

# Fruchtbarkeitsüberwachung beim Milchrind

Schriftenreihe, Heft 24/2011



# Erprobung und Bewertung von Verfahren zur Progesteron-Schnellbestimmung in der Milch zur Fruchtbarkeitsüberwachung beim Rind

Dr. Steffen Pache, Nicole Reinhold, Sigrun Birndt, Jenny Gockel

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>7</b>
2.1	Reproduktionsbiologische Grundlagen .....	7
2.1.1	Der Geschlechtszyklus des weiblichen Rindes .....	7
2.1.2	Hormonelle Steuerung des Sexualzyklus .....	8
2.1.3	Innere und äußere Veränderungen während des Zyklus .....	8
2.2	Brunstbeobachtung.....	9
2.3	Trächtigkeitsdiagnose .....	10
2.4	Nutzungsmöglichkeiten für die Progesteronbestimmung in der Milch .....	10
2.4.1	Verfahren zur Progesteronanalyse in der Milch .....	11
2.4.2	Einflüsse auf den Progesterongehalt in der Milch .....	11
2.4.3	Brunsterkennung.....	11
2.4.4	Trächtigkeitsdiagnose .....	12
2.4.5	Kontrolle der Ovaraktivität.....	13
2.4.6	Auffinden von Fruchtbarkeitsstörungen .....	13
2.4.7	Kontrolle rektaler Ovarbefunde .....	14
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1	Tiermaterial .....	15
3.1.1	Haltung .....	15
3.1.2	Fütterung .....	15
3.1.3	Management .....	15
3.2	Vorversuch.....	16
3.3	Hauptversuch.....	16
3.3.1	Auswahlkriterien des Tiermaterials .....	17
3.3.2	Brunstbeobachtung.....	17
3.3.3	Milchprobengewinnung und -aufbereitung .....	17
3.3.4	Analyseschritte des Gerätes .....	18
3.3.5	Analyse der Milchproben im Labor.....	19
3.3.6	Gynäkologische Untersuchungen .....	20
3.3.7	Synchronisationsprogramm und Ultraschalluntersuchung der Ovarien .....	21
3.4	Datenaufbereitung und -auswertung.....	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
4.1	Vorversuch.....	24
4.2	Hauptversuch.....	25
4.2.1	Gerätehandhabung .....	25
4.2.2	Verteilung der Progesterongehalte .....	25
4.2.3	Die Genauigkeit des Analysegerätes .....	28
4.2.4	Brunsterkennung.....	29
4.2.5	Trächtigkeitsdiagnose .....	30
4.2.6	Bestimmung der Zyklusaktivität .....	32
4.2.7	Beurteilung der Zyklusqualität mittels Progesteronprofilen .....	33
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>38</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Normaler Progesteronverlauf.....	12
Abbildung 2:	Progesteronverlauf bei erfolgreicher Besamung oder Luteinzyste.....	13
Abbildung 3:	Progesteronverlauf bei Follikelzysten .....	14
Abbildung 4:	Schematisierter Ablauf des EIA-Verfahrens im eProCheck® (nach MEYR 2009).....	19
Abbildung 5:	Ablauf der gynäkologischen Untersuchungen post partum.....	21
Abbildung 6:	Ablaufplan der Synchronisation (nach GOCKEL 2008b).....	21
Abbildung 7:	Mittlerer Temperaturverlauf während des Analysezeitraums .....	24
Abbildung 8:	Mittlerer Standardverlauf in Abhängigkeit von der Messung.....	24
Abbildung 9:	Häufigkeitsverteilung der Progesterongehalte in der Rohmilch für GW_1 (n=1.295).....	26
Abbildung 10:	Häufigkeitsverteilung der PW_L in der Magermilch (n=787).....	27
Abbildung 11:	Verteilung der Niveaustufen der Rohmilchproben für GW_1 (n=1295).....	27
Abbildung 12:	Verteilung der Niveaustufen der Magermilchproben des PW_L (n=787).....	28
Abbildung 13:	Vergleich der Progesterongehalte von GW_1 und GW_2 .....	29
Abbildung 14:	Vergleich der Progesterongehalte GW_1 (Rohmilch) und PW_L (Magermilch).....	29
Abbildung 15:	Mittlerer Progesteronverlauf der tragenden (n = 10) und der nicht tragenden Kühe (n = 36) .....	31
Abbildung 16:	Vergleich einer Standardprogesteronkurve (nach RIOUX & RAJOTTE 2004) mit den gemittelten Progesteronverläufen .....	34

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Materialübersicht zum Vorversuch.....	16
Tabelle 2:	Umfang der beobachteten Merkmale im Versuchszeitraum .....	17
Tabelle 3:	Materialübersicht der gynäkologischen Untersuchungen und der Synchronisation .....	22
Tabelle 4:	Niveau- und Stufeneinteilung der Progesterongehalte .....	22
Tabelle 5:	Statistische Maßzahlen der einzelnen Progesterongehalte .....	25
Tabelle 6:	Korrelationsmatrix des Gesamtmaterials .....	28
Tabelle 7:	Wahrheitstabelle zur Follikeluntersuchung (n = 50).....	30
Tabelle 8:	Vergleich der Sensitivität und Spezifität für einzelne Progesteronschwellenwerte (n = 50) .....	30
Tabelle 9:	Wahrheitstabelle zur Trächtigkeitsuntersuchung (n = 48).....	31
Tabelle 10:	Häufigkeiten und relativer Anteil für das Auftreten aktiver Zyklen und Azyklie im Vergleich.....	32
Tabelle 11:	Verteilung der Probanden an ausgewählten Zyklustagen nach der Besamung hinsichtlich des Über- bzw. Unterschreitens eines Schwellenwertes von 5 ng/ml Rohmilch .....	33

## Abkürzungsverzeichnis

AMS	Automatisches Melksystem
BCS	body condition score
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FDS-CL	Durchblutung des Gelbkörpers mittels Farbdopplersonografie
FDS-F	Durchblutung des Follikels mittels Farbdopplersonografie
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GW_1	mit dem eProCheck® Analysegerät 1 ermittelter Progesteronwert
GW_2	mit dem eProCheck® Analysegerät 2 ermittelter Progesteronwert
HF	Holstein Friesian
IfN	Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere e.V. Schönnow
LH	Luteinisierendes Hormon
LM	Lebendmasse
LVG	Lehr- und Versuchsgut
PG F2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
p.p.	post partum
PW_L	im EIA-Labor ermittelter Progesteronwert für Magermilch
RIA	Radio-Immuno-Assay
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover
tPW_L	im EIA-Labor ermittelte, mit dem Faktor 5 transformierter Progesteronwert für Rohmilch

# 1 Einleitung

Zur häufigsten Abgangsursache von Milchkühen zählt heutzutage die schlechte Fruchtbarkeit. Nach einer Studie von ZELFEL (2008) sank in Holsteinherden der Neuen Bundesländer in den Jahren 1992 bis 2003/2005 der Besamungserfolg um 10 % Punkte. Ebenfalls verlängerte sich die Zwischenkalbezeit um rund 25 Tage und die Kalberate sank um 5 % Punkte. Auch LUCY (2001) berichtete in einer Arbeit, dass sich die Anzahl der Besamungen pro Konzeption in den Jahren 1970 - 1999 in den Vereinigten Staaten von 1,75 auf 3,0 erhöhte und die Zwischenkalbezeit von 13,5 auf 14,7 Monate stieg. Die Hauptursache dafür ist meist schlechtes Management, insbesondere die schlechte Brunsterkennung, die sich negativ auf die Zwischenkalbezeit auswirkt (MANSFELD et al. 1999). Eine unzureichende Brunstbeobachtung spielt deshalb auch die Schlüsselrolle im Fruchtbarkeitsgeschehen. Sind die Beobachtungsintervalle zu niedrig und die Kenntnisse zum Brunstgeschehen nicht ausreichend, kann dies fatale Folgen für die Reproduktionsleistung der Milchkühe haben. Als zusätzliche Kontrollmöglichkeit zur täglichen Brunstbeobachtung kann der Milchprogesterontest als „on-farm-test“ eingesetzt werden. In zahlreichen Studien wird die Zuverlässigkeit dieser Tests zur Brunsterkennung, Überwachung der Zyklusaktivität post partum (p.p.), Erkennung von Fruchtbarkeitsstörungen und Trächtigkeits- bzw. Nichtträchtigkeitsdiagnose bestätigt (SCHIAVO et al. 1974, PENNINGTON et al. 1975, NEBEL 1988, RAJAMAHENDRAN et al. 1993, LAMMING & DARWASH 1998, PETERSSON et al. 2008). In früherer Zeit wurde der Progesterongehalt in der Milch, aber auch im Blutserum mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt und war aufgrund der Radioaktivität nur im Labor analysierbar. Heute wird der RIA mehr und mehr durch den Enzymimmunoassay (EIA) oder auch Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) abgelöst. Dieser ist sowohl im Labor als auch als „on-farm-test“, im Stall vor Ort, einsetzbar. Auf dem Markt gibt es bereits zahlreiche Produkte zur manuellen Analyse des Milchprogesterongehaltes mittels EIA als „on-farm-test“ zu erwerben. Zwischenzeitlich sind erste teilautomatisierte Progesteron-Analyseverfahren auf den Markt gekommen, die die Handhabung noch weiter vereinfachen.

Ein Ziel des Projektes war es, einen teilautomatisierten Progesteron-Schnelltest auf die

- Gerätehandhabung,
- Analysegenauigkeit,
- Abbildung der Zyklusaktivität,
- Eignung zur Brunstvorhersage sowie
- zur Trächtigkeits- bzw. Nichtträchtigkeitsdiagnose

zu untersuchen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Reproduktionsbiologische Grundlagen

#### 2.1.1 Der Geschlechtszyklus des weiblichen Rindes

Der weibliche Sexualzyklus (auch Brunstzyklus genannt) ist eine wiederholte Abfolge zahlreicher innerer und äußerer Veränderungen der Geschlechtsorgane. Diese umfassen Follikel- und Eizellenreifung, Ovulation, Gelbkörperausbildung und -rückbildung, Produktion der notwendigen Hormone sowie die Veränderungen der Geschlechtsorgane und des Verhaltens der Tiere (SCHNURRUSCH & VOGLER 2005). In der Literatur wird oft von einem ovariellen und einem uterinen Zyklus gesprochen, in dem sich morphologische und hormonelle Veränderungen an den Geschlechtsorganen vollziehen (GRUNERT 1999a).

Der Eintritt der Geschlechtsreife ist rassespezifisch. Bei Holstein Friesian (HF) tritt sie gewichtsabhängig zwischen dem 7. und 10. Lebensmonat ein. Die ersten Brunsten sind bei Jungrindern ab einem Lebendgewicht von größer 250 kg zu beobachten. Ab



diesem Alter laufen in der Regel die periodischen Vorgänge (Sexualzyklus) an den weiblichen Geschlechtsorganen ab. Ein Zyklus dauert beim Rind ca. 21 Tage und ist nach BOSTEDT (2003) in folgende Zyklusphasen eingeteilt:

- Vorbrunst (Proöstrus): ca. 18. - 20. Zyklustag
- Hauptbrunst (Östrus): 21. (=0) bis 1,5. Zyklustag
- Nachbrunst (Metöstrus): ca. 2. - 3. Zyklustag
- Zwischenbrunst (Diöstrus): ca. 4. - 17. Zyklustag.

Das Rind ist ein ganzjährig polyöstrisches Tier, d. h. der Zyklus tritt regelmäßig über das ganze Jahr verteilt auf, wenn es zu keiner Trächtigkeit kommt.

### 2.1.2 Hormonelle Steuerung des Sexualzyklus

Der gesamte Sexualzyklus wird durch eine Vielzahl von Hormonen gesteuert und ist hierarchisch aufgebaut. An oberster Stelle steht der Hypothalamus, in der Mitte die Hypophyse und danach folgt die Ebene der Eierstöcke. Alle drei Ebenen stehen in enger Kommunikation miteinander. Der Hypothalamus erfasst aufgrund positiv oder negativ rückkoppelnder Wirkung der Sexualhormone die Eierstockfunktion. Durch diese rückkoppelnde Wirkung wird die Abgabe des vom Hypothalamus gebildeten Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) gesteuert (HOFFMANN 1999). Das GnRH wirkt über das Pfortadersystem direkt auf den Hypophysenvorderlappen, der dadurch zur Freisetzung anderer Hormone angeregt wird. Diese Hormone sind zum einen das Follikelstimulierende Hormon (FSH) und zum anderen das Luteinisierende Hormon (LH). Beide Hormone sind Gonadotropine, d.h. sie wirken direkt auf die Gonaden. FSH wird regelmäßig freigesetzt, dadurch werden mehrere Follikel (Eiblasen) am Eierstock zum Wachstum angeregt. Dies geschieht nicht nur zur Ovulation, sondern über den gesamten Zyklus hinweg, in sogenannten Follikelwellen. Über den Zyklus verteilt finden zwei bis vier solcher Follikelwellen statt (HOFFMANN 1999). Ist während einer Follikelreifung ein Gelbkörper aktiv, kommt es zu keiner Ovulation und die Follikel bilden sich zurück. Kommt gegen Ende des Zyklus jedoch durch die Rückbildung des Gelbkörpers die Progesteronkonzentration zum Erliegen, reift ein Follikel zum dominanten Follikel heran und ovuliert (WEHREND & GRÖGER 2006). Zusätzlich fördert das FSH die Bildung von Östrogenen (Brunsthormone) im Follikel, wodurch nach etwa zwei Tagen die Brunst ausgelöst wird.

