 % (Pieterse et al., 1990). Zudem ist jedes sehr frühe Trächtigkeitsdiagnostikverfahren mit größeren Fehlern behaftet als spätere Verfahren, da bei früher Diagnostik das Auftreten von embryonaler Mortalität mehr zum Tragen kommt.

#### **5.2.4 Progesteron-Wert zum Zeitpunkt der KB**

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um Anhaltspunkte über die Korrektheit des gewählten KB-Zeitpunktes zu erhalten. Wie Kapitel 4.2.6.1 und 4.2.6.2 zeigen, wiesen 8,3 (TK 2) bzw. 5,3 % (TK 1) der Färsen und 6,9 (TK 2) bzw. 10,9 % (TK 1) der Kühe am Tag der KB einen funktionierenden Gelbkörper auf und wurden damit nicht zum korrekten Zeitpunkt besamt. Dies entspricht in etwa den von Günzler et al. (1975) erhobenen Daten zur falschen Brunstbeobachtung, die bei 8,5 % lagen. Von diesen zum falschen Zeitpunkt besamten Tieren wurden in TK 1 und TK 2 über die Hälfte der Kühe (TK 1: 60,7 %, TK 2: 58,3 %) innerhalb von 30 Tagen wieder besamt, vermutlich also zur nächsten Brunst, und damit rechtzeitig als nicht tragend erkannt, während neun bzw. drei Kühe (TK 1: 32,1 %; TK 2: 25,0 %) erst durch niedrige PAG-Konzentrationen bzw. durch TRUS ca. 30 Tage nach der KB als nicht tragend auffielen.

Zwei Kühe bzw. eine Kuh (TK 1: 7,1 %, TK 2: 16,7 %) wurden besamt, obwohl sie vermutlich bereits tragend waren. Die erneute KB hätte bei diesen Tieren auch einen Fruchttod auslösen können (Hoffmann, 1971).

Dies zeigt, dass einer exakten Brunstbeobachtung größte Bedeutung zukommt und durch eine Brunstkontrolle am Tag der KB, z.B. mittels Progesteron-Bestimmung in der Milch, bis nahezu 11 % zum falschen Zeitpunkt besamte Tiere verhindert werden können.

### **5.2.5 Spätembryonale Mortalität**

Der Nachweis von spätembryonaler Mortalität war bei sieben Tieren des TK 1 und bei einem Tier aus TK 3 möglich (siehe Kapitel 4.2.7).

Da bei der Kuh aus dem TK 3 mehrere Blutproben in kurzen Zeitintervallen entnommen worden waren, konnte bei diesem Tier spätembryonale Mortalität allein durch den Verlauf der PAG-Konzentrationen nachgewiesen werden. Durch zusätzliche Bestimmung von Progesteron zeigte sich zudem, dass in dem vorliegenden Fall der Funktionsverlust des Trophoblasten der Luteolyse vorausging und damit die durch den Funktionsverlust des Trophoblasten wieder einsetzende endometriale PGF<sub>2</sub>α-Produktion die Luteolyse induzierte und nicht ein Abfall der Progesteronproduktion im Gelbkörper (Gelbkörperinsuffizienz) den Fruchttod verursachte.

Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Szenci et al. (2000); bei den von ihnen untersuchten Kühen mit embryonaler Mortalität sanken auch zunächst die PAG- und erst wesentlich später die Progesteron-Konzentrationen im Blut.

Bei den sieben Tieren des TK 1 wurde die spätembryonale Mortalität mittels einer zweimaligen Beprobung und Bestimmung von PAG nachgewiesen. Ein Auftreten spätembryonaler Mortalität wurde dann unterstellt, wenn bei der 2. Beprobung sowohl der PAG-Wert als auch der Ultraschallbefund für eine Trächtigkeit sprachen, bei der 3. Beprobung die PAG-Konzentration jedoch deutlich abgefallen war und die nachfolgende transrektale Palpation zwischen dem 49. und 56. Tag nach der KB die Nichtträchtigkeit bestätigte bzw. das Tier erneut zur KB vorgestellt worden war.

In vorliegender Studie wiesen ca. 7 % der mittels Ultraschall als tragend diagnostizierten Kühe (TRUS+) spätembryonale Mortalität auf. Der Wert liegt damit an der unteren Grenze der von Humblot (2001) publizierten Rate von 8 – 17,5 %.

### 5.3 Abschließende Bewertung

Der PAG-Test ist ein vielversprechendes labordiagnostisches Verfahren zur Trächtigkeitsdiagnose beim Rind. Bereits ca. 30 Tage nach der KB bis zur Abkalbung können kontinuierlich steigende Konzentrationen an PAG nachgewiesen werden. Das Problem der relativ langen Verweildauer von Rest-PAG im Blut von bis zu 100 Tagen post partum bei Kühen und die damit verbundene mögliche Verminderung der Spezifität belasteten den Test in vorliegenden Untersuchungen nur mit einem geringgradigen und noch akzeptablen Fehler. Somit können entgegen der üblichen Praxis auch früh nach Kalbung besamte Kühe sicher als nicht tragend diagnostiziert werden. Es ist deshalb die Entscheidung des Betriebsleiters, welche Ansprüche bei Anwendung des Tests in der Praxis erfüllt werden sollen.

Im hiesigen Labor konnten die beiden RIAs soweit eingerichtet werden, dass mit den Proben aus den TK 1 und TK 2 aussagekräftige und zuverlässige Ergebnisse erhalten werden konnten. Allerdings zeigte sich auch, dass trotz Einarbeitung im Labor Beckers und der hier vorliegenden großen Erfahrungen bei Durchführung von RIAs bei Einrichtung des Tests im hiesigen Labor große methodische Probleme hinsichtlich der Bindung des boPAG1-Tracers auftraten, die nicht abschließend geklärt werden konnten.

Neben den methodischen Problemen ist zudem auch die Praktikabilität der beiden RIAs wegen ihrer relativ langen Durchführungsdauer von zwei Tagen im Vergleich zu entsprechenden ELISAs zu hinterfragen. Zudem ist durch die kurze Halbwertszeit von  $^{125}\text{J}$  bei routinemäßiger Anwendung der beiden RIAs alle zwei Wochen eine Tracerherstellung notwendig, was sich nur bei einem genügend hohen Probendurchsatz rechnet.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel vorliegender Arbeit war es, zwei Radioimmunoassays (RIAs) zur Bestimmung von Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs) im Blutplasma von Rindern zur frühen Trächtigkeitsdiagnose zu etablieren und diese auf ihre Aussagekraft und Praktikabilität unter den hier gegebenen Bedingungen zu überprüfen. Gleichzeitig sollten weitere Erkenntnisse zum spätembryonalen Fruchttod sowie zur korrekten Wahl des Besamungs(KB)-Zeitpunktes erhalten werden, letzteres anhand der Messung von Progesteron.

Bei den beiden PAG-RIAs handelte es sich um boPAG1-RIA497 (RIA497) und boPAG1-RIA706 (RIA706). Bei ihnen konkurrieren bovines PAG (boPAG) aus der Probe/Standard mit  $^{125}\text{J}$  markiertem boPAG1 (boPAG1-Tracer) um Bindungsstellen an polyklonalen Antikörpern, die bei RIA497 gegen boPAG1 und bei RIA706 gegen caprines PAG(caPAG)<sub>55+62 kDa</sub> gerichtet sind. RIA497 wird im Labor Beckers (Liege, Belgien), wie von Zoli et al. (1992b) beschrieben, routinemäßig durchgeführt; mit RIA706 liegen bisher nur wenige Erfahrungen vor. Die für die Etablierung der Methodik notwendigen spezifischen Reagenzien (unter anderem aufgereinigtes boPAG1, Antiserum 497 und 706) wurden vom Labor Beckers gestellt.

Unbeschadet der dort erfolgten ersten Einarbeitung der Autorin ergaben sich erhebliche Probleme bei der Einrichtung der beiden RIAs, die sich in einer unbefriedigenden Bindung des boPAG1-Tracers an die beiden Antikörper zeigten. In den dazu durchgeführten Untersuchungen konnte das Problem nicht abschließend gelöst werden. Die beiden RIAs erfüllten nur für die Messungen der Proben aus den Tierkollektiven 1 und 2 (TK 1 und TK 2) die analytischen Qualitätskriterien, bei Messung der Proben aus Tierkollektiv 3 (TK 3) ist aufgrund der sehr geringen Bindung des boPAG1-Tracers von einer Überschätzung der gemessenen PAG-Werte auszugehen, die qualitative Aussage ist jedoch als richtig zu bezeichnen.

Die Untersuchungen erfolgten an drei Tierkollektiven. TK 3 (n = 7) diente zur Erfassung des Verlaufs der PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit, bei den Tieren aus TK 2 (n = 197, Klein- und Mittelbetriebe) und TK 1 (n = 296, Großbetriebe) sollte die Anwendbarkeit der beiden RIAs zur laborgestützten Graviditätsdiagnostik überprüft werden. Dazu wurden die PAG-Konzentrationen am Tag der KB (1. Beprobung) sowie 29 – 31 Tage danach (2. Beprobung) gemessen. Die 2. Beprobung diente zur Diagnose „tragend“/„nicht tragend“ und wurde in TK 1 mit dem Ergebnis einer transrektalen Ultraschalluntersuchung (TRUS) zum selben Zeitpunkt, in TK 2 mit

## Zusammenfassung

einer später durchgeführten transrektalen Palpation überprüft. Zur Feststellung embryonaler Mortalität erfolgte eine 3. Beprobung 39 – 53 Tage nach der KB bei zum Zeitpunkt der 2. Beprobung als tragend eingestuften Tieren.

Da einige Kühe des TK 1 sehr früh nach der Kalbung besamt worden waren und zu erwarten war, dass zum Zeitpunkt der 2. Beprobung noch Rest-PAG aus der letzten Trächtigkeit die Testergebnisse verfälscht, wurden die Tiere in Abhängigkeit von dem zu erwartenden Rest-PAG-Gehalt in die Gruppen A (kein Rest-PAG), B (möglicherweise Rest-PAG) und C (Rest-PAG vorhanden) eingeteilt.

Bei den trächtigen Tieren des TK 3 entsprach der Verlauf der PAG-Konzentrationen den Erwartungen, wobei die mit RIA706 erhaltenen Werte generell höher lagen als die mit RIA497 gemessenen Konzentrationen.

Trotz Nachweis von Rest-PAG in Gruppe C konnte in allen Gruppen des TK 1 ein signifikanter Unterschied in der PAG-Konzentration zwischen den mittels TRUS als tragend und als nicht tragend diagnostizierten Tieren festgestellt werden. Zur Charakterisierung der Zuverlässigkeit beider RIAs hinsichtlich ihrer Anwendung als Trächtigkeitsdiagnostikverfahren wurde mithilfe einer Receiver Operating Characteristic(ROC)-Analyse der Grenzwert (cut off-Punkt) ermittelt, bei dem die höchstmögliche Anzahl von Tieren vom Test als „korrekt tragend“ (Sensitivität) bzw. „korrekt nicht tragend“ (Spezifität) erkannt wurde. Beide RIAs stellten sich mit einer Sensitivität von 93,9 (RIA497) bzw. 92,9 % (RIA706) und einer Spezifität von 85,3 (RIA497) bzw. 94,1 % (RIA706) als in dieser Hinsicht zuverlässig heraus (TK 1), wobei RIA706 aufgrund der allgemein höheren Spezifität für die frühe Trächtigkeitsdiagnose geeigneter erscheint als RIA497. Ein Ausschluss der Kühe der Gruppe C (KB 40. – 60. Tag post partum) hatte – insbesondere bei RIA706 – nur einen sehr geringen bzw. praktisch keinen Einfluss auf Sensitivität bzw. Spezifität. Das Ergebnis bestätigte sich bei Einbeziehung von TK 2 in die Berechnungen. Die Progesteron-Bestimmung zum Zeitpunkt der KB zeigte, dass 6,9 bzw. 10,9 % der Tiere in TK 1 bzw. TK 2 nicht zum korrekten Zeitpunkt zur KB vorgestellt worden waren. Spätembryonale Mortalität konnte bei 7 % der Tiere des TK 1 festgestellt werden, bei einem Tier des TK 3 konnte Fruchttod anhand des PAG-Konzentrationsverlaufs dokumentiert werden.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen das hohe Potential der PAG-Analytik für die Graviditätsdiagnostik erkennen. Die bei Etablierung der beiden RIAs auftretenden methodischen Probleme stehen einer routinemäßigen Anwendung jedoch entgegen.



## 7 SUMMARY

Aim of the present study was to establish two Pregnancy Associated Glycoprotein-radioimmunoassays (PAG-RIAs) for early pregnancy diagnosis in cattle and to evaluate their reliability and practicability under local field conditions. In addition it was attempted to obtain information on embryonic mortality and, by determining progesterone, the correct choice of the day of artificial insemination (AI).

In both RIAs bovine PAG (boPAG) in the sample or standard compete with  $^{125}\text{J}$  labelled boPAG1 (boPAG1-tracer) for binding sites of a polyclonal antibody. In boPAG1-RIA497 (RIA497) the antiserum is directed against boPAG1, in boPAG1-RIA706 (RIA706) against caprine PAG (caPAG)<sub>55+62</sub> kDa. While RIA497 is routinely performed by the “laboratory Beckers” (Liege, Belgium), using the method Zoli et al. (1992b), only little experience has been gained so far with RIA706. To establish the two RIAs the essential reagents (antisera 497 and 706, boPAG1) were provided by the laboratory Beckers. Irrespectively of the training given in the laboratory Beckers, problems associated with the binding of boPAG1-tracer with the two antisera became apparent. The problem could only partially be solved and analytical reliability could only be secured for the analysis of samples from collectives 1 and 2, while the data obtained for collective 3 are less quantitative but qualitative. Investigations were performed on three animal collectives. Collective 3 ( $n = 7$ ) was used to observe PAG-concentrations throughout pregnancy, collective 2 ( $n = 197$ , small farms) and collective 1 ( $n = 296$ , large farms) were used, to test for the aptitude and reliability of the two RIAs for diagnosing early pregnancy.

The first sample was taken on the day of AI, the second sample 29 to 31 days later. PAG-concentrations measured in the second sample were used as parameters for pregnancy diagnosis. Transrectal ultrasonography (TRUS) at the time of blood sampling (collective 1) or transrectal palpation at a later point of time (collective 2) were used as confirmatory methods. To assess embryonic mortality a third sample was collected 39 – 53 days after AI from those animals found pregnant at the second sampling.

As insemination of cows from collective 1 started very early after calving (from day 40 post partum onward), it was assumed that PAGs from the preceding pregnancy could distort pregnancy diagnosis. According to the PAG-concentration expected at the second sampling, cows were assigned to the following groups: A (no residual

## Summary

PAG), B (residual PAG likely), C (residual PAG).

PAG-concentrations in collective 3 were as expected: Increasing concentrations were detectable by both RIAs, and invariably higher concentrations were measured throughout pregnancy by RIA706.

In spite of the residual PAG detected in cows of group C there were significant differences in PAG-concentration between cows diagnosed pregnant and non pregnant by TRUS.

To characterize both RIAs concerning the ability to differentiate between pregnant and non pregnant animals, the cut off-value with the highest rate of correct pregnant (sensitivity) and correct non pregnant animals (specificity) was calculated by Receiver Operating Characteristic(ROC)-analysis.

Both RIAs proved to be reliable concerning early pregnancy diagnosis (RIA497: sensitivity 93.9 %, specificity 85.3 %; RIA706 sensitivity 92.9 %, specificity 94.1 %).

RIA706 proved to be more suitable for pregnancy diagnosis than RIA497 because of higher specificity. Excluding group C (AI between 40 – 60 days after calving) from calculation did hardly influence sensitivity and specificity. These results were confirmed by including collective 2 in the statistics.

Late embryonic mortality was detectable in 7 % of the cattle in collective 1 and could be documented in one cow of collective 3.

Measuring progesterone on the day of AI illustrated that 6.9 % respectively 10.9 % of the animals of collective 1 and 2 were inseminated at an inadequate point of time. These data show the high potential of analyzing PAG for early pregnancy diagnosis, but the methodical problems that appeared militate against applying both tests routinely in this laboratory.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

AHLERS, D.; ANDRESEN, P. (1995)

Kap.: Trächtigkeit.

In: Grunert, E. (Hrsg.),

Buiatrik Band I: Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung,

Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 99-127

AHLERS, D. (1999)

Kap.: Forensik.

In: Grunert, E.; De Kruif, A. (Hrsg.),

Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind,

Parey Buchverlag Berlin, 397-416

ALEXANDER, B.M.; JOHNSON, M.S.; GUARDIA, R.O.; VAN DE GRAAF, W.L.; SENGHER, P.L.; SASSER, R.G. (1995)

Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy.

Theriogenology 43 551-556

ALOMAR, M.; SULON, J.; EL AMIRI, B.; SOUSA, N.M. (2003)

Progesterone, cortisol and pregnancy associated glycoprotein concentrations in three aborted cows.