Das LH wird gegen Ende der Hauptbrunst einmalig in größeren Mengen abgegeben und resultiert aus der erhöhten Östrogenproduktion. Wie das FSH gelangt auch das LH über die Blutbahn zu den Eierstöcken. Dort wirkt es gemeinsam mit FSH unterstützend auf das Follikelwachstum und löst nach einiger Zeit die Ovulation aus. Nach der Ovulation stimuliert LH die Bildung eines Gelbkörpers aus der Follikelhöhle. Im Gelbkörper wird, wie bereits erwähnt, das Gelbkörperhormon Progesteron, auch Trächtigkeitsschutzhormon genannt, gebildet. Progesteron stellt während der Trächtigkeit die Gebärmutter ruhig und regt die Gebärmutter Schleimhaut an, besonders nährstoffreiches Sekret zur Ernährung der Frucht zu bilden. Außerdem wird im Gebärmutterkanal die Sekretion von Schleim angeregt und der Muttermund verschließt sich fest, um das Eindringen von Keimen zu verhindern. Progesteron ermöglicht für die Aufnahme und die Entwicklung des Embryos optimale Bedingungen und ist somit Voraussetzung für eine Trächtigkeit (BOSTEDT 2003). Kommt es zu keiner Befruchtung der Eizelle, wird von der Gebärmutter Schleimhaut das Hormon Prostaglandin  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) gebildet, was eine Verengung der Blutgefäße bewirkt, die den Gelbkörper versorgen. Dadurch schrumpft der Gelbkörper in sich zusammen und die Sekretion von Progesteron wird langsam eingestellt. Weil Progesteron die Synthese von GnRH hemmt, wird durch den Abbau des Gelbkörpers der Hypothalamus wieder dazu angeregt GnRH freizusetzen und der beschriebene Zyklus beginnt erneut.

### 2.1.3 Innere und äußere Veränderungen während des Zyklus

In der Vorbrunst kommt es zu Verhaltensveränderungen wie vermehrte Lautäußerung, zunehmende Kontaktaufnahme zu anderen Tieren in der Herde und zu Aufsprungversuchen auf Herdengenossinnen. Die Tiere zeigen einen erhöhten Bewegungsdrang und es kann zu einer verminderten Futteraufnahme kommen. An den Geschlechtsorganen kommt es ebenfalls zu Veränderungen. Die Schamlippen schwellen an und die Scheidenschleimhaut wird stärker durchblutet, was die Schleimhaut leicht rötlich und feucht erscheinen lässt. Die inneren Veränderungen sind am Ende der Vorbrunst am deutlichsten ausgeprägt. Der Muttermund und die Scheidenkanalschleimhaut quellen auf und bilden klaren, fadenziehenden Schleim. Die Kontraktilität der Gebärmutter nimmt langsam zu. Außerdem beginnt auf einem der beiden Eierstöcke ein dominanter Follikel anzuwachsen und der Gelbkörper des vorangegangenen Zyklus bildet sich zurück.



In der Hauptbrunst sind die gesteigerte Bewegungsaktivität und die Unruhe langsam rückläufig. Das Tier wird ruhiger, lässt sich von anderen Kühen im Genitalbereich beriechen, biegt den Schwanz zur Seite und lässt sich von Herdengenossinnen bespringen. Dieses Verhalten wird auch als Duldungsreflex bezeichnet. Die Schamlippen schwellen in der Hauptbrunst noch weiter an und sind nahezu faltenfrei. Gegen Ende der Hauptbrunst geht die Schwellung allmählich zurück. Aus dem Schamspalt geht klarer fadenziehender Brunstschleim ab. Auch im Inneren, z. B. am Muttermund oder am Scheidenboden, befindet sich glasklarer Schleim. Die Gebärmutter ist stark kontrahiert und auf einem der beiden Eierstöcke befindet sich ein dominanter Follikel. Am Ende der Hauptbrunst klingen die Symptome ab. Die Ovulation findet 7,3 (0-16) Stunden nach Ende der Hauptbrunst statt (GRUNERT 1999a).

Es folgt die Nachbrunst. Durch die Ovulation kommt es zum Versiegen der Brunsthormone. Aus der zurückbleibenden Follikelhöhle bildet sich ein Gelbkörper, der langsam anfängt, Progesteron zu bilden. Die sexuelle Aktivität der Tiere lässt nach, die Schamlippen schwellen ab und die Kontraktilität der Gebärmutter geht zurück. Die in der Hauptbrunst noch starke Quellung der Schleimhäute geht durch den Anstieg des Progesterongehaltes zurück. Dies führt zum Platzen kleiner Äderchen an der Oberfläche der Schleimhäute und löst somit Blutungen aus. Das Blut sammelt sich in der Gebärmutterhöhle und fließt in geringen Mengen ein bis zwei Tage nach dem Eisprung über dem Schamspalt ab. Dieser Vorgang wird als Abbluten bezeichnet.

Die Zwischenbrunst wird als Phase zwischen zwei Brunsten bezeichnet und ist eine Ruhephase. Die Schamlippen sind komplett abgeschwollen und faltig, der Muttermund ist fest verschlossen und die Durchblutung ist auf das normale Niveau zurückgegangen. Der Gelbkörper am Eierstock entwickelt sich am Anfang der Zwischenbrunst zu seiner vollen Größe.

Wurde das Tier erfolgreich besamt, bleibt der Gelbkörper über die gesamte Trächtigkeit erhalten und wird zum Trächtigkeitsgelbkörper (Corpus luteum graviditatis). Hat keine Besamung stattgefunden, wird der Gelbkörper gegen Ende der Zwischenbrunst durch das PGF  $2\alpha$  abgebaut und ein neuer Zyklus beginnt mit der Vorbrunst.

## 2.2 Brunstbeobachtung

Die Brunstbeobachtung ist einer der wichtigsten Faktoren im Fruchtbarkeitsmanagement. Eine effiziente und genaue Brunstbeobachtung ist der Hauptfaktor für ein erfolgreiches Herdenmanagement (HEERSCHE & NEBEL 1994). Der Verhaltensveränderung kommt bei der Beobachtung der Tiere die größte Bedeutung zu, aber auch die äußerlichen Veränderungen am Genitaltrakt dürfen nicht außer Acht gelassen werden (HOLTZ & MEINHARDT 1993). Im Abschnitt 2.1.3 wurde bereits ausführlich über die inneren und äußeren Veränderungen während der verschiedenen Zyklusphasen eingegangen. Wichtig ist es, die Brunstbeobachtung während der Ruhezeiten der Tiere durchzuführen und nicht in Melk- oder Fütterungszeiten, weil hier die Unruhe der Tiere allgemein zu hoch ist (BOSTEDT 2003). Nach HOLTZ & MEINHARDT (1993) sollten die Tiere mindestens zweimal pro Tag, idealerweise drei- bis viermal pro Tag für 20 - 30 Minuten beobachtet werden. Die Brunsterkennungsrate sollte bei ca. 80 % liegen (MANSFELD et al. 1999). Um die Brunsterkennungsrate zu erhöhen und die visuelle Brunstbeobachtung zu unterstützen, wurden im Laufe der Zeit zahlreiche technische Hilfsmittel zur Brunsterkennung entwickelt. Hier sollen nur zwei Beispiele kurz beschrieben werden. Technische Hilfsmittel können nur eine unterstützende Funktion einnehmen. Eine tägliche Brunstbeobachtung ist trotz Hilfsmittel notwendig.

Eine Möglichkeit ist das Erfassen der Bewegungsaktivität der Rinder. Hier können Schrittzähler, die am Fußgelenk oder am Halsband des Rindes angebracht sind, zum Einsatz kommen. Es wurde nachgewiesen, dass Tiere, die sich in der Brunst befinden, eine 2 - 4mal höhere Bewegungsaktivität aufweisen als Tiere, die nicht in der Brunst sind (FARRIS 1954, KIDDY 1977). Die Bewegungsaktivität ist allerdings von der Haltungsform abhängig. Die Bewegungsdaten werden von einem Empfänger erfasst, zum Stallcomputer gesendet und verarbeitet. Am Computer kann man sich die einzelnen Bewegungskurven der Rinder über spezielle Software anzeigen lassen. Nach SENGER (1994) liegt die Genauigkeit des Pedometers für die Brunsterkennung zwischen 22 % und 100 %.

In einer eigenen Versuchsreihe von zwei unterschiedlichen Aktivitätssensor-Systemen an zehn ausgewählten zyklischen Milchkühen wurden Erkennungsraten von 72 bzw. 83 %, aber auch Fehlerraten von 55 bzw. 23 % beobachtet. Erst mit der Berücksichtigung weiterer Informationen wie Abstand zur letzten Ovulation, Liegeverhalten, individuelles Aktivitätslevel konnte die Fehlerrate reduziert werden.

Des Weiteren haben sich auch Aufsprungdetektoren bewährt. Diese sind am Kreuzbein der Tiere aufgeklebt. Sie zeigen den Aufsprung eines Rindes auf den Rücken des brünstigen Tieres, welches sich in der Duldungsphase befindet. Hier kommen verschiedene Ausführungen zum Einsatz. Zum einen Farbkapseln, die beim Aufspringen der Tiere platzen und damit das Tier, das duldet, markiert (HOLTZ & MEINHARDT 1993). Es gibt aber auch Farbkapseln, die mit einer fluoreszierenden Flüssigkeit gefüllt sind und durch das Aufspringen gequetscht - damit aktiviert - werden und aufleuchten (BOSTEDT 2003). Zum anderen gibt es elektronische Sensoren (WALKER et al. 1996), die die Aufsprünge erfassen und an den Stallcomputer weiterleiten. Für das System Heat Watch® wurde in einer Studie von XU et al. (1998) eine Genauigkeit zwischen 91,7 % und 100 % angegeben.

Es gibt noch weitere technische Hilfsmittel wie zum Beispiel das Messen des elektrischen Widerstandes des Brunstscheimes und die Progesteronbestimmung in der Milch. Auf letzteres soll im Abschnitt 2.4 genauer eingegangen werden.

## 2.3 Trächtigkeitsdiagnose

Eine frühestmögliche Trächtigkeitsdiagnose ist ein wichtiger Aspekt für das reproduktive Management (NEBEL et al. 1987). Je früher die Untersuchung durchgeführt werden kann, desto früher können Tiere, die nicht trächtig sind, gefunden und somit schneller eine erneute Besamung durchgeführt werden. Eine Möglichkeit ist die rektale Trächtigkeitsuntersuchung. Diese sollte frühestens in der 5. Woche nach der Besamung, besser in der 6. - 8. Woche durchgeführt werden (BOSTEDT 2003). Als weitere Variante der Trächtigkeitsdiagnose lässt sich die Ultraschalldiagnostik nennen, die aufgrund des früheren Diagnosezeitpunktes immer mehr an Bedeutung gewinnt (VAN DER WEIJDEN & TAVERNE 1999). Eine Trächtigkeitsdiagnose kann hier schon um den 30. Tag nach der Besamung stattfinden (BOSTEDT 2003). Weiterhin lässt sich die Trächtigkeit über eine Analyse der Milch oder des Blutserums mittels Progesterontest nachweisen.

## 2.4 Nutzungsmöglichkeiten für die Progesteronbestimmung in der Milch

Progesteron wird im Gelbkörper des Eierstockes gebildet und ist im Blut, im Urin, im Kot und in der Milch nachweisbar (SCHNURRBUSCH & VOGLER 2005). Progesteron ist lipophil, d. h., es wird in die Milch abgegeben und reichert sich dort im Milchfett an (OBRITZHAUSER & BEHM 2005). In früheren Studien wurde herausgefunden, dass die Milchprogesteronkonzentration mit der Aktivität des Gelbkörpers korreliert (LAING & HEAP 1971). Aus diesem Grund kann die Progesteronanalyse eine wichtige Rolle im reproduktiven Management spielen und dem Landwirt wichtige Informationen liefern. Letzterer kann mittels Progesteron-Schnelltest den Progesteron Gehalt seiner Kühe überprüfen und anhand der Ergebnisse Einblicke in das Fruchtbarkeitsgeschehen der Kühe erhalten.