Journee de Tencontre Bioforume, Liege, Belgium

ARNSTADT, K.I.; CLEERE, W.F. (1981)

Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows.

J. Reprod. Fert. 62 173-180

AYAD, A.; SOUSA, N.M.; SULON, J.; IGUER-OUADA, M.; BECKERS, J.F. (2007)

Comparison of five radioimmunoassay systems for PAG measurement: ability to detect early pregnancy in cows.

Reprod. Domest. Anim. 42 (4) 433-40

AYAD, A.; SOUSA, N.M.; SULON, J.; HORNICK, J.L.; IGUER-OUADA, M.;

BECKERS, J.F. (2008)

Correlation of five radioimmunoassay systems for measurement of bovine plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations at early pregnancy period.

Res. Vet. Sci. 86 (3) 377-82

BACH, J.F.; ANTOINE, B. (1968)

In vitro detection of immunosuppressive activity of anti-lymphocyte sera.

Nature 217 658-659

BAMBERG, E.; CHOI, H.S.; MÖSTL, E.; SCHARF, A. (1985)

Anwendbarkeit der Östrogenbestimmung im Kot zur Trächtigkeitsdiagnose beim Rind.

Zbl. Vet. Med. A. 32 119-122

## Literaturverzeichnis

- BAMBERG, E.; CHOI, H.S.; MÖSTL, E. (1986)  
Östrogenbestimmung im Kot zur Trächtigkeitsdiagnose bei Pferd, Rind, Schwein, Schaf und Ziege.  
Tierärztliche Umschau 6 406-408
- BAZER, F.W.; THATCHER, W.W. (1977)  
Theory of maternal recognition in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F<sub>2alpha</sub> by the uterine endometrium.  
Prostaglandins 14 (2) 397-400
- BAZER, F.W.; OTT, T.L.; SPENCER, T.E. (1994)  
Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: Signals from the trophoblast.  
Theriogenology 41 79-94
- BECKERS, J.F.; WOUTERS-BALLMAN, P.; ECTORS, F. (1988)  
Isolation and radioimmunoassay of a bovine pregnancy specific protein.  
Theriogenology 29 (1) 219 (abstract)
- BECKERS, J.F.; DRION, P.V.; GARBAYO, J.M.; PERENYI, Z.; ZARROUK, A.; SULON, J.; REMY, B.; SZENCI, O. (1999)  
Pregnancy associated glycoproteins in ruminants: inactive members of the aspartic proteinase family.  
Acta Vet. Hung. 47 (4) 461-9
- BOOTH, J.M.; DAVIES, J.; HOLDSWORTH, R.J. (1979)  
Use of the milk progesterone test for pregnancy determination.  
Br. Vet. J. 135 (5) 478-88
- BREED, M.W.; GUARD, C.L.; WHITE, M.E.; SMITH, M.C.; WARNICK, L.D. (2009)  
Comparison of pregnancy diagnosis in dairy cattle by use of a commercial ELISA and palpation per rectum.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 235 (3) 292-8
- BREUKELMAN, S.P.; SZENCI, O.; BECKERS, J.F.; KINDAHL, H.; MULDER, E.J.; JONKER, F.H.; VAN DER WEIJDEN, B.; REVY, D.; POGANY, K.; SULON, J.; NEMEDI, I.; TAVERNE, M.A. (2005)  
Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F<sub>2alpha</sub>-metabolite (PGF<sub>2alpha</sub>-metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle.  
Theriogenology 64 (4) 917-33
- BRITT, J.H. (1975)  
Early postpartum breeding in dairy cows. A review.  
J. Dairy Sci. 58 (2) 266-271
- BUTLER, J.E.; HAMILTON, W.C.; SASSER, R.G.; RUDER, C.A.; HASS, G.M.; WILLIAMS, R.J. (1982)  
Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins.  
Biol. Reprod. 26 (5) 925-33

## Literaturverzeichnis

- CAVANAGH, A.C. (1984)  
Production in vitro of mouse early pregnancy factor and purification to homogeneity.  
J. Reprod. Fert. 71 581-592
- CHEN, X.; ROSENFELD, C.S.; ROBERTS, R.M.; GREEN, J.A. (2001)  
An aspartic proteinase expressed in the yolk sac and neonatal stomach of the mouse.  
Biol. Reprod. 65 (4) 1092-101
- CHIZZONITE, R.; TRUITT, T.; DESAI, B.B.; NUNES, P.; PODLASKI, F.J.; STERN, A.S.; GATELY, M.K. (1992)  
Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts.  
J. Immunol. 148 (10) 3117-3124
- CLARKE, F.M.; MORTON, H.; ROLFE, B.E.; CLUNIE, G.J.A. (1980)  
Partial characterization of early pregnancy factor in the sheep.  
J. Reprod. Immunol. 2 151-162
- CLARKE, F.M.; WILSON, S.; MCCARTHY, R.; PERKINS, T.; OROZCO, C. (1987)  
Early pregnancy factor: large scale isolation of rosette inhibition test - active polypeptides from ovine placental extracts.  
J. Reprod. Immunol. 10 (2) 133-156
- CLAUS, R.; KARG, H.; GÜNZLER, O.; MÜLLER, S.; RATTENBERGER, E.; PIRCHNER, F. (1982)  
Kap.: Infertility screening post partum using the milkfat progesterone assay.  
In: Karg, H.; Schallenberger, E. (Hrsg.),  
Factors influencing fertility in the postpartum cow,  
Martinus Nijhoff, The Hague, Boston, London, 288-297
- DEL VECCHIO, R.P.; SUTHERLAND, W.D.; SASSER, R.G. (1995)  
Effect of pregnancy-specific protein B on luteal cell progesterone, prostaglandin, and oxytocin production during two stages of the bovine estrous cycle.  
J. Anim. Sci. 73 (9) 2662-8
- DEL VECCHIO, R.P.; SUTHERLAND, W.D.; SASSER, R.G. (1996)  
Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E<sub>2</sub>, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F<sub>2</sub> alpha.  
J. Reprod. Fert. 107 (1) 131-6
- DELONG, E.R.; DELONG, D.M.; CLARKE-PEARSON, D.L. (1988)  
Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristics curves: a nonparametric approach.  
Biometrics 44 837-845
- DERIVAUX, J.; ECTORS, F.; BECKERS, J.F. (1988)  
The ruminant placenta: Structure and endocrine function.  
State University of Liege, faculty of veterinary medicine, department of animal reproduction and obstetrics, Brussels, 29-47

## Literaturverzeichnis

- DIJKHUIZEN, A.A.; STELWAGEN, J.; RENKEMA, J.A. (1985)  
Economic aspects of reproductive failure in dairy cattle I. Financial loss at farm level.  
Prev. Vet. Med. 3 251-263
- DOBSON, H.; ROWAN, T.G.; KIPPAX, I.S.; HUMBLLOT, P. (1993)  
Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in  
cattle.  
Theriogenology 40 (2) 411-25
- DÖCKE, F. (1994)  
Kap.: Keimdrüsen - Biochemie der gonadalen Steroidhormone.  
In: Döcke, F. (Hrsg.),  
Veterinärmedizinische Endokrinologie Gustav Fischer Verlag, Jena/Stuttgart, 411-  
418
- EL AMIRI, B.; COGNIE, Y.; SULON, J.; ALVAREZ OXILEY, A.; AUREL, M.R.;  
LAGRIFFOUL, G.; DOUAIK, A.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F. (2003)  
Pregnancy-Associated Glycoprotein Concentrations in Plasma and Milk Samples for  
Early Pregnancy Diagnosis in Lacaune Dairy Sheep.  
Reprod. Domest. Anim. 38 (4) 322 (Abstract)
- FERNANDEZ-ARIAS, A.; ALABART, J.L.; FOLCH, J.; BECKERS, J.F. (1999)  
Interspecies pregnancy of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) fetus in domestic goat  
(*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy-  
associated glycoprotein.  
Theriogenology 51 (8) 1419-30
- FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W. (1987)  
Kap.: Grundbegriffe der Pharmakokinetik.  
In: Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. (Hrsg.),  
Pharmakologie und Toxikologie,  
F.A. Brockhaus AG Mannheim; Wien; Zürich, 60-64
- FRAKER, P.J.; SPECK, J.G. (1978)  
Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-  
tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril.  
Biochem Biophys Res Commun 80 (4) 849-857
- FRANCO, O.J.; DROST, M.; THATCHER, M.J.; SHILLE, V.M.; THATCHER, W.W.  
(1987)  
Fetal survival in the cow after pregnancy diagnosis by palpation per rectum.  
Theriogenology 27 (4) 631-44
- FRICKE, P.M. (2002)  
Scanning the future - ultrasonography as a reproductive management tool for dairy  
cattle.  
J. Dairy Sci. 85 (8) 1918-26

- FRIEDRICH, M.; HOLTZ, W. (2008)  
Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection.  
Reprod. Domest. Anim. 45 (1) 142-146
- GABOR, G.; TOTH, F.; OZSVARI, L.; ABONYI-TOTH, Z.; SASSER, R.G. (2007)  
Early detection of pregnancy and embryonic loss in dairy cattle by ELISA tests.  
Reprod. Domest. Anim. 42 (6) 633-6
- GAJEWSKI, Z.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; PAWLINSKI, B.; OLSZEWSKA, M.; THUN, R.; KLECZKOWSKI, M. (2008)  
Concentration of bovine pregnancy associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows.  
J. Physiol. Pharmacol. 59 (Suppl. 9) 55-64
- GAJEWSKI, Z.; PERTAJITIS, M.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; PAWLINSKI, B.; JANETT, F. (2009)  
Pregnancy associated glycoproteins as a new diagnostic tool in cattle reproduction.  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 151 (12) 577-582
- GAN, X.; XIE, S.; GREEN, J.A.; ROBERTS, R.M. (1997)  
Identification of transcripts for pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in Carnivora and Perissodactyla.  
Biol. Reprod. 56 (abstract 431)
- GARBAYO, J.M.; GREEN, J.A.; BECKERS, J.F.; ROBERTS, R.M. (1999)  
Cloning and expression of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) from the caprine placenta Biol. Reprod. 60 (1) 493 (abstract)
- GARBAYO, J.M.; GREEN, J.A.; MANIKKAM, M.; BECKERS, J.F.; KIESLING, D.O.; EALY, A.D.; ROBERTS, R.M. (2000)  
Caprine pregnancy-associated glycoproteins (PAG): their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG.  
Mol. Reprod. Dev. 57 (4) 311-22
- GARBAYO, J.M.; SERRANO, B.; AGUILAR, B.; LOPEZ-GATIUS, F. (2005)  
Identification of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) expressed by preimplantation embryos of domestic ruminants.  
direct submission to GenBank for boPAG22 (Acc.No.: AY911498)
- GONZALEZ, F.; BATISTA, M.; QUESADA, E.; CALERO, P.; GRACIA, A.; BECKERS, J.F. (2000a)  
Detection of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and ultrasonography for diagnosis of pregnancy, hydrometra and embryonic mortality in dairy goats.  
16th Annual Meeting AETE, Santander, Spain
- GONZALEZ, F.; SULON, J.; CALERO, P.; BATISTA, M.; CABRERA, F.; GRACIA, A.; GARBAYO, J.M.; BECKERS, J.F. (2000b)  
Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) detection in milk samples as an aid for pregnancy diagnosis in goats.  
7th International Conference on Goats, France

## Literaturverzeichnis

- GONZALEZ, F.; SULON, J.; CALERO, P.; BATISTA, M.; GRACIA, A.; BECKERS, J.F. (2001)  
Pregnancy-associated glycoprotein (PAG): detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats.  
*Theriogenology* 56 (4) 671-6
- GREEN, J.A.; XIE, S.; SZAFRANSKA, B.; GAN, X.; NEWMAN, A.G.; MCDOWELL, K.; ROBERTS, R.M. (1999)  
Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta.  
*Biol. Reprod.* 60 (5) 1069-77
- GREEN, J.A.; XIE, S.; QUAN, X.; BAO, B.; GAN, X.; MATHIALAGAN, N.; BECKERS, J.F.; ROBERTS, R.M. (2000)  
Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy.  
*Biol. Reprod.* 62 (6) 1624-31
- GREEN, J.A.; PARKS, T.E.; AVALLE, M.P.; TELUGU, B.P.; MCLAIN, A.L.; PETERSON, A.J.; MCMILLAN, W.; MATHIALAGAN, N.; HOOK, R.R.; XIE, S.; ROBERTS, R.M. (2005)  
The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers.  
*Theriogenology* 63 (5) 1481-503
- GREEN, J.A.; VOLKMANN, D.H.; POOCK, S.E.; MCGRATH, M.F.; EHRHARDT, M.; MOSELEY, A.E.; LUCY, M.C. (2009)  
Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle.  
*J. Dairy Sci.* 92 (8) 3819-24
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. (1988)  
In-vitro steroid synthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition.  
*J. Reprod. Fert.* 83 (2) 565-573
- GUILBAULT, L.A.; BECKERS, J.F.; LAPIERRE, S.; ZOLI, A.P.; BENITES, W.; ROY, G.L. (1991)  
Peripartum concentrations of placental protein hormones (bPL and bPAG) in Holstein and Hereford recipients carrying purebred Holstein fetuses.  
*Theriogenology* 35 (1) 208-208
- GÜNZLER, O.; KORNDÖRFER, L.; LOHOFF, H.; HAMBURGER, R.; HOFFMANN, B. (1975)  
Praktische Erfahrungen mit der Progesteronbestimmung in der Milch zur Erfassung des Fertilitätszustandes bei der Kuh.  
*Tierärztl. Umschau* 30 111-127



## Literaturverzeichnis

- GURUPRASAD, K.; BLUNDELL, T.L.; XIE, S.; GREEN, J.A.; SZAFRANSKA, B.; NAGEL, R.J.; MCDOWELL, K.; BAKER, C.B.; ROBERTS, R.M. (1996)  
Comparative modelling and analysis of amino acid substitutions suggests that the family of pregnancy-associated glycoproteins includes both active and inactive aspartic proteinases.  
Protein Eng. 9 (10) 849-56
- HAMON, M.; FLEET, I.R.; HOLDSWORTH, R.J.; HEAP, R.B. (1981)  
The time of detection of oestrone sulphate in milk and the diagnosis of pregnancy in cows.  
Br. Vet. J. 137 (1) 71-7
- HEAP, R.B.; HOLDSWORTH, R.J.; GADSBY, J.E.; LAING, J.A.; WALTERS, D.E. (1976)  
Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration.  
Br. Vet. J. 132 (5) 445-64
- HEAP, R.B.; HAMON, M. (1979)  
Oestrone sulphate in milk as an indicator of a viable conceptus in cows.  
Br. Vet. J. 135 (4) 355-63
- HEAP, R.B.; HOLDSWORTH, R.J. (1981)  
Modern diagnostic methods in practice: hormone assays in reproduction and fertility.  
Br. Vet. J. 137 (6) 561-71
- HEUWIESER, W.; MÜLLER, K. (2000)  
Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall beim Rind.  
Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 1-77
- HOEDEMAKER, M.; MANSFELD, R.; DE KRUIF, A.; HEUWIESER, W. (2007)  
Kap.: Ergebnisinterpretation und Strategien - Betrachtung einzelner Kontrollbereiche - Fruchtbarkeit.  
In: De Kruif, A.; Mansfeld, R.; Hoedemaker, M. (Hrsg.),  
Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind,  
Enke Verlag, Stuttgart, 30-71
- HOFFMANN, B. (1971)  
Embryonaler Fruchttod bei einer Kuh im Anschluß an eine Nachbesamung-  
nachgewiesen mit Hilfe der Progesteronbestimmung im Blut.  
Zuchthyg. 6 134-138
- HOFFMANN, B.; HAMBURGER, R. (1973)  
Progesteron in der Milch: Radioimmunologische Bestimmung, Beziehungen zur  
Gelbkörperfunktion und Milchfettkonzentration.  
Zuchthyg. 8 154-162
- HOFFMANN, B.; KYREIN, H.J.; ENDER, M.L. (1973)  
An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay  
applied to bovine peripheral plasma.  
Hormone Res. 4 302-310

## Literaturverzeichnis

HOFFMANN, B.; HAMBURGER, R.; GÜNZLER, O.; KORNDÖRFER, L.; LOHOFF, H. (1974)

Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow.  
*Theriogenology* 2 (1-2) 21-28

HOFFMANN, B. (1977)

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind,  
Entwicklung von Messverfahren und physiologischen Daten.  
*Fortschritte der Veterinärmedizin* 26, Beiblatt zum Zentralblatt der Veterinärmedizin,  
Paul Parey Verlag

HOFFMANN, B.; GUNZLER, O.; HAMBURGER, R.; SCHMIDT, W. (1976)

Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological  
approaches and present status of application in Germany.

*Br. Vet. J.* 132 (5) 469-76

HOFFMANN, B.; KARG, H. (1976)

Metabolic fate of anabolic agents in treated animals and residue levels in their meat.  
*Environ. Qual. Saf. Suppl.* (5) 181-91

HOFFMANN, B.; WAGNER, W.C.; HIXON, J.E.; BAHR, J. (1979)

Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta  
around parturition in the cow.