Während der Brunst ist nur sehr wenig Progesteron in der Milch enthalten (< 2 ng/ml), weil sich der Gelbkörper zurückgebildet hat. Nach der Ovulation steigt die Progesteronkonzentration innerhalb von 4 - 5 Tagen langsam an, liegt aber noch unter 5 ng/ml. Vom 5. zum 6. Zyklustag steigt die Progesteronkonzentration über 5 ng/ml und sollte am 7. Tag über 10 ng/ml liegen. Danach befindet sich der Gelbkörper in seiner vollen Größe und es können Werte von 10 - 40 ng/ml auftreten. Um den ca. 17. Tag des Zyklus beginnt die Gelbkörperrückbildung. Damit sinkt die Progesteronkonzentration in der Milch in den folgenden ein bis zwei Tagen stark ab und ist am 19. Zyklustag auf unter 5 ng/ml abgefallen (OBRITZHAUSER & BEHM 2005). Anwendungsbereiche für den Milchprogesterontest sind

- Brunsterkennung und Ausschluss einer Brunst (NEBEL 1988, FRIGGENS et al. 2008)
- frühzeitiger Trächtigausschluss (NEBEL et al. 1987, RJAMAHENDRAN et al. 1993)
- Überprüfung der Ovaraktivität p.p. (HUSSAIN SHAH et al. 1988, LAMMING & DARWASH 1998, PETERSSON et al. 2008)
- Erkennen von eventuellen Fruchtbarkeitsstörungen (Ovarialzysten, stille Brunst, Azyklie, verzögerte Ovulation)  
(ROSSOW 2006, RUIZ et al. 1992)
- Kontrolle der Befunde von rektalen Untersuchungen der Ovarien (ROSSOW 2006, KELTON et al. 1991)

#### 2.4.1 Verfahren zur Progesteronanalyse in der Milch

In den vergangenen Jahren hat sich zur Progesteronanalyse in der Milch, aber auch im Blutserum, immer mehr das Enzymimmunoassay-Verfahren durchgesetzt. Früher wurde oft der Radioimmunoassay verwendet, der sehr genau arbeitete, aber aufgrund seiner Radioaktivität, des Zeitaufwandes und der hohen Kosten durch den EIA ersetzt wurde (Ruiz et al. 1989).

Man kann mittels EIA nicht nur Progesteron bestimmen, sondern noch zahlreiche andere Verbindungen wie zum Beispiel Proteine, Hormone, Toxine und Pestizide. Nachweismedien sind Körperflüssigkeiten wie Blut, Milch, aber auch Urin.

Der EIA basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Reaktionsgefäße sind mit einem Antikörper gegen die zu bestimmende Substanz beschichtet. In diese Reaktionsgefäße werden Proben mit unbekannter Konzentration und eine definierte Menge Enzymkonjugat hinzugegeben. Diese beiden konkurrieren um freie Bindungsstellen der an das Reaktionsgefäß gebundenen Antikörper. Es wird ein weiteres Substrat hinzugegeben, wodurch es zu einer Farbreaktion kommt, deren Intensität photometrisch gemessen werden kann. Die Menge an gebundenem Enzymkonjugat ist umgekehrt proportional zu der Konzentration der Probe, die durch Vergleich mit dem Standard der bekannten Konzentration bestimmt werden kann. Es gibt verschiedene Formen des EIA-Verfahrens, auf die aber nicht eingegangen werden soll.

#### 2.4.2 Einflüsse auf den Progesteron Gehalt in der Milch

Wie bereits erwähnt wurde, ist Progesteron lipophil und in der Milch an Fett gebunden. Nach einer Studie von NUTI et al. (1975) korrelieren die Fettkonzentration und die Progesteronkonzentration in der Milch positiv miteinander. Des Weiteren konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass die Progesteronkonzentration von der Probenahme der Milch abhängig ist (GINTHER et al. 1976, PENNINGTON et al. 1981). In beiden Studien zeigte sich, dass ein Konzentrationsunterschied zwischen Vorgemelk und Nachgemelk besteht. Im Vorgemelk ist weniger Fett und damit auch weniger Progesteron enthalten. Demgegenüber ist im Nachgemelk mehr Fett und damit mehr Progesteron vorzufinden. Nach GINTHER et al. (1976) betrug die Konzentration von Fett (%) und Progesteron (ng/ml) bei 10 Kühen unmittelbar vor dem Melken 2,0 % und 8,0 ng/ml und unmittelbar nach dem Melken 7,8 % und 23,2 ng/ml. Im Vergleich dazu konnte für die Progesteronkonzentration im Plasma keine Veränderung nachgewiesen werden.

#### 2.4.3 Brunsterkennung

Die Brunsterkennung oder auch das Ausschließen einer Brunst mittels Progesteronanalyse kann nur unterstützend zu der täglich durchgeführten Brunstbeobachtung sein. Der optimale Besamungszeitraum ist laut GRUNERT (1999a) in der 2. Hälfte der Brunst oder gegen Ende der Brunst (ca. 12 - 18 Stunden nach Brunstbeginn). Durch unzureichende Brunstbeobachtung werden rund 20 % der Milchkühe in der Gelbkörperphase besamt (BULMAN & LAMMING 1978, GRUNERT 1999a, OBRITZHAUSER & BEHM 2005). Mit einer gezielten Milchanalyse vor der Besamung können Missverständnisse ausgeschlossen werden. In Abbildung 1 ist ein normaler Progesteronverlauf in der Milch mit einem Schwellenwert zwischen 2 - 3 ng/ml dargestellt.

ng/ml

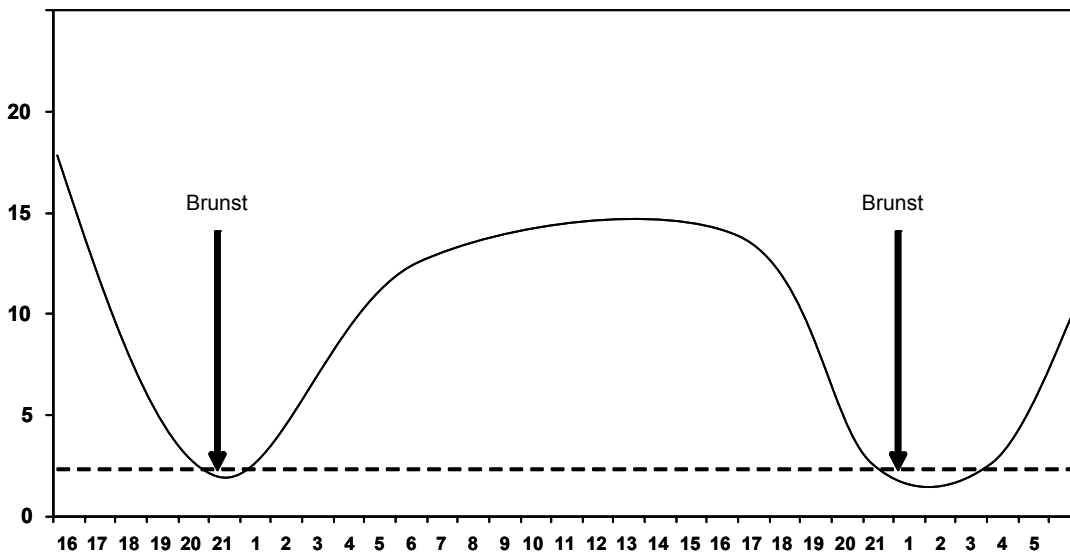
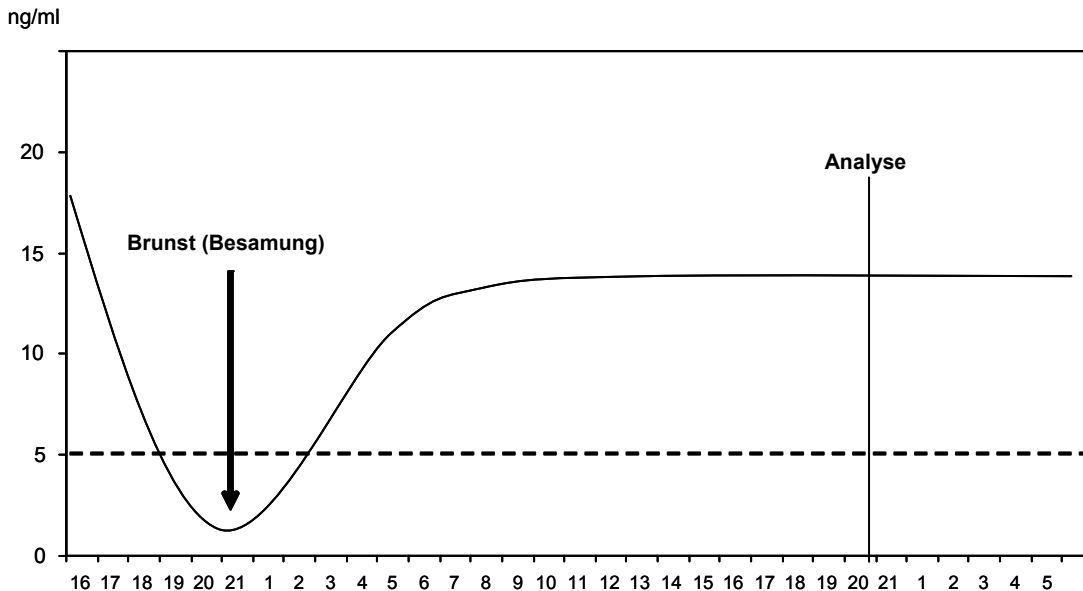


Abbildung 1: Normaler Progesteronverlauf

Zeigt eine Kuh keine eindeutigen Anzeichen einer Brunst, kann mittels Milchprogesteronanalyse ein zusätzliches Merkmal zur Brunsterkennung geschaffen werden. Ist der Progesteronwert niedrig, lässt sich daraus schließen, dass sich die Kuh tatsächlich in Brunst oder in Brunstnähe befindet. Nach OBRITZHAUSER & BEHM (2005) liegt der Schwellenwert für die Progesteronkonzentration während der Brunst unter 2 ng/ml. DARWASH et al. (1997) gibt den Progesteronschwellenwert während Brunst mit unter 3 ng/ml an. Liegt die Progesteronkonzentration über dem Schwellenwert, liegt höchstwahrscheinlich keine Brunst vor und die Kuh sollte nicht besamt werden.

#### 2.4.4 Trächtigkeitsdiagnose

Aufgrund der Tatsache, dass der Gelbkörper während der gesamten Trächtigkeit erhalten bleibt, lässt sich daraus eine relativ einfache Möglichkeit zur Diagnose „trächtig“ oder „nicht trächtig“ erstellen. In zahlreichen Studien wurde bestätigt, dass der Milchprogesterontest eine gute Möglichkeit ist, bereits nach rund 20 Tagen eine Trächtigkeit zu erkennen oder auszuschließen (SCHIAVO et al. 1974, BOOTH 1979, PENNINGTON et al. 1985, NEBEL 1988, RAJAMAHENDRAN et al. 1993, ROSSOW 2006). Bei einem normalen Zyklus kommt es um den 19. - 21. Tag des Zyklus zum Abfall der Progesteronkonzentration. Hat aber im vorhergehenden Zyklus eine Befruchtung der Eizelle stattgefunden, bleibt dieser Abfall der Progesteronkonzentration aus (Abbildung 2). Ist bei der Analyse der Milch am 21. Tag der Progesteronwert unter 3 ng/ml, kann eine Trächtigkeit ausgeschlossen werden (OBRITZHAUSER & BEHM 2005). Liegt die Progesteronkonzentration jedoch über einem Schwellenwert von 5 ng/ml, könnte mit einer Trächtigkeit zu rechnen sein (OBRITZHAUSER & BEHM 2005). Eindeutig ist dieses Ergebnis nicht, weil auch noch andere Faktoren für den hohen Progesteronwert verantwortlich sein können. Solche Faktoren können Besamungen während der Gelbkörperphase, Luteinzysten, verlängerter Zyklus, aber auch embryonaler Frühfötus sein (COX et al. 1978, NEBEL 1988). Deshalb wird in den meisten Studien angegeben, dass die Diagnose „nicht tragend“ genauerer ist als die Diagnose „tragend“ (RAJAMAHENDRAN et al. 1993, PENNINGTON et al. 1975, NEBEL 1988). Bei der Diagnose „tragend“ sollte auf jeden Fall ein Tierarzt hinzugezogen werden, um die Diagnose zu bestätigen. RUIZ et al. (1989) fand des Weiteren heraus, dass die Genauigkeit erhöht wird, wenn man die Milch an mehreren Tagen hintereinander (z. B. an Tag 19, 21, 23 nach der Besamung) auf den Progesterongehalt untersucht. Der Vorteil der Milchprogesteronanalyse zur Trächtigkeitsdiagnose ist, dass nicht tragende Kühe sehr früh erkannt und damit schneller wieder besamt werden können. Dies ist wiederum eine Möglichkeit, die Gützeit der Milchkuh zu verkürzen und wirtschaftlich effizienter zu arbeiten.