*Anim. Reprod. Sci.* 2 (1-3) 253-266

HOFFMANN, B. (1994)

Kap.: Gravidität, Geburt und Puerperium.

In: Döcke, F. (Hrsg.),

*Veterinärmedizinische Endokrinologie,*

Gustav Fischer Verlag, Jena/Stuttgart, 509-546

HOFFMANN, B.; PINHO DE, T.G.; SCHULER, G. (1997)

Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces  
and urine of cattle throughout pregnancy.

*Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105 296-303

HUGHES, A.L.; GREEN, J.A.; GARBAYO, J.M.; ROBERTS, R.M. (2000)

Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placentally  
expressed genes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (7) 3319-23

HUGHES, A.L.; GREEN, J.A.; PIONTKIVSKA, H.; ROBERTS, R.M. (2003)

Aspartic proteinase phylogeny and the origin of pregnancy-associated glycoproteins.

*Mol. Biol. Evol.* 20 (11) 1940-5

HUMBLOT, P.; CAMOUS, S.; MARTAL, J.; CHARLERY, J.; JEANGUYOT, N.;

THIBIER, M.; SASSER, G. (1988a)

Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the  
plasma of dairy cows.

*Theriogenology* 30 (2) 257-67

## Literaturverzeichnis

HUMBLOT, P.; CAMOUS, S.; MARTAL, J.; CHARLERY, J.; JEANGUYOT, N.; THIBIER, M.; SASSER, R.G. (1988b)  
Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows.  
J. Reprod. Fertil. 83 (1) 215-23

HUMBLOT, P. (2001)  
Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants.  
Theriogenology 56 (9) 1417-33

IKEMIZU, Y.; ITO, K.; KAWAHATA, K.; GOTO, T.; TAKAHASHI, J.; YASUDA, Y. (1994)  
Study of EPF-like substance(s) detected in fertilized bovine ovum culture medium.  
J. Reprod. Dev. 40 (1) 7-11

ITO, K.; YASUDA, Y. (1992)  
Bovine early pregnancy factor: Purification and biochemical examination.  
J. Reprod. Dev. 38 (6) j39-j48 (abstract)

KAGEYAMA, T.; TANABE, K.; KOIWAI, O. (1990)  
Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development.  
J. Biol. Chem. 265 (28) 17031-8

KAGEYAMA, T.; ICHINOSE, M.; TSUKADA-KATO, S.; OMATA, M.; NARITA, Y.; MORIYAMA, A.; YONEZAWA, S. (2000)  
Molecular cloning of neonate/infant-specific pepsinogens from rat stomach mucosa and their expressional change during development.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 267 (3) 806-12

KÄHN, W. (1997)  
Kap.: Ultraschalldiagnostik an Uterus, Fetus und Ovarien.  
In: Braun, U. (Hrsg.),  
Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik beim Rind,  
Parey Verlag, Berlin, 207-225

KARG, H.; HOFFMANN, B.; SCHAMS, D. (1969)  
Verlauf der Blutspiegel an Progesteron, Luteinisierungshormon und Prolaktin während des Zyklus bei einer Kuh.  
Zuchthyg. 4 149-153

KARG, H. (1994)  
Kap.: Hormonanalytische Kontrolle von Fortpflanzungsfunktionen.  
In: Döcke, F. (Hrsg.),  
Veterinärmedizinische Endokrinologie,  
Gustav Fischer Verlag Jena/Stuttgart, 766-773

## Literaturverzeichnis

- KASTELIC, J.P.; NORTHEY, D.L.; GINTHER, O.J. (1991)  
Spontaneous embryonic death on Days 20 to 40 in heifers.  
*Theriogenology* 35 (2) 351-63
- KIRACOFÉ, G.H.; WRIGHT, J.M.; SCHALLES, R.R.; RUDER, C.A.; PARISH, S.;  
SASSER, R.G. (1993)  
Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows.  
*J. Anim. Sci.* 71 (8) 2199-205
- KLIMA, F.; TIEMANN, U.; SCHADOW, D.; FASINSKI, M.; SAVOLY, S.B.; LOOSE,  
R.; PITRA, C. (1992)  
Bovine pregnancy factor (EPF) activity dependent on a 67-kDa polypeptide.  
*J. Reprod. Immunol.* 21 57-70
- KLISCH, K.; BOOS, A.; FRIEDRICH, M.; HERZOG, K.; FELDMANN, M.; SOUSA, N.;  
BECKERS, J.; LEISER, R.; SCHULER, G. (2006)  
The glycosylation of pregnancy-associated glycoproteins and prolactin-related  
protein-I in bovine binucleate trophoblast giant cells changes before parturition.  
*Reproduction* 132 (5) 791-8
- KOCH, E.; ELLENDORFF, F. (1982)  
Early pregnancy factor (EPF): Mögliche biologische und klinische Bedeutung.  
*Dtsch. tierärztl. Wschr.* 89 253-258
- KYREIN, H.J. (1983)  
Der Radioimmunoassay für Steroidhormone: Grundlagen, Entwicklung und  
Anwendung radioimmunologischer Testverfahren. Teil I: Grundlagen.  
*Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 177 415-425
- LEE, C.S.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M.R. (1986)  
Comparative studies on the distribution of binucleate cells in the placentae of the  
deer and cow using the monoclonal antibody, SBU-3.  
*J. Anat.* 147 163-79
- LOPEZ-GATIUS, F.; GARBAYO, J.M.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.; AYAD, A.;  
SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F. (2007a)  
Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated  
glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live  
fetuses.  
*Domest. Anim. Endocrinol.* 32 (1) 29-42
- LOPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.; GARBAYO, J.M.; SANTOLARIA, P.; YANIZ, J.;  
SERRANO, B.; AYAD, A.; SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F. (2007b)  
Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high  
producing dairy cows suffering early fetal loss during the warm season.  
*Theriogenology* 67 (8) 1324-30
- LYNCH, R.A.; ALEXANDER, B.M.; SASSER, R.G. (1992)  
The cloning and expression of the bovine pregnancy specific protein B (bPSPB)  
gene.  
*Biol. Reprod.* 46 (Suppl. 1, abstract 89) 73

## Literaturverzeichnis

- MANSFELD, R.; HOEDEMAKER, M.; DE KRUIF, A. (2007)  
Kap.: Zucht, Selektion und Bullenauswahl.  
In: De Kruif, A.; Mansfeld, R.; Hoedemaker, M. (Hrsg.),  
Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind,  
Stuttgart, 223
- MARCHALONIS, J.J. (1969)  
An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.  
Biochem. J. 113 299-305
- MATAMOROS, R.A.; CAAMANO, L.; LAMB, S.V.; REIMERS, T.J. (1994)  
Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro.  
Biol. Reprod. 51 (3) 486-492
- MEHTA, A.R.; EESSALU, T.E.; AGGARWAL, B.B. (1989)  
Purification and characterization of early pregnancy factor from human pregnancy sera.  
J. Biol. Chem. 264 (4) 2266-2271
- METELO, R.; SILVA, S.; SULON, J.; BECKERS, J.F.; MOREIRA DA SILVA, F. (2004)  
Determination of pregnancy-associated glycoproteins in cow's milk.  
23rd World Buiatrics Congress, Quebec, Canada
- MIALON, M.M.; CAMOUS, S.; RENAND, G.; MARTAL, J.; MENISSIER, F. (1993)  
Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle.  
Reprod. Nutr. Dev. 33 (3) 269-82
- MIALON, M.M.; RENAND, G.; CAMOUS, S.; MARTAL, J.; MENISSIER, F. (1994)  
Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy serum protein (PSP60) in cattle.  
Reprod. Nutr. Dev. 34 (1) 65-72
- MOELLMANN, U. (1991)  
Vergleichende Untersuchungen zum Reproduktionszyklus bei Rhön- und Merinolandschafen.  
Diss. med. vet., Giessen
- MORGAN, G.; WOODING, F.B. (1983)  
Cell migration in the ruminant placenta: a freeze-fracture study.  
J. Ultrastruct. Res. 83 (2) 148-60
- MORGAN, G.; WOODING, F.B.; BRANDON, M.R. (1987)  
Immunogold localization of placental lactogen and the SBU-3 antigen by cryoultramicrotomy at implantation in the sheep.  
J. Cell. Sci. 88 (Pt. 4) 503-12