**Abbildung 2: Progesteronverlauf bei erfolgreicher Besamung oder Luteinzyste**

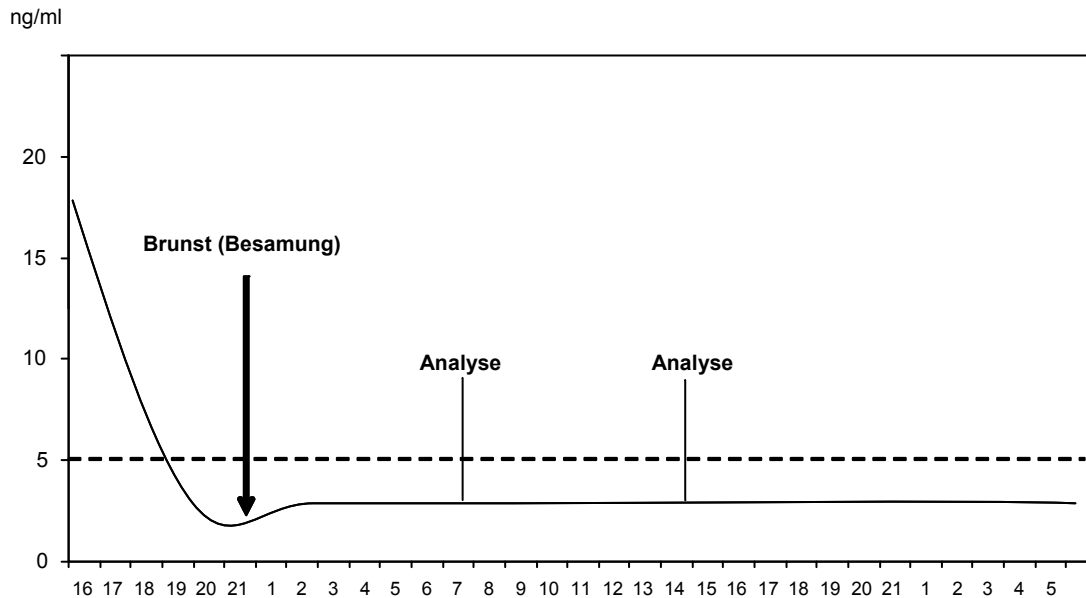
#### 2.4.5 Kontrolle der Ovaraktivität

Des Weiteren können mittels Progesteronanalyse Aussagen zur Aktivität der Ovarien getroffen werden. Um die Günstzeit möglichst kurz zu halten, wird eine Rastzeit von 9 bis 12 Wochen angestrebt, d.h. eine Besamung um den 60. - 80. Tag p.p. (MANSFELD et al. 1999). Zeigen Tiere bis zu diesem Zeitpunkt keine Brunst, verlängert sich die Günstzeit und die Wirtschaftlichkeit wird niedriger.

In der Literatur werden verschiedene Schwellenwerte für einen aktiven Gelbkörper angegeben. Nach NEBEL et al. (1987) liegt der Schwellenwert bei 5 ng/ml, nach PETERS et al. (1999) liegt der Schwellenwert bei 3 ng/ml und MIALOT et al. (1999) gibt einen Schwellenwert von 2 ng/ml an. Nach einer Studie von RUIZ (1992) war es am effektivsten, mit der Beprobung ab 30. Tag p.p. zu beginnen oder den Test 10 Tage vor der Besamung durchzuführen. Nach BOOTH (1979) kann die Überprüfung der Milch einmal in der Woche schon eine wichtige Information für das Management geben. PETERSSON (2008) gibt an, dass sogar Proben einmal im Monat Aufschluss über den reproduktiven Status der Kühe geben können. Damit können Problemkühe zeitiger aufgefunden und entsprechend behandelt werden. Nach WINDIG et al. (2007) ist von einer Ovaraktivität auszugehen, wenn bei zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen des Progesterongehaltes in der Milch die Progesteronkonzentration über 5 ng/ml liegt.

#### 2.4.6 Auffinden von Fruchtbarkeitsstörungen

Eine andere Einsatzmöglichkeit des Milchprogesteron-Tests ist das Erkennen eventuell vorhandener Fruchtbarkeitsstörungen. Bei Follikelzysten ist beispielsweise die Progesteronkonzentration in Blutserum und Milch sehr niedrig (NEBEL 1988). Ist die Progesteronkonzentration nach der künstlichen Besamung (KB) bei zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen im Abstand von sieben Tagen niedrig, wie in Abbildung 3 skizziert, kann es sich um eine Follikelzyste handeln (Rossow 2006).



**Abbildung 3: Progesteronverlauf bei Follikelzysten**

Eine verzögerte Ovulation kann mit einer Analyse der Milch am Tag der Besamung und 6. oder 7. Tage nach der Besamung erkannt werden (Rossow 2006). Ist die Ovulation normal abgelaufen, ist die Progesteronkonzentration am 6. - 7. nach der Besamung oberhalb eines Schwellenwertes von 5 ng/ml. Hat dagegen eine verzögerte Ovulation stattgefunden, liegt die Milchprogesteronkonzentration unterhalb des Schwellenwertes.

Ebenfalls können echt stillbrünstige Tiere mittels Progesteronkonzentration gefunden werden. Zeigt die Kuh mehrere Wochen nach der Abkalbung keinerlei Brunstanzeichen, lässt sich mittels 2 – 3-maliger Milchanalyse im Abstand von sieben Tagen eine Aussage über den reproduktiven Status der Kühe treffen (ROSSOW 2006, PETERSSON et al. 2008). Ist der Progesterongehalt bei drei aufeinanderfolgenden Untersuchungen erniedrigt, kann es sich um Azyklie, aber auch um Follikelzysten handeln. Schwankt der Progesterongehalt bei drei aufeinanderfolgenden Messungen (z. B. 1. Messung hoch, 2. Messung hoch, 3. Messung niedrig) kann davon ausgegangen werden, dass die Kuh sich in einem normalen Zyklus befindet und unter Stillbrünstigkeit leidet oder deutliche Fehler in der Brunstbeobachtung bzw. im Management vorhanden sind. Bei diesen Diagnoseverfahren sollte trotzdem in jedem Fall der Tierarzt hinzugezogen werden.

#### 2.4.7 Kontrolle rektaler Ovarbefunde

Die letzte Möglichkeit des Progesteron-Tests, die beschrieben werden soll, ist die Kontrolle der durch rektale Untersuchung festgestellten Ovarbefunde. In der Literatur wird die Fehlerrate von rektalen Ovarbefunden mit ca. 20 - 30 % angegeben (OBRITZHAUSER & BEHM 2005). Durch gezielte Analyse der Milch nach der rektalen Untersuchung der Ovarien können Fehler in der Diagnose aufgedeckt werden. Nach einer Studie von KELTON et al. (1991) wurde die Genauigkeit von rektaler Untersuchung und Milchprogesteron-Schnelltest (EIA) in Bezug auf Ovarbefunde untersucht. Es zeigte sich, dass der Progesterontest genauso sensitiv war wie die rektale Untersuchung der Ovarien. Des Weiteren hatte der Progesterontest eine höhere Spezifität bei der Erkennung von funktionalen Gelbkörpern.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Tiermaterial

Das Tiermaterial wurde vom Lehr- und Versuchsgut (LVG) Köllitsch zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um 50 Milchkühe der Rasse Holstein Friesian, die im Zeitraum vom 17.07.2007 bis zum 01.10.2007 abkalbten. Von den 50 Kühen waren 29 Erstkalbinnen und 21 Milchkühe zwischen Laktation 1 und 6 in den Versuch involviert. Die Milchkuhherde in Köllitsch hatte in den Jahren 2006 bis 2008 eine durchschnittliche Jahresleistung von 9.672 kg.

### 3.1.1 Haltung

Der Versuchsbetrieb hat drei Aufstellungsmöglichkeiten: einen Liegeboxen-Laufstall, einen Laufstall mit Außenliegeboxen und 20 Plätze zur Anbindehaltung. Der Liegeboxen-Laufstall umfasst 120 Plätze und ist in vier Gruppen gegliedert (1x Frischmelker, 2x Hochlaktierend, 1x Altmelker). Die Fütterung wird speziell an jede Gruppe angepasst. In dieser Aufstellungsform werden die Kühe mittels Fischgrätenmelkstand (2 x 7 Plätze) gemolken.

Im Laufstall mit Außenliegeboxen sind 51 Plätze vorhanden und ein automatisches Melksystem (AMS) integriert. In dieser Haltingsform gibt es zwei Fütterungsgruppen, in denen die Kühe je nach Leistung und Trächtigkeitsstadium zugeordnet werden. Im Zusammenhang mit der überbetrieblichen Ausbildung und weiteren Forschungsprojekten befindet sich im Trakt des AMS-Stalls noch eine Reihe mit Anbindehaltung, ausgestattet mit einer Rohrmelkanlage.

Im Versuch wurde ausschließlich mit Frischmelkern und hoch laktierenden Kühen gearbeitet.

### 3.1.2 Fütterung

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Fütterung der Milchkühe im Versuchsbetrieb in Abhängigkeit vom Leistungs- und Trächtigkeitsstadium. Es werden hauptsächlich betriebseigene Futtermittel verwendet. Es wird in allen Aufstellungsformen eine totale Mischung (TMR) gefüttert, deren Hauptkomponente Maissilage ist. Je nach Gruppe werden noch Heu, Gerste, Stroh, Sojaextraktionsschrot, Rapsextraktionsschrot oder Melasse zur TMR dazugemischt. Im Laufstall befindet sich zusätzlich in jeder Gruppe ein Krafffutterautomat. Im AMS-Stall bekommen die Tiere je nach Leistungsstadium das Krafffutter im Melkroboter zugeteilt. Die TMR wird den Tieren zweimal täglich angeboten.

### 3.1.3 Management

Die Milchkühe im Versuchsbetrieb werden zweimal täglich früh und am späten Nachmittag gemolken. Die Brunstbeobachtung wird von einem Herdenmanager und vom Stallpersonal durchgeführt. Dazu wird die Herde vom Herdenmanager einmal um 12:00 Uhr mittags und einmal vom Stallpersonal zur Nachtschicht gegen 20:00 Uhr beobachtet. Zusätzlich sind die Tiere mit Aktivitätssensoren ausgestattet. Die Aktivitäten werden ebenfalls täglich vom Herdenmanager am Stallcomputer überprüft. Als brünstig erkannte Tiere werden vom Hoftierarzt besamt und die Trächtigkeitsdiagnose wird mittels rektaler Untersuchung am ca. 42. - 50. Tag nach der Besamung durchgeführt. Sechs bis acht Wochen vor dem errechneten Geburtstermin werden die hochtragenden Kühe in einen extra Stalltrakt gebracht, in dem sich sechs Boxen mit Stroh befinden, wobei jede Box mit einem Auslauf ausgestattet ist. In diesen Boxen können sich bis zu drei hochtragende Kühe aufhalten und abkalben. Nach der Geburt kommt das Kalb in ein Kälberglu und die Milchkuh entweder in den Laufstall oder in den AMS-Stall. Der Versuchsbetrieb hat ein durchschnittliches Erstkalbealter von 25,4 Monaten, eine Zwischenkalbezeit von durchschnittlich 420 Tagen und eine Kalbrate von durchschnittlich 73,5 %.



## 3.2 Vorversuch

Ein Vorversuch wurde vom 09.07.07 bis zum 30.07.07 durchgeführt. Dazu stand zunächst ein Gerät eProCheck® der Firma Frimtec GmbH Oberostendorf zur Verfügung. Ab dem 20.07. wurde noch ein weiteres Gerät, ebenfalls von dieser Firma, zur Verfügung gestellt. Durchgeführt wurde der Versuch mit 11 Holstein Friesian-Kühen des LVG Köllitsch. Die Tiere waren nicht tragend und um den 50. Laktationstag. Alle Tiere wurden vor dem Versuch vom Tierarzt rektal untersucht. Dreimal in der Woche (montags, mittwochs und freitags) wurde früh nach dem Vormelken eine Milchprobe von den 11 Tieren in ein 2-ml-Eppendorfgefäß genommen. Nach dem Melken wurden die Proben mit beiden Geräten auf den Progesterongehalt untersucht. Bei allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Mit einem Gerät konnten maximal sieben Milchproben pro Analysedurchlauf getestet werden. So wurden für die 11 Proben inklusive Doppelbestimmung vier Analysedurchläufe (22 Milchproben) pro Testtag durchgeführt. Gerät eins war im Inneren mit einem Temperatursensor ausgestattet, der im Versuchszeitraum im Abstand von 10 Minuten die Temperatur gemessen hat. Beide Geräte arbeiteten mit unterschiedlichen Analyseverfahren und dadurch auch mit anderen Schätzgleichungen, über die der Progesterongehalt ermittelt wurde. Im ersten Gerät verblieb die Milch in dem Reaktionsgefäß und der Laser ermittelte die Farbintensität auf der Milchoberfläche. Im zweiten Gerät wurde die Milch nach der Inkubationszeit abgesaugt und die Verfärbung am Reaktionsgefäß gemessen. Auf die Analyse wird im Einzelnen in Abschnitt 3.3.4 eingegangen und soll hier nicht beschrieben werden. Bei den Tieren wurde zweimal täglich eine Brunstbeobachtung durchgeführt, die Aktivitätsdaten wurden jeden Tag kontrolliert und Auffälligkeiten dokumentiert. Eine Übersicht zum Material des Vorversuches ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

**Tabelle 1: Materialübersicht zum Vorversuch**

Anzahl der Probanden	11
Progesterondaten von Gerät 1	220
Progesterondaten von Gerät 2	110
Brunstmerkmale	13
Aktivitäten	3
Besamungen	6
Temperaturdaten	150

## 3.3 Hauptversuch

Im Projektzeitraum lief noch ein anderer Versuch, in dem mit den gleichen Tieren gearbeitet wurde. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit dem des Institutes für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere e.V. Schönnow (IfN) und der Tierärztlichen Hochschule Hannover (TiHo) durchgeführt (GOCKEL 2009).