## Literaturverzeichnis

- MORGAN, G.; WOODING, F.B.; BECKERS, J.F.; FRIESEN, H.G. (1989)  
An immunological cryo-ultrastructural study of a sequential appearance of proteins in placental binucleate cells in early pregnancy in the cow.  
J. Reprod. Fertil. 86 (2) 745-52
- MORRISON, M.; BAYSE, G.S. (1970)  
Catalysis of iodination by lactoperoxidase.  
Biochemistry 9 (15) 2995-3000
- MORTON, H.; HEGH, V.; CLUNIE, G.J.A. (1974)  
Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test.  
Nature (Lond.) 249 459-460
- MORTON, H.; HEGH, V.; CLUNIE, G.J.A. (1976)  
Studies of the rosette inhibition test in pregnant mice: evidence of immunosuppression?  
Proc. R. Soc. Lond. B193 413-419 (abstract)
- MORTON, H.; ROLFE, B.; CLUNIE, G.J.A.; ANDERSON, M.J.; MORRISON, J. (1977)  
An early pregnancy factor detected in human serum by rosette inhibition test.  
Lancet 309 (8008) 394-397
- MORTON, H.; NANCARROW, C.D.; SCARAMUZZI, R.J.; EVISON, B.M.; CLUNIE, G.J.A. (1979)  
Detection of early pregnancy in sheep by rosette inhibition test.  
J. Reprod. Fert. 56 75-80
- MORTON, H.; MORTON, D.J.; ELLENDORFF, F. (1983)  
The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig.  
J. Reprod. Fert. 68 437-446
- MORTON, H. (1998)  
Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue.  
Immunol. Cell Biol. 76 483-496
- MÖSTL, E.; CHOI, H.S.; WURM, W.; ISMAIL, N.; BAMBERG, E. (1984)  
Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 alpha in faeces.  
Br. Vet. J. 140 (3) 287-91
- MÜLLER, K.; DRILLICH, M.; TENHAGEN, B.-A.; HEUWIESER, W. (1999)  
Genauigkeit und Wirtschaftlichkeit einer Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall zwischen dem 20. und 34. Tag nach der künstlichen Besamung beim Rind, Teil 1: Genauigkeit.  
Der praktische Tierarzt 80 (12) 1095-1100
- NANCARROW, C.D.; SHARAF, M.A.; SWEET, F. (1981)  
Purification of 20 alpha-hydroxysteroid oxidoreductase from bovine fetal erythrocytes  
Steroids 37 (5) 539-53

## Literaturverzeichnis

- NOONAN, F.P.; HALLIDAY, W.J.; MORTON, H.; CLUNIE, G.J.A. (1979)  
Early pregnancy factor is immunosuppressive.  
Nature (Lond.) 278 649-650
- OHNUMA, K.; ITO, K.; MIYAKE, Y.I.; TAKAKASHI, J.; YASUDA, Y. (1996)  
Detection of early pregnancy factor (EPF) in mare sera.  
J. Reprod. Dev. 42 23-28
- PABST, W. (2005)  
Kap.: Rinderproduktion.  
In: Weiß, J.; Pabst, W.; Strack, K.E.; Granz, S. (Hrsg.),  
Tierproduktion,  
Parey Verlag, Stuttgart, 355-362
- PAISLEY, L.G.; MICKELSEN, W.D.; FROST, O.L. (1978)  
A survey of the incidence of prenatal mortality in cattle following pregnancy diagnosis  
by rectal palpation.  
Theriogenology 9 (6) 481-491
- PANASIEWICZ, G.; MAJEWSKA, M.; SZAFRANSKA, B. (2004)  
Trophoblastic cDNA cloning of porcine pregnancy-associated glycoprotein genes  
(pPAG) and in silico analysis of coded polypeptide precursors.  
Reprod. Biol. 4 (2) 131-41
- PATE, J.L.; CONDON, W.A. (1982)  
Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells.  
Mol. Cell. Endocrinol. 28 551-562
- PATEL, O.V.; DOMEKI, I.; SASAKI, N.; TAKAHASHI, T.; HIRAKO, M.; SASSER,  
R.G.; HUMBLLOT, P. (1995)  
Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy-specific protein B  
concentrations in the bovine.  
Theriogenology 44 (6) 827-33
- PATEL, O.V.; SULON, J.; BECKERS, J.F.; TAKAHASHI, T.; HIRAKO, M.; SASAKI,  
N.; DOMEKI, I. (1997)  
Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout  
gestation in relationship to fetal number in the cow.  
Eur. J. Endocrinol. 137 (4) 423-8
- PATEL, O.V.; CAMOUS, S.; TAKENOUCHE, N.; TAKAHASHI, T.; HIRAKO, M.;  
SASAKI, N.; DOMEKI, I. (1998)  
Effect of stage of gestation and foetal number on plasma concentrations of a  
pregnancy serum protein (PSP-60) in cattle.  
Res. Vet. Sci. 65 (3) 195-9
- PENNINGTON, J.A.; SPAHR, S.L.; LODGE, J.R. (1975)  
Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk.  
J. Dairy Sci. 59 (8) 1528-1531

## Literaturverzeichnis

- PENNINGTON, J.A.; SPAHR, S.L.; LODGE, J.R. (1976)  
Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle.  
Br. Vet. J. 132 (5) 487-96
- PERENYI, Z.S.; SZENCI, O.; DRION, P.V.; BANGA-MBOKO, H.; SOUSA, N.M.; EL AMIRI, B.; BECKERS, J.F. (2002a)  
Aspartic proteinase members secreted by the ruminant placenta: specificity of three radioimmunoassay systems for the measurement of pregnancy-associated glycoproteins.  
Reprod. Domest. Anim. 37 (6) 324-9
- PERENYI, Z.S.; SZENCI, O.; SULON, J.; DRION, P.V.; BECKERS, J.F. (2002b)  
Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma.  
Reprod. Domest. Anim. 37 (2) 100-4
- PIECHOTTA, M.; BOLLWEIN, J.; FRIEDRICH, M.; HEILKENBRINKER, T.; PASSAVANT, C.; BRANEN, J.; SASSER, R.G.; HOEDEMAKER, M.; BOLLWEIN, H. (2011)  
Comparison of commercial ELISA blood tests for early pregnancy detection in dairy cows.  
J. Reprod. Dev. 57 (1) 72-75
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. (1984a)  
Ultrasonography of the bovine ovary.  
Theriogenology 21 (3) 495-504
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. (1984b)  
Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers.  
Theriogenology 22 (2) 225-33
- PIETERSE, M.C.; SZENCI, O.; WILLEMSE, A.H.; BAJCSY, C.S.; DIELEMAN, S.J.; TAVERNE, M.A. (1990)  
Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test.  
Theriogenology 33 (3) 697-707
- POPE, G.S.; GUPTA, S.K.; MUNRO, I.B. (1969)  
Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomized cows.  
J. Reprod. Fertil. 20 (3) 369-81
- POPE, G.S. (1982)  
Kap.: Oestrogens and progesterone in plasma and milk of post-partum dairy cattle.  
In: Karg, H.; Schallenberger, E. (Hrsg.),  
Factors influencing fertility in the postpartum cow,  
Martinus Nijhoff publishers, The Hague, Boston, London, 248-276



## Literaturverzeichnis

- PRAKASH, B.S.; MEYER, H.H.D.; VAN DE WIEL, D.F.M. (1988)  
Sensitive enzyme immunoassay of progesterone in skim milk using second-antibody technique.  
Anim. Reprod. Sci. 16 (225-235)
- RANILLA, M.J.; GEBBIE, F.E.; KING, M.E.; CAROLAN, C.; SINCLAIR, K.D.; WATT, R.G.; DOLMAN, D.F.; BECKERS, J.F.; ROBINSON, J.J. (1998)  
The incidence of embryo and fetal loss following the transfer of in vitro-cultured sheep embryos.  
Theriogenology 49 (1) 248-248
- RATCLIFFE, J.G. (1974)  
Radioimmunoassay and saturation analysis: separation techniques in saturation analysis.  
Br. Med. Bull. 30 (1) 32-37
- REIMERS, T.J.; ULLMANN, M.B.; HANSEL, W. (1985)  
Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells.  
Biol. Reprod. 33 (5) 1227-36
- ROBERTS, R.M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. (1996)  
Maternal recognition of pregnancy.  
Biol. Reprod. 54 294-302
- ROBERTSON, H.A.; KING, G.J. (1974)  
Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17beta and of oestrone sulphate in the pig at implantation, during pregnancy and at parturition.  
J. Reprod. Fertil. 40 (1) 133-41
- ROBERTSON, H.A.; KING, G.J. (1979)  
Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy.  
J. Reprod. Fertil. 55 (2) 463-70
- ROBINSON, R.S.; HAMMOND, A.J.; WATHES, D.C.; HUNTER, M.G.; MANN, G.E. (2008)  
Corpus luteum- endometrium-embryo interactions in the dairy cow: Underlying mechanisms and clinical relevance.  
Reprod. Dom. Anim. 43 (Suppl. 2) 104-112
- RÖHRMÖSER, G.; MISCHKE, G.; PILSL, F.; STROBL, H. (2009)  
Jahresbericht - Rinderzucht, Besamung, Embryotransfer in Bayern 2008.  
Arbeitsgemeinschaft der Besamungsstationen in Bayern e.V.  
Landesverband Bayerischer Rinderzüchter e.V., München, 24
- ROMAGNOLO, D.; NEBEL, R.L. (1993)  
The accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination progesterone test for the validation of estrus and early pregnancy diagnosis in dairy cattle.  
Theriogenology 39 1121-1128