Es wurde ein gemeinsamer Versuchsplan erstellt. Im Rahmen der tierärztlichen Arbeit wurden die 50 ausgewählten Versuchstiere regelmäßig auf ihren Gesundheits- und Fruchtbarkeitsstatus untersucht. Sie wurden ab dem 45. Tag p.p. in ein Synchronisationsprogramm aufgenommen und terminorientiert besamt. Zusätzlich wurden ab der 2. Woche p.p. zweimal wöchentlich Milchproben für die Progesteronanalyse im Labor gewonnen. Die tierarztbezogenen Befunde aus der oben genannten Arbeit wurden für die genauere Beschreibung der Zyklusaktivität der Tiere herangezogen.

### 3.3.1 Auswahlkriterien des Tiermaterials

In den Versuch wurden nur Tiere einbezogen, die einen stabilen Gesundheitszustand im Puerperium aufwiesen. Ausschlusskriterien waren:

- Rinder mit einer Körpertemperatur über 40,5 °C
- Rinder mit Störungen des Allgemeinbefindens
- Rinder mit schweren Geburtsverletzungen oder Labmagenverlagerung
- Rinder, die eine schwere Lahmheit aufweisen
- Rinder mit einem body condition score (BCS) unter 1,75 oder über 4.

Die Kriterien wurden vom Projektleiter in Abstimmung mit dem IfN Schönow empirisch festgelegt.

### 3.3.2 Brunstbeobachtung

Innerhalb des Versuchszeitraumes wurde zweimal täglich eine Brunstbeobachtung durchgeführt, einmal um 12:00 Uhr und ein weiteres Mal um 20:00 Uhr für jeweils ca. 30 Minuten. Es wurde auf unruhige Tiere, die auf andere aufspringen, Tiere die sich von anderen Herdengenossinnen bespringen lassen, den Rötungs- und Schwellungsgrad der Scheidenschleimhäute und den Abgang von Brunstschleim geachtet. Alle Auffälligkeiten wurden dokumentiert. Zusätzlich zu der visuellen Brunstbeobachtung waren alle Tiere mit Aktivitätssensoren am Halsband ausgestattet. Die Aktivitätsdaten der Kühe wurden täglich im Herdenprogramm überprüft und erhöhte Aktivitäten dokumentiert. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die beobachteten Brunstmerkmale, Besamungen und Konzeptionen während des Versuchszeitraumes.

**Tabelle 2: Umfang der beobachteten Merkmale im Versuchszeitraum**

Beobachtetes Merkmal	Anzahl an Beobachtungen
Brunst (Duldung, Brunstschleim etc.)	61
Erhöhte Aktivität	15
Abbluten	29
Besamungen	61
Konzeptionen	25

### 3.3.3 Milchprobengewinnung und -aufbereitung

Von allen Tieren wurden im Hauptversuch ab dem 28. ± 2 Tag p.p. bis zum 85. ± 5 Tag dreimal wöchentlich (montags, mittwochs und freitags) Milchproben genommen. In der Laufstallherde wurden die Milchproben beim morgendlichen Melken aus dem Anfangsgemelk entnommen und im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Verarbeitung aufbewahrt. Im AMS-Stall konnte durch den kontinuierlichen Ablauf und die Selbstbestimmung der Tiere, den Melkautomaten zu nutzen, nicht gewährleistet werden, dass alle Proben aus dem Anfangsgemelk entnommen wurden. Die Milchproben im AMS-Stall wurden in Eigenregie an den jeweiligen Versuchstagen ca. 07:00 Uhr entnommen. Generell wurde die Milchprobe einer Kuh aus einem Euterviertel genommen. Die Kuh wurde vorgemolken und das Euter gründlich gereinigt. Bevor die Milchprobe manuell in ein 20-ml-Plastikröhrchen gemolken wurde, wurden die ersten Strahlen aus dem angerüsteten Euterviertel abgemolken und verworfen.

Vor der Verarbeitung wurde jede einzelne Milchprobe durch Schütteln noch einmal durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Fettkügelchen, an denen das Progesteron gebunden ist, zu gewährleisten. Danach wurde ein Teil der Milchprobe in ein 2-ml-Eppendorfgefäß gefüllt, welche für die Bestimmung des Progesterongehaltes in der Rohmilch mit dem Analysegerät zur Verfügung stand. Die verbleibende Milch in den Plastikröhrchen wurde montags und freitags bei 3.000 U/min zentrifugiert und die fettfreie Magermilch in ein 2-ml-Eppendorfgefäß pipettiert. Diese Proben wurden eingefroren und später im Labor der TiHo Hannover hinsichtlich des Progesterongehaltes in der Magermilch mittels EIA untersucht.

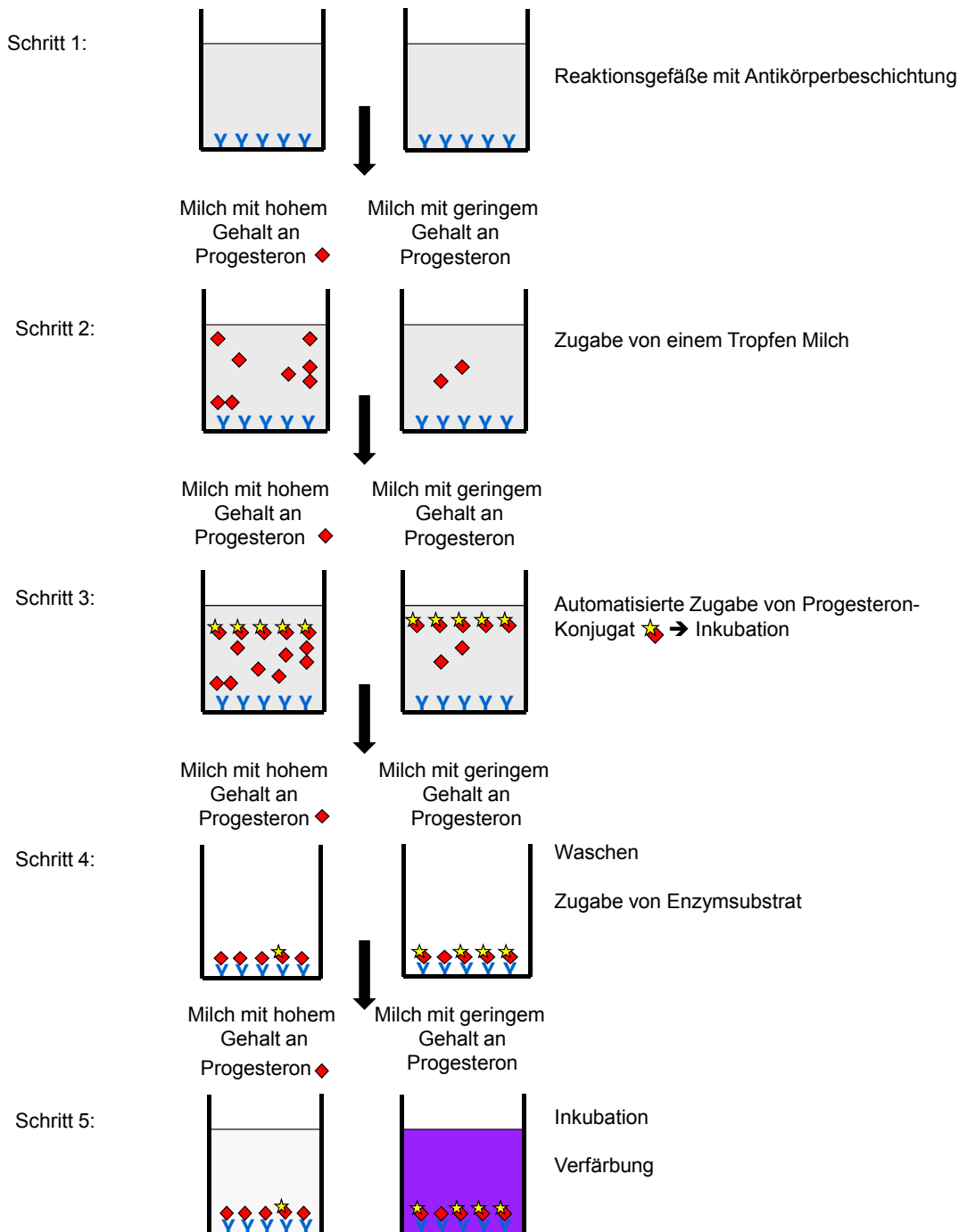
An den Vortagen der Analyse wurden sämtliche Milchprobengefäße mit Kuhnummer, Probennummer und Datum versehen, um eine Verwechslung der Proben zu vermeiden. Die Untersuchung der Milchproben an den drei Testtagen mit dem Analysegerät begann ca. 07:30 Uhr. Auf einer Arbeitsliste wurde Probennummer, Kuhnummer, Datum, Zeit und die ausgegebenen Werte des Gerätes notiert. Weil bei der Analyse nur ein Milchtropfen benötigt wurde, konnte die verbleibende Milchprobe als Rückstellprobe eingefroren. Insgesamt wurden 1.326 Milchproben gesammelt. In der ersten Hälfte des Versuchszeitraumes wurde eine Doppelbestimmung des Progesterongehaltes in der Rohmilch bei alle Proben durchgeführt.

### 3.3.4 Analyseschritte des Gerätes

Das Analysegerät eProCheck<sup>®</sup> besteht aus einem transportablen Grundgerät mit Bedienfeld und Display, einem Reagenzienblock, einem Untersuchungsschuh für acht Reaktionsgefäße, einem Abfallbehälter, einer PC-Schnittstelle zur optionalen Software eProManager<sup>®</sup> für die Datenverwaltung sowie entsprechendes Kabelmaterial. Das Verbrauchsmaterial für das Analysegerät wird als Set mit 96 Reaktionsgefäßen und den entsprechenden Reagenzien (Konjugat, Waschlösung, Enzymsubstrat) geliefert. Reaktionsgefäße und Reagenzien sind aufeinander abgestimmt und durch eine Chargennummer gekennzeichnet. Das Gerät überwacht den Verbrauch der Reaktionsgefäße und leitet den Bediener beim Chargenwechsel.

Die Reaktionsgefäße, in die die Milch pipettiert wurde, waren mit Antikörpern beschichtet (Schritt 1). Insgesamt konnten mit dem Gerät sieben Milchproben gleichzeitig getestet werden. Das erste Reaktionsgefäß musste pro Analysedurchlauf immer freibleiben und diente als Standardwert, anhand dessen der Progesterongehalt der Milchproben errechnet wurde. Nachdem aus dem Eppendorfgefäß mit der jeweiligen Milchprobe ein Tropfen Milch in das Reaktionsgefäß pipettiert wurde (Schritt 2) und die Reaktionsgefäße ins Gerät eingebracht wurden, wurde von dem Gerät eine definierte Menge enzymmarkiertes Progesteron (= Konjugat) in die Reaktionsgefäße dazugegeben. Innerhalb einer bestimmten Inkubationszeit konkurrierte das Progesteron aus der Milchprobe mit dem vom Gerät hinzugegebenen Progesteronkonjugat um freie Bindungsstellen am Antikörper (Schritt 3). War der Milchprogesterongehalt in der Probe sehr hoch, wurde fast ausschließlich das Progesteron aus der Milchprobe an die Antikörper gebunden. War wenig Progesteron in der Milchprobe enthalten, konnte mehr enzymmarkiertes Progesteron an die Antikörper gebunden werden. Nach der Inkubationszeit wurde ein Waschschrift durchgeführt (Schritt 4). Das Reaktionsgefäß wurde vollständig geleert und es verblieb nur das am Antikörper gebundene Progesteron bzw. Progesteronkonjugat im Gefäß. Das Gerät gab danach eine Substratlösung (Schritt 4) in das Reaktionsgefäß, wodurch das Enzym zersetzt und ein blauer Farbstoff gebildet wurde. Je mehr Enzym im Reaktionsgefäß enthalten war, desto intensiver war die Färbung (Schritt 5). Das heißt, die Färbung war umgekehrt proportional zur Menge des Progesterons. Das Gerät ermittelte den Progesteronwert der Milchprobe, indem es die mittels Laser gemessene Farbintensität des „Blauwertes“ der Probe mit dem „Blauwert“ des Standards verrechnet.

In Abbildung 4 soll der Ablauf noch einmal kurz dargestellt werden (MEYR 2009).



**Abbildung 4: Schematisierter Ablauf des EIA-Verfahrens im eProCheck® (nach MEYR 2009)**

### 3.3.5 Analyse der Milchproben im Labor

Zur Untersuchung des Progesterongehaltes in der Magermilch im Labor der TiHo Hannover wurden die zuvor eingefrorenen Magermilchproben aufgetaut. Vor der Analyse wurde eine Standardkurve in progesteronfreier Matrix in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Milchproben hergestellt. Die Analyse der Magermilchproben im Labor erfolgte ebenfalls mit einem EIA-Testverfahren.

Die Milchproben wurden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Diese Mikrotiterplatten waren alle mit Antikörper (Immunglobulin G (IgG)-Ziege-Anti-IgG-Ratte) beschichtet. Dazu wurden eine konstante Menge an enzymmarkiertem Hormon (Progesteron-3CMO-HRP) und eine konstante Menge eines Antikörpers (P-1922 Monoclonal Anti Progesteron, Clone 2H4 Sigma) gegeben. Danach wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und über Nacht zur Inkubation in einem Kühlschrank auf einen Schüttler gestellt. Innerhalb der Inkubationszeit konkurriert die konstante Menge des enzymmarkierten Hormons mit dem Hormon, welches sich in

der Milchprobe befindet, um die wenigen und konstanten Bindungsstellen am Antikörper. Nach der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte geleert und gewaschen. Für die Farbreaktion wurde ein Substrat zugegeben und zur Inkubation die Platte noch einmal im Dunklen 40 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Nach der Inkubation wurde Schwefelsäure als Stoppreagenz hinzugefügt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Es wurde für jede Milchprobe eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Lagen der Progesteronwert eins und Progesteronwert zwei einer Probe zu weit auseinander (relative Standardabweichung > 10 %), wurde die Analyse wiederholt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,3 ng/ml (GOCKEL 2008a).

Ein direkter Vergleich der Analysenwerte aus dem Labor für den Progesteron Gehalt in der Magermilch und vom Gerät eProCheck<sup>®</sup> für den Progesteron Gehalt in der Rohmilch ist nicht möglich. Zur Interpretation des nativen Progesteron Gehaltes auf der Grundlage von EIA-Laboranalysen werden die Magermilch-Schätzwerte mit dem Faktor 5 multipliziert (GOTTSCHALK 2007). Erwartungsgemäß ist bei beide EIA-Verfahren (eProCheck<sup>®</sup> und Labormethode) der Analysefehler an der unteren Nachweisgrenze für das Nicht-Vorhandensein von Progesteron (= Brunst) deutlich höher als bei aktiven Gelbkörpern in der Zyklusmitte.

### 3.3.6 Gynäkologische Untersuchungen

Alle Tiere wurden im Versuch regelmäßig auf ihren gesundheitlichen Status überprüft. Die Untersuchungen fanden in Abhängigkeit der jeweiligen Kalbung statt. Die Tiere wurden nach Abkalbedatum in Gruppen eingeteilt. Die Gruppenstärke belief sich auf drei bis sieben Tiere pro Gruppe. Die Untersuchungen wurden jeweils zwei Wochen, vier Wochen, sechs Wochen und acht Wochen (Abbildung 5) nach der Geburt von der Tierärztin des IfN Schönnow durchgeführt. In den Wochen 2, 6 und 8 p.p. fanden jeweils die Untersuchung des Allgemeinzustandes und eine Rektaluntersuchung der Fortpflanzungsorgane statt.

Die Allgemeinuntersuchung beinhaltete folgende Untersuchungspunkte:

- Beurteilung des Allgemeinbefindens der Tiere (Auffälligkeiten im Verhalten)
- Messung der Körpertemperatur
- Messung der Herz- und Atemfrequenz
- Messung der Pansenmotorik
- Beurteilung der äußeren Genitalien der Kuh (Verletzungen, Lage etc.)
- Dokumentation von eventuellem Scheidenausfluss
- Bestimmung des BCS und Messung der Rückenfettdicke.

Die Rektaluntersuchung beinhaltete die

- Größe und Aktivität der Ovarien (Follikel oder Gelbkörper),
- Symmetrie der Gebärmutterhörner,
- Größe, Kontraktilität und Beweglichkeit der Gebärmutter,
- Überprüfung der Gebärmutter auf Inhalt.

In der 4. Woche p.p. wurde bei allen Tieren zusätzlich zur Allgemein- und Rektaluntersuchung noch eine vaginale Untersuchung mittels Einwegspekulum durchgeführt. Die vaginale Untersuchung beinhaltete die

- Untersuchung der Scheide bzw. Scheidenschleimhäute auf Farbe und Feuchtigkeitsgrad,
- Untersuchung der Scheide auf Inhalt,
- Untersuchung des Muttermundes auf Form, Öffnungsgrad, Farbe und Feuchtigkeitsgrad.

Alle Daten wurden auf Untersuchungsbögen festgehalten, später digitalisiert und standen auch für diesen Versuch zur Verfügung.

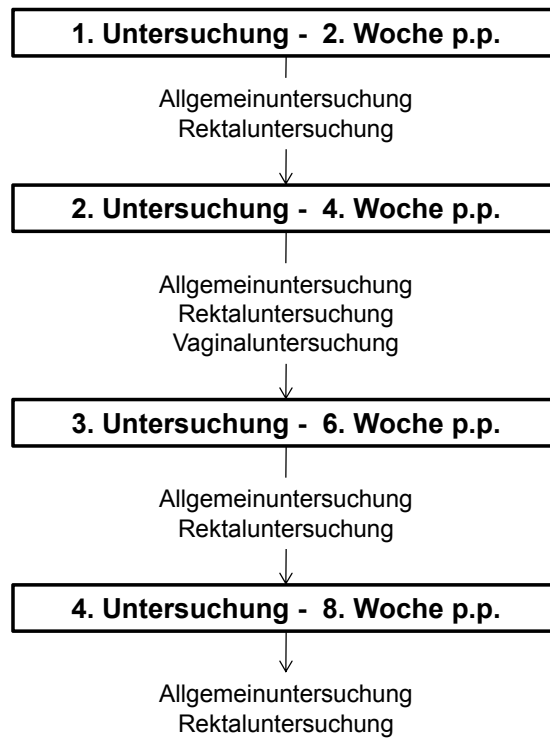


Abbildung 5: Ablauf der gynäkologischen Untersuchungen post partum

### 3.3.7 Synchronisationsprogramm und Ultraschalluntersuchung der Ovarien

Zusätzlich wurden alle Versuchstiere nach einem bestimmten Schema synchronisiert und danach terminorientiert besamt. Die Gruppeneinteilung wurde bei der Synchronisation und den Ultraschalluntersuchungen beibehalten.

Mit der Synchronisation wurde am 45. ± 3 Tage p.p. begonnen, d.h. die entsprechenden Tiere bekamen immer montags die 1. PGF<sub>2α</sub>-Injektion intramuskulär. Zwei Wochen später, ebenfalls montags, wurde den Tieren die 2. PGF<sub>2α</sub>-Injektion gespritzt. Immer mittwochs, also 60 Stunden nach der 2. PGF<sub>2α</sub>-Injektion, bekamen die Tiere gegen 20:00 Uhr GnRH injiziert. Nach der Injektion des GnRH wurde bei den Versuchstieren die Durchblutung des Follikels mittels Farbdopplersonografie (FDS-F) erfasst und später am PC planimetrisch gemessen. Am folgenden Donnerstag (12 - 16 Stunden nach der GnRH-Gabe) wurden die Tiere durch einen Besamungstechniker künstlich besamt. Sieben Tage nach der Besamung wurde bei den Versuchstieren erneut eine Farbdopplersonografie durchgeführt, um die Durchblutung des Gelbkörpers (FDS-CI) zu untersuchen. Am 30. Tag nach der Besamung wurde mittels Ultraschall eine Trächtigkeitskontrolle durchgeführt. Zwei Tiere wurden im Versuchszeitraum aus gynäkologischen Gründen nicht besamt. In Abbildung 6 ist der Ablaufplan der Synchronisation und der Ultraschalluntersuchungen über den Versuchszeitraum dargestellt.

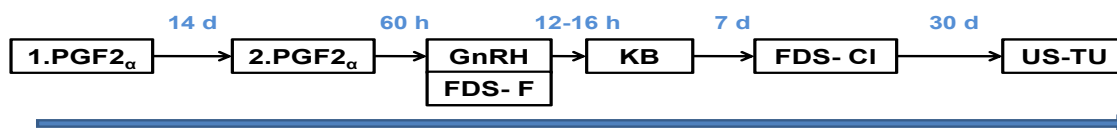


Abbildung 6: Ablaufplan der Synchronisation (nach GOCKEL 2008b)

Einen zusammenfassenden Überblick über alle veterinärmedizinischen Untersuchungsdaten gibt Tabelle 3.

**Tabelle 3: Materialübersicht der gynäkologischen Untersuchungen und der Synchronisation**

Anzahl Probanden	50
Ovarbefunde	linker Ovar: 180 rechter Ovar: 184
Ultraschallbefunde	50 Follikelbefunde 50 Gelbkörperbefunde
Uterusbefunde	200
Synchronisationsbehandlungen	150
künstliche Besamungen nach Synchronisation	48

### 3.4 Datenaufbereitung und -auswertung

Alle Daten, einschließlich der Daten aus dem Labor, der gynäkologischen Untersuchungen, der Synchronisationen und der Ultraschalluntersuchungen, wurden zunächst im Tabellenkalkulationsprogramm Excel gesammelt und chronologisch nach Datum und Tiernummer aufbereitet. Diese erste Datenaufbereitung ergab 1.484 Datensätze für die statistische Auswertung. Die Progesterongehalte des Analysegerätes und aus dem Labor wurden in verschiedene Niveaustufen eingeteilt. Diese sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Niveau- und Stufeneinteilung der Progesterongehalte**

Niveau	0	1	2	3	4	5
Stufe	extrem gering	sehr gering	gering	indifferent	hoch	sehr hoch
Gerätewert 1 u. 2 (GW_1, GW_2)	0-1,4 ng/ml	1,5-2,9 ng/ml	3,0-4,9 ng/ml	5,0-7,8 ng/ml	8,0-11,8 ng/ml	12,0-21,0 ng/ml
Progesteronwert Labor (PW_L)	< 0,30 ng/ml	0,30-0,60 ng/ml	0,61-1,00 ng/ml	1,01-1,60 ng/ml	1,61-2,39 ng/ml	2,40-4,24 ng/ml

In den 787 Rohdaten der Progesterongehalte aus dem Labor (PW\_L) wurde bei 398 Datensätzen die Nachweisgrenze von 0,3 ng/ml unterschritten. Weil jedoch auch das Nichtvorhandensein von Progesteron eine wichtige Information darstellt, wurden diese Laborbefunde mit einem Wert von 0,299 codiert und in der Datenanalyse berücksichtigt. Zusätzlich wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den Werten von Analysegerät und Labor ein transformierter Progesteronwert der Magermilchproben erstellt. Dazu wurde der Progesterongehalt der Magermilchproben mit einem Faktor von 5 multipliziert (GOTTSCHALK 2007). Für jedes Tier wurde individuell über den gesamten Versuchszeitraum ein Diagramm erstellt. In diesem wurde der Gerätewert 1 (GW\_1), der Gerätewert 2 (GW\_2), der transformierte Progesteronwert des Labors (tPW\_L), die festgestellten Brunstmerkmale, festgestelltes Abbluten, die Synchronisationsbehandlungen und die künstliche Besamung eingetragen.

Alle benötigten Daten für die statistische Auswertung wurden später in das Datenbankprogramm Access übertragen. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS Version 14.0 für Windows durchgeführt. Hiermit wurden die statistischen Maßzahlen, die Häufigkeitsverteilungen, die Regressionsanalyse und die Korrelationen nach Pearson zwischen den Progesterongehalten des Analysegerätes und aus den Magermilchproben die im Labor bestimmten Progesterongehalte berechnet.



Zum Vergleich von Mittelwerten wurde der t-Test für unabhängige Stichproben und zweiseitiger Fragestellung genutzt. Des Weiteren wurden für den getesteten Progesteron-Schnelltest die Sensitivität, Spezifität und Fehlerrate der erkannten Trächtigkeiten errechnet.