## Literaturverzeichnis

- ROMANO, J.E.; THOMPSON, J.A.; KRAEMER, D.C.; WESTHUSIN, M.E.; FORREST, D.W.; TOMASZWESKI, M.A. (2007)  
Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: influence on embryo/fetal viability in dairy cattle.  
Theriogenology 67 (3) 486-93
- ROMANO, J.E.; LARSON, J.E. (2010)  
Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle.  
Theriogenology 74 (6) 932-9
- SAKONJU, I.; ENOMOTO, S.; KAMIMURA, S.; HAMANA, K. (1993)  
Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor.  
J. Vet. Med. Sci. 55 (2) 271-274
- SASSER, R.G.; RUDER, C.A.; IVANI, K.A.; BUTLER, J.E.; HAMILTON, W.C. (1986)  
Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation.  
Biol. Reprod. 35 (4) 936-42
- SCHNORR, B.; KRESSIN, M. (2006)  
Embryologie der Haustiere - Einleitung.  
Enke Verlag, Stuttgart, 1
- SEMAMBO, D.K.; ECKERSALL, P.D.; SASSER, R.G.; AYLIFFE, T.R. (1992)  
Pregnancy-specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*.  
Theriogenology 37 (3) 741-8
- SHEMESH, M.; AYALON, N.; LINDNER, H.R. (1968)  
Early effect of conceptus on plasma progesterone level in the cow.  
J. Reprod. Fertil. 15 (1) 161-4
- SHEMESH, M. (1978)  
Milk progesterone measurement in dairy cows: correlation with estrus and pregnancy determination.  
Theriogenology 9 (4) 343-352
- SILVA, E.; STERRY, R.A.; KOLB, D.; MATHIALAGAN, N.; MCGRATH, M.F.; BALLAM, J.M.; FRICKE, P.M. (2007)  
Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination.  
J. Dairy Sci. 90 (10) 4612-22
- SOBIRAJ, A.; SEYREK-INTAS, K.; WOLLGARTEN, B.; TADAY, B. (1995)  
Die Anwendungseignung aktueller Milchprogesteron-Schnelltests für Rinder im Vergleich zu einer laborgebundenen Routinemethode.  
Tierärztl. Prax. 23 32-36

## Literaturverzeichnis

- SOUSA, N.M.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F. (2001)  
Placental proteins in ruminants: biochemical, physiological and zootechnical aspects.  
Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 179-208
- SOUSA, N.M.; AYAD, A.; BECKERS, J.F.; GAJEWSKI, Z. (2006)  
Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants.  
J. Physiol. Pharmacol. 57 (Suppl. 8) 153-71
- SOUSA, N.M.; BECKERS, J.F.; GAJEWSKI, Z. (2008)  
Current trends in follow-up of trophoblastic function in ruminant species.  
J. Physiol. Pharmacol. 59 (Suppl. 9) 65-74
- SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. (2004)  
Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy.  
Reprod. Biol. Endocrinol. 2 (49)
- SPRAGUE, E.A.; HOPWOOD, M.L.; NISWENDER, G.D.; WILTBANK, J.N. (1971)  
Progesterone and luteinizing hormone levels in peripheral blood of cycling beef cows.  
J. Anim. Sci. 33 (1) 99-103
- STABENFELDT, G.H.; EWING, L.L.; MCDONALD, L.E. (1969)  
Peripheral plasma progesterone levels during the bovine oestrous cycle.  
J. Reprod. Fertil. 19 (3) 433-42
- STRECKER, H.; HACHMANN, H.; SEIEL, L. (1979)  
Der Radioimmunotest (RIA), eine hochspezifische, extrem empfindliche quantitative  
Analysemmethode.  
Chemiker Zeitung 103 53-68
- SUEOKA, K.; DHARMARAJAN, A.M.; MICHAEL, E.; ATLAS, S.J.; WALLACH, E.E.  
(1988)  
Detection of early pregnancy factor (EPF) using the rabbit ovary and oviduct  
perfused in vitro.  
J. Reprod. Fert. 84 325-331
- SZENCI, O.; BECKERS, J.F.; HUMBLLOT, P.; SULON, J.; SASSER, G.; TAVERNE,  
M.A.; VARGA, J.; BALTUSEN, R.; SCHEKK, G. (1998a)  
Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine  
pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows.  
Theriogenology 50 (1) 77-88
- SZENCI, O.; TAVERNE, M.A.; BECKERS, J.F.; SULON, J.; VARGA, J.;  
BORZSONYI, L.; HANZEN, C.; SCHEKK, G. (1998b)  
Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows by measuring plasma levels  
of bovine pregnancy-associated glycoprotein 1.  
Vet. Rec. 142 (12) 304-6

## Literaturverzeichnis

- SZENCI, O.; HUMBLLOT, P.; BECKERS, J.F.; SASSER, G.; SULON, J.; BALTUSEN, R.; VARGA, J.; BAJCSY, C.A.; TAVERNE, M.A. (2000)  
Plasma profiles of progesterone and conceptus proteins in cows with spontaneous embryonic/fetal mortality as diagnosed by ultrasonography.  
Vet. J. 159 (3) 287-90
- SZENCI, O.; BECKERS, J.F.; SULON, J.; BEVERS, M.M.; BORZSONYI, L.; FODOR, L.; KOVACS, F.; TAVERNE, M.A. (2003)  
Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy associated glycoprotein 1 in heifers.  
Vet. J. 165 (3) 307-13
- TAVERNE, M.A.; NAAKTGEBOREN, C.; ELSAESSER, F.; FORSLING, M.L.; VAN DER WEYDEN, G.C.; ELLENDORFF, F.; SMIDT, D. (1979)  
Myometrial electrical activity and plasma concentrations of progesterone, estrogens and oxytocin during late pregnancy and parturition in the miniature pig.  
Biol. Reprod. 21 1125-1134
- THOMPSON, J.A.; MARSH, W.E.; CALVIN, J.A.; ETHERINGTON, W.G.; MOMONT, H.W.; KINSEL, M.L. (1994)  
Pregnancy attrition associated with pregnancy testing by rectal palpation.  
J. Dairy Sci. 11 (11) 3382-3387
- THORELL, J.I.; JOHANSSON, B.G. (1971)  
Enzymatic iodination of polypeptides with <sup>125</sup>J to high specific activity.  
Biochim. Biophys. Acta 251 363-369
- THURMOND, M.C.; PICANSO, J.P. (1993)  
Fetal loss associated with palpation per rectum to diagnose pregnancy in cows.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 203 (3) 432-435
- TIEMANN, U.; KLIMA, F. (1985)  
Untersuchungen zum Nachweis des Frühträchtigkeitsfaktors bei Schwein und Rind mit Hilfe des Rosettenhemmtestes.  
Mh. Vet. Med. 40 739-743
- USHIZAWA, K.; HERATH, C.B.; KANEYAMA, K.; SHIOJIMA, S.; HIRASAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; OCHIAI, K.; TOKUNAGA, T.; TSUNODA, Y.; TSUJIMOTO, G.; HASHIZUME, K. (2004)  
cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period.  
Reprod. Biol. Endocrinol. 2 (77)
- VAILLANCOURT, D.; BIERSCHWAL, C.J.; OGWU, D.; ELMORE, R.G.; MARTIN, C.E.; SHARP, A.J.; YOUNGQUIST, R.S. (1979)  
Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 175 (5) 466-8

## Literaturverzeichnis

- VAN CLEEFF, J.; DROST, M.; THATCHER, W.W. (1991)  
Effects of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous responses of dairy heifers.  
*Theriogenology* 36 (5) 795-807
- VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; MARQUES, C.C.; SASSER, R.G.; HUMBLLOT, P. (1995)  
Levels of bPSPB throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM/IVF cattle embryos.  
*Anim. Reprod. Sci.* 38 (4) 279-289
- VELLE, W. (1976)  
Endogenous anabolic agents in farm animals.  
*Environ. Qual. Saf. Suppl.* 5 159-70
- WANGO, E.O.; WOODING, F.B.; HEAP, R.B. (1990)  
The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study.  
*J. Anat.* 171 241-57
- WHITE, M.E.; LAFAUNCE, N.; MOHAMMED, H.O. (1989)  
Optimal time postbreeding for pregnancy examination in dairy cattle.  
*Can. Vet. J.* 30 (2) 147-149
- WHITLOCK, B.K.; MAXWELL, H.S. (2008)  
Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle.  
*Theriogenology* 70 (3) 550-9
- WILSON, S.; MCCARTHY, R.; CLARKE, F.M. (1983)  
In search of early pregnancy factor: isolation of active polypeptides from pregnant ewes' sera.  
*J. Reprod. Immunol.* 5 275-286
- WOODING, F.B.; CHAMBERS, S.G.; PERRY, J.S.; GEORGE, M.; HEAP, R.B. (1980)  
Migration of binucleate cells in the sheep placenta during normal pregnancy.  
*Anat. Embryol.* 158 (3) 361-70
- WOODING, F.B.; WATHES, D.C. (1980)  
Binucleate cell migration in the bovine placentome.  
*J. Reprod. Fertil.* 59 (2) 425-30
- WOODING, F.B. (1984)  
Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep.  
*Am. J. Anat.* 170 (2) 233-50
- WOODING, F.B.; FLINT, A.P.; HEAP, R.B.; MORGAN, G.; BUTTLE, H.L.; YOUNG, I.R. (1986)  
Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats.  
*J. Reprod. Fertil.* 76 (2) 499-512

## Literaturverzeichnis

WOODING, F.B. (1992)

Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production.

Placenta 13 (2) 101-13

WOODING, F.B.; ROBERTS, R.M.; GREEN, J.A. (2005)

Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications.

Placenta 26 (10) 807-27

XIE, S.C.; LOW, B.G.; NAGEL, R.J.; KRAMER, K.K.; ANTHONY, R.V.; ZOLI, A.P.; BECKERS, J.F.; ROBERTS, R.M. (1991)

Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (22) 10247-51

XIE, S.C.; LOW, B.G.; NAGEL, R.J.; BECKERS, J.F.; ROBERTS, R.M. (1994)

A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm.

Biol. Reprod. 51 (6) 1145-53

XIE, S.C.; GREEN, J.; BAO, B.; BECKERS, J.F.; VALDEZ, K.E.; HAKAMI, L.; ROBERTS, R.M. (1997a)

Multiple pregnancy-associated glycoproteins are secreted by day 100 ovine placental tissue.

Biol. Reprod. 57 (6) 1384-93

XIE, S.C.; GREEN, J.; BIXBY, J.B.; SZAFRANSKA, B.; DEMARTINI, J.C.; HECHT, S.; ROBERTS, R.M. (1997b)

The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (24) 12809-16

YAMAZAKI, S.; KAWAHATA, K.; GOTO, T.; TAKAHASHI, J.; YASUDA, Y. (1995)

EPF as a marker for early embryonic losses in repeat breeders.

J. Reprod. Dev. 41 (2) 129-132

YOSHIOKA, K.; IWAMURA, S.; KAMOMAE, H. (1995)

Application of anti-bovine CD2 monoclonal antibody to the rosette inhibition test for detection of early pregnancy factor in cattle.

J. Vet. Med. Sci. 57 (4) 721-725

YUSUF, M.; TOSHIHIKO, N.; BIMALKA KUMARI RANASINGHE, R.M.S.; GAUTAM, G.; LONG, S.T.; YOSHIDA, C.; KOIKE, K.; HAYASHI, A. (2010)

Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds.

Theriogenology 73 1220-1229

## Literaturverzeichnis

- ZARROUK, A.; ENGELAND, I.; SULON, J.; BECKERS, J.F. (1999a)  
Determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in goats (*Capra hircus*) with unsuccessful pregnancies: a retrospective study.  
*Theriogenology* 51 (7) 1321-31
- ZARROUK, A.; ENGELAND, I.V.; SULON, J.; BECKERS, J.F. (1999b)  
Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondii* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study.  
*Theriogenology* 52 (6) 1095-104
- ZOLI, A.P.; BECKERS, J.F.; ECTORS, F. (1990)  
Evidence of a protein immunologically related to pregnancy specific proteins in ruminant gonads.  
Third international ruminant reproduction symposium, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Belgium
- ZOLI, A.P.; BECKERS, J.F.; WOUTERS-BALLMAN, P.; CLOSSET, J.; FALMAGNE, P.; ECTORS, F. (1991)  
Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein.  
*Biol. Reprod.* 45 (1) 1-10
- ZOLI, A.P.; DEMEZ, P.; BECKERS, J.F.; REZNIK, M.; BECKERS, A. (1992a)  
Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome.  
*Biol. Reprod.* 46 (4) 623-9
- ZOLI, A.P.; GUILBAULT, L.A.; DELAHAUT, P.; ORTIZ, W.B.; BECKERS, J.F. (1992b)  
Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis.  
*Biol. Reprod.* 46 (1) 83-92
- ZÖLLNER, U. (2006a)  
Neuer Trächtignachweis in Göttingen entwickelt.  
*Landpost* 26-27
- ZÖLLNER, U. (2006b)  
Verlässliche Ergebnisse ab dem 30. Trächtigkeitstag - Universität Göttingen hat neuen Trächtignachweis entwickelt. .  
*LW* 35 25-26

## Danksagung

An dieser Stelle danke ich all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders herzlich möchte ich mich aber bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann bedanken für die unermüdliche Geduld und die stets gewährte Unterstützung und Ermutigung bei Durchführung, Abfassen und Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Wehrend danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die finanzielle Unterstützung, Beratung und Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J.-F. Beckers und seiner Frau Dr. N. Melo de Sousa danke ich recht herzlich für die Überlassung der RIA-spezifischen Reagenzien, die Einarbeitung in die beiden RIAs in ihrem Labor in Liege, für ihren Rat bei methodischen Schwierigkeiten und ihre Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes dort.

Prof. Dr. G. Schuler sei herzlichst gedankt für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der experimentellen Arbeit im Strahlencentrum.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der ZBB des Strahlencentrums Gießen, insbesondere bei Herrn G. Weigand, aber auch bei Herrn Dr. S. Lugert vom Strahlenschutz für ihren Rat und ihre Unterstützung.

Ich danke dem Landesverband Thüringer Rinderzüchter (LTR), insbesondere Herrn Dr. A. Ahrens, der mir die Untersuchung dreier Rinderherden in Thüringen ermöglichte. Den Herdenmanagern Ellen Weigert, Frank Amend und Jörg Hinz dieser drei Rinderbetriebe danke ich recht herzlich für ihre Unterstützung.

Insbesondere bedanke ich mich auch bei Hans-Joachim Wolfram, der mich drei Monate bei der Beprobung der Tiere begleitete und mich in der Brunstbeobachtung schulte.

Den Mitarbeitern der Ambulanz Susanne Müller, Stephan Groeger, Peter Richterich und Rainer Hospes sei gedankt für die Unterstützung bei der Beprobung der von der Ambulanz betreuten Tiere. Bei genannten Betrieben bedanke ich mich für die Bereitstellung der Tiere für die Beprobung.

Ich danke weiterhin den Mitarbeitern des Oberen Hardthofes, insbesondere Andreas Endlich, aber auch Axel Brand und Sabine Leister für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Beprobung der Tiere.



Ich danke dem Team des Hormonanalytiklabors für die Einführung in die praktischen Aspekte der Laborarbeit. Bei Sabine Feller bedanke ich mich für ihre Ruhe und Geduld, mit der sie mich vor allem an schlechten Tagen aufrichtete. Willi Damm danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen aller Art und nicht zu vergessen für seinen Humor und seine Freundschaft, durch die mir vieles leichter fiel.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Herrn Dr. Failing, Frau Sparenberg und Andreas Schaubmar von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung im Fachbereich Veterinärmedizin Gießen.

Weiterhin danke ich Sima Shenavai dafür, dass sie mir beim Abfassen der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Es war schön mit Dir in einem Zimmer zu sitzen!

Auch sei Michele Klymiuk gedankt für seine Hilfe nach Absturz meines Rechners.

Großen Dank richte ich zudem an Rolf Weinreich für die Korrektur meines Textes.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern für ihre finanzielle Unterstützung und für ihre Geduld während meines Studiums und der Dr.-Arbeit. Danke, dass Ihr an mich glaubt!

Andi, ich danke Dir!

Die Untersuchungen wurden mit einem Stipendium der Schaumann-Stiftung durchgeführt: Vielen Dank dafür!