Die Sensitivität (1) gibt dabei den Anteil positiv erkannter Sachverhalte des Analysegerätes zu den tatsächlich positiven Sachverhalten an. Die Spezifität (2) gibt den Anteil der richtig negativ erkannten Sachverhalte des Analysegerätes zu den tatsächlich negativen Sachverhalten an. Die Fehlerrate (3) ist der Anteil falsch erkannter Sachverhalte an den insgesamt auftretenden Sachverhalten. Die Trächtigkeitsuntersuchungen mittels Ultraschall am 30. Tag nach der Besamung bildeten dazu die Referenzwerte.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\textit{true positive}}{(\textit{true positive} + \textit{false negative})} * 100 \quad (1)$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\textit{true negative}}{(\textit{false positive} + \textit{true negative})} * 100 \quad (2)$$

$$\text{Fehlerrate} = \frac{\textit{false positive}}{(\textit{false positive} + \textit{true positive})} * 100 \quad (3)$$

Des Weiteren wurden für das Analysegerät die Sensitivität und die Spezifität für das Erkennen einer Brunst berechnet. Referenz dafür waren die Ultraschalluntersuchungen der Follikel einen Tag vor der Besamung, anhand derer auch die Progesterongehalte der Milchproben mit dem Gerät analysiert wurden. Wurde bei der Ultraschalluntersuchung ein Follikel am Ovar gefunden, wurde aufgrund der vorangegangenen Synchronisation davon ausgegangen, dass sich die Kuh in der Brunst befindet und der dazugehörige Progesterongehalt unter einem bestimmten Schwellenwert liegen muss. Wurde bei der Ultraschalluntersuchung ein Gelbkörper am Ovar gefunden, wurde davon ausgegangen, dass sich die Kuh nicht in der Brunst befindet und der Progesterongehalt über dem Schwellenwert liegen muss.

Die Zyklusaktivität der Kühe wurde anhand der Progesteronprofile ausgezählt. Als azyklisch galten Tiere, bei denen die Progesteronkonzentration bis zum 45. Tag p.p. unter einem Schwellenwert von 5 ng/ml blieb und auch die gynäkologischen Befunde auf eine Azyklie deuteten. War bei zwei aufeinanderfolgenden Analysen der Progesteronwert in der Rohmilch über 5 ng/ml, so wurde dies als Zyklusaktivität gedeutet (WINDIG et al. 2007). Denn nur bei einer Progesteronkonzentration über 5 ng/ml kann von einem aktiven Gelbkörper ausgegangen werden (ROSSOW 2006, NEBEL 1987). Als Vergleich dienten die Labordaten aus der Magermilch, bei denen ebenfalls anhand von Progesteronprofilen die Zyklusaktivität ausgezählt wurde. Kriterium für eine Ovaraktivität war, ausgehend von drei aufeinanderfolgenden Untersuchungen, ein Progesterongehalt von > 0,4 ng/ml, wobei mindestens ein Wert > 0,9 ng/ml vorliegen musste.

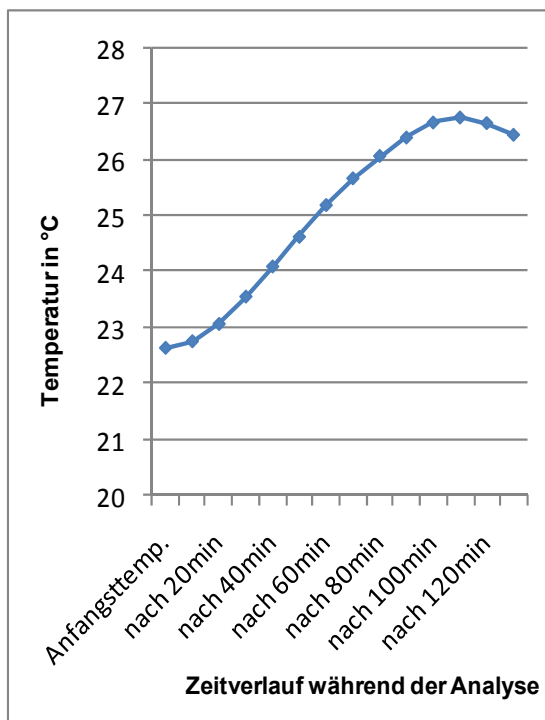
Des Weiteren wurden für die Progesteronwerte nach der künstlichen Besamung mit Hilfe der biologischen Daten, die aus den Untersuchungen und den Brunstbeobachtungen zur Verfügung standen, theoretische Zyklustage errechnet. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: tragend, nicht tragend und verlängerter Zyklus (Progesteronabfall erst am 20./22. Tag nach der Besamung). Nach der künstlichen Besamung konnte durch die abgeschlossene Synchronisation bei den nicht tragenden Tieren wieder ein normaler Zyklus erwartet werden. Der Zusammenhang zwischen den Progesteronverlaufskurven der nicht tragenden Tiere und der Erwartungskurve wurde über Korrelationen berechnet.

Abschließend wurde mittels t-Test überprüft, ob es Unterschiede im Anstieg der Progesteronkonzentration nach der Besamung zwischen der Gruppe „tragend“ und „nicht tragend“ gibt. Denn nach BOLLWEIN (2006) steigt die Progesteronkonzentration bei tragenden Tieren nach der Besamung steiler an als bei nicht tragenden Tieren. Dazu wurden die mittleren Progesterongehalte der jeweiligen Gruppe bis zum 12. Tag nach der Besamung mit einem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben ( $P < 0,05$ ) verglichen.

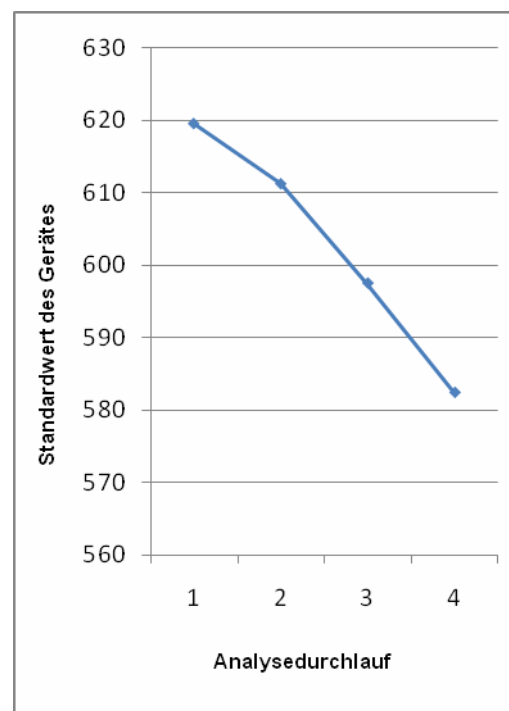
# 4 Ergebnisse

## 4.1 Vorversuch

Die Korrelation zwischen Erstbestimmung und Zweitbestimmung des Progesterongehaltes vom ersten Gerät betrug  $r = 0,73$  ( $P = 0,01$ ). Für das zweite Gerät wurde zwischen Erst- und Zweitbestimmung eine Korrelation von  $r = 0,81$  ( $P = 0,01$ ) berechnet. Beim zweiten Gerät lagen also die Werte von Erst- und Zweitbestimmung näher aneinander. Der Temperatur-Daten-Logger, der sich im ersten Gerät befand, wurde ausgelesen und ausgewertet. Dies ergab, dass sich die Temperatur im ersten Gerät während der vier Analysedurchläufe um durchschnittlich  $4,2\text{ °C}$  erhöhte. Ebenso wurde ermittelt, dass die Temperatur einen Einfluss auf den Standardwert, der vom Gerät ausgegeben wurde, hat (Abbildung 7 und Abbildung 8). Je höher die Temperatur, desto niedriger wurde der Standardwert des Gerätes. Ziel des Vorversuches war es, die Geräte zu justieren und die Schätzgleichungen, mit welchen das Gerät den Progesteronwert ausgibt, anzupassen - auch unter Berücksichtigung des Temperatureffektes.



**Abbildung 7: Mittlerer Temperaturverlauf während des Analysezeitraums**



**Abbildung 8: Mittlerer Standardverlauf in Abhängigkeit von der Messung**

Im Hauptversuch wurde sich für die optimierte Technik des zweiten Gerätes entschieden. Die Geräte wurden nach dem Vorversuch zum Hersteller geschickt, der auf Grundlage der Versuchsergebnisse die Schätzgleichung optimierte, die Ausgabe des Progesterongehaltes in ng/ml und die Software erweiterte. Zum Beginn des Hauptversuches standen die überarbeiteten Geräte wieder zur Verfügung.

## 4.2 Hauptversuch

### 4.2.1 Gerätehandhabung

Der Versuch wurde ohne besondere Einführung in die Gerätetechnik durchgeführt. Zur Verfügung stand die Gebrauchsanweisung, die relativ einfach aufgebaut, ausführlich und leicht verständlich ist und mit dem Gerät mitgeliefert wird. Das Gerät ist anwenderfreundlich, weil es die einzelnen Ablaufschritte vollautomatisch ausführt. Nach dem Einschalten braucht das Analysegerät ca. zwei Minuten, bis es zur Analyse bereit ist. Es müssen lediglich die Milchproben in die Reaktionsgefäße auf dem Probenschuh pipettiert und ins Gerät eingebracht werden. In einem Untersuchungsgang konnten maximal sieben Rohmilchproben und ein Standard analysiert werden. Für das Pipettieren des Milchtropfens in das Reaktionsgefäß werden spezielle Pipetten mitgeliefert, die das Vorgehen erleichtern. Das Pipettieren von sieben Milchproben in die sieben Reaktionsgefäße und das Zuweisen der Milchproben zu den Kühen im Gerät, um später Verwechslungen auszuschließen, dauerte ca. zwei Minuten. Nachdem die Milchproben ins Gerät eingebracht werden, führt dies den Progesteron-Schnelltest mittels EIA-Test durch, der abhängig von der Probenanzahl ca. 15 - 20 Minuten dauert. In dieser Zeit muss nicht auf das Gerät geachtet und es können andere Arbeiten ausgeführt werden.

Die geschätzten Progesterongehalte werden nach der Testdurchführung auf dem Display des Gerätes angezeigt. Die Ausgabe der Progesterongehalte lässt sich über Software variieren. Die Progesterongehalte können z. B. zur Vereinfachung in einer Balkendarstellung ausgegeben werden. Zusätzlich sind PC-Schnittstellen am Gerät vorhanden, womit sich die Daten des Gerätes schnell auf den Computer übertragen lassen.

Die zum Gerät gehörenden Reagenzien müssen im Kühlschrank bei ca. 4 °C aufbewahrt werden. Die Reagenzien befinden sich in einem Aufnahmeblock, der 20 Minuten vor Benutzung des Gerätes aus dem Kühlschrank entnommen werden soll, damit sie bei der Durchführung etwa Raumtemperatur angenommen haben. Das Auswechseln der Reagenzien im Aufnahmeblock ist ebenfalls detailliert in der Gebrauchsanweisung beschrieben und mit etwas Übung leicht auszuführen. Der Aufnahmeblock ist im Inneren mit Buchstaben (A B C D E) versehen, welche sich ebenfalls an den Reagenzmittelfläschchen befinden, wodurch ein Auswechseln der Reagenzien sehr einfach ist. Die Reagenzien sind so dosiert, dass sie für eine Packung Reaktionsgefäße reichen. In einer Packung befinden sich 12 Reihen mit acht Reaktionsgefäßen. Mit einer Packung lassen sich bis zu 84 Milchproben in 12 Untersuchungsgängen mit je einem Standard analysieren.

Der Zeitaufwand für einen Analysedurchlauf inklusive Pipettieren der Milchproben und Eingeben der entsprechenden Kuhnummern belief sich im Versuch für sieben Milchproben durchschnittlich auf 23,2 Minuten, sodass in einer Stunde ca. 18 Milchproben getestet werden können.

### 4.2.2 Verteilung der Progesterongehalte

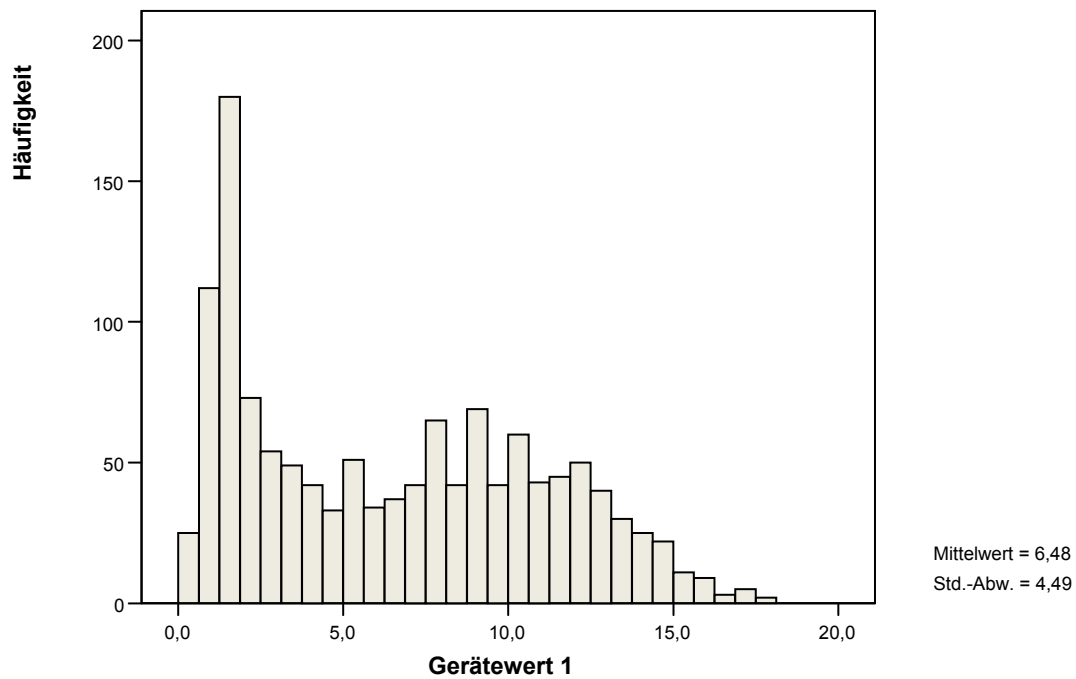
In Tabelle 5 sind die statistischen Maßzahlen zu den Progesterongehalten des Analysegerätes und aus den Laboruntersuchungen dargestellt.

**Tabelle 5: Statistische Maßzahlen der einzelnen Progesterongehalte**

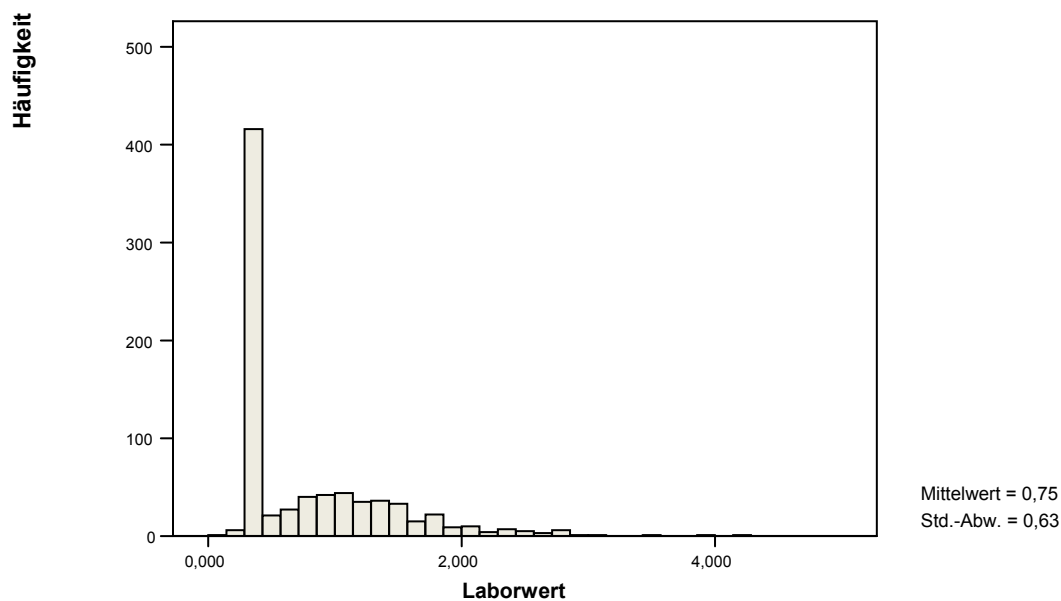
	Gerätewert 1	Gerätewert 2	Laborwert 1	transformierter Laborwert
Anzahl (n)	1295	370	787	787
Minimum (Min)	0,0	0,2	< 0,3	<1,5
Maximum (Max)	18,1	19,2	4,2	21,2
Mittelwert ( )	6,5	6,0	0,8	3,8
Standardabweichung (s)	4,5	4,3	0,6	3,2

Auffallend sind die hohen Standardabweichungen von GW\_1 und GW\_2. In Abbildung 9 und Abbildung 10 sind die Progesterongehalte und deren Häufigkeit für die Werte des Analysegerätes und die Werte des Labors für den gesamten Versuchszeitraum dargestellt.

Die Verteilung der Progesterongehalte von GW\_2 unterscheidet sich nicht wesentlich von der Verteilung von GW\_1 und wurde nicht dargestellt. Auffallend ist die hohe Anzahl der Werte im niedrigen Bereich. Diese waren aber durch die hohe Anzahl der Tiere mit Azyklie und den daraus resultierenden niedrigen Progesterongehalten zu erwarten.

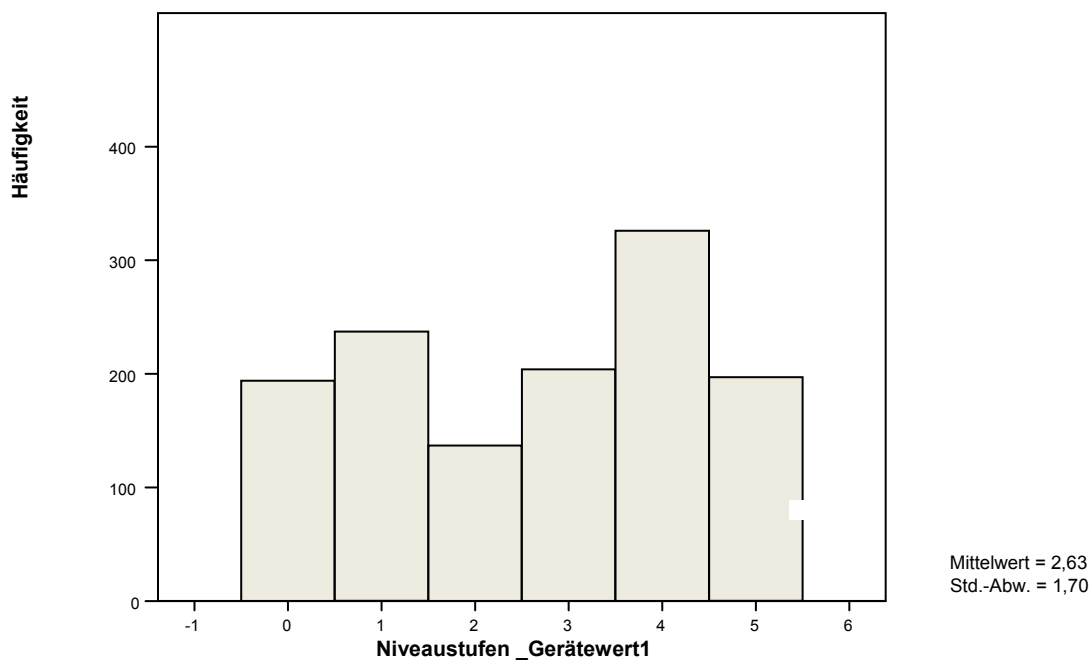


**Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der Progesterongehalte in der Rohmilch für GW\_1 (n=1.295)**

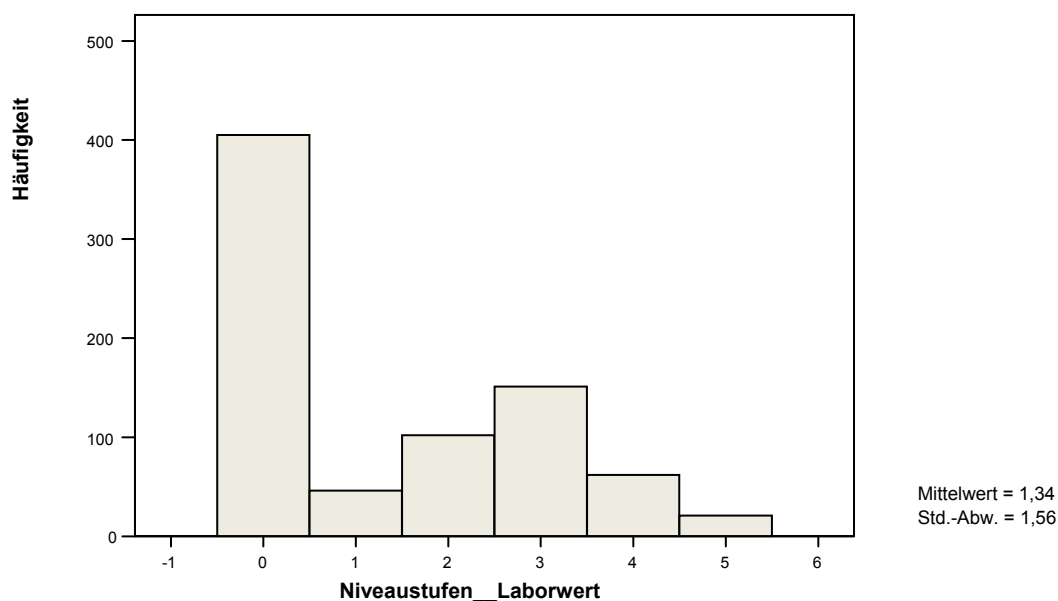


**Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der PW\_L in der Magermilch (n=787)**

In Abbildung 11 und Abbildung 12 ist die Verteilung der Niveaustufen für GW\_1 und PW\_L dargestellt. Zwischen der Verteilung in den Niveaustufen gab es zwischen GW\_1 und GW\_2 keine wesentlichen Unterschiede, weshalb nur GW\_1 dargestellt wurde. Bei den Progesteronwerten aus dem Labor ist in Abbildung 10 und Abbildung 12 zu erkennen, dass für es für die Progesterongehalte < 0,3 ng/ml einen Peak im niedrigen Bereich gibt, der darauf zurückzuführen ist, dass 398 Werte unter der Nachweisgrenze lagen. Auf die Darstellung der transformierten Progesteronwerte wurde verzichtet, weil eine Analogie der Verteilung zwischen PW\_L und tPW\_L zu erwarten ist. Durch die Transformation wurde lediglich die Skala der Werte vergrößert, die Verteilung der Progesterongehalte verändert sich dadurch aber nicht.



**Abbildung 11: Verteilung der Niveaustufen der Rohmilchproben für GW\_1 (n=1295)**



**Abbildung 12: Verteilung der Niveaustufen der Magermilchproben des PW\_L (n=787)**

#### 4.2.3 Die Genauigkeit des Analysegerätes

Die Analyse der Genauigkeit erfolgte durch den Vergleich der Progesterongehalte in der Rohmilch, die vom Analysegerät ermittelt wurden, mit den Progesterongehalten in der Magermilch, die im Labor gemessen wurden. Die Korrelation zwischen GW\_1 und GW\_2 (n = 370) betrug  $r = 0,931$ . Die Korrelation zwischen GW\_1 und PW\_L (n = 785) betrug  $r = 0,742$ . Zwischen GW\_2 und PW\_L (n = 222) wurde eine Korrelation von  $r = 0,782$  errechnet. Zur besseren Übersicht sind die Korrelationen des Gesamtmaterials in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6: Korrelationsmatrix des Gesamtmaterials**

	Gerätewert 1	Gerätewert 2	Laborwert 1	transformierter Laborwert
Gerätewert 1 n		0,931** 370	0,742** 785	0,742** 785
Gerätewert 2 n	0,931** 370		0,782** 222	0,782** 222
Laborwert n	0,7742** 785	0,782** 222		1,000** 787
transformierter Laborwert n	0,742** 785	0,782** 222	1,000** 787	

\*\* Die Korrelation ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

In Abbildung 13 sind die in der Rohmilch geschätzten Progesteronwerte (GW\_1 und GW\_2) und in Abbildung 14 die Wertepaare des ersten Gerätewertes für Rohmilch (GW\_1) und des Laborwertes aus der Magermilch (PW\_L) als Punktwolke dargestellt.

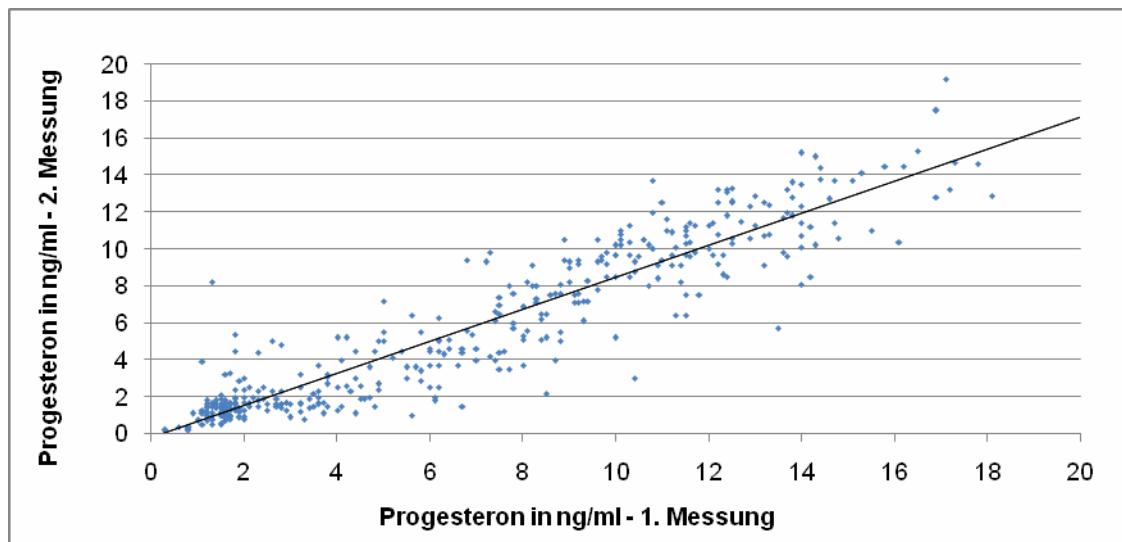


Abbildung 13: Vergleich der Progesterongehalte von GW\_1 und GW\_2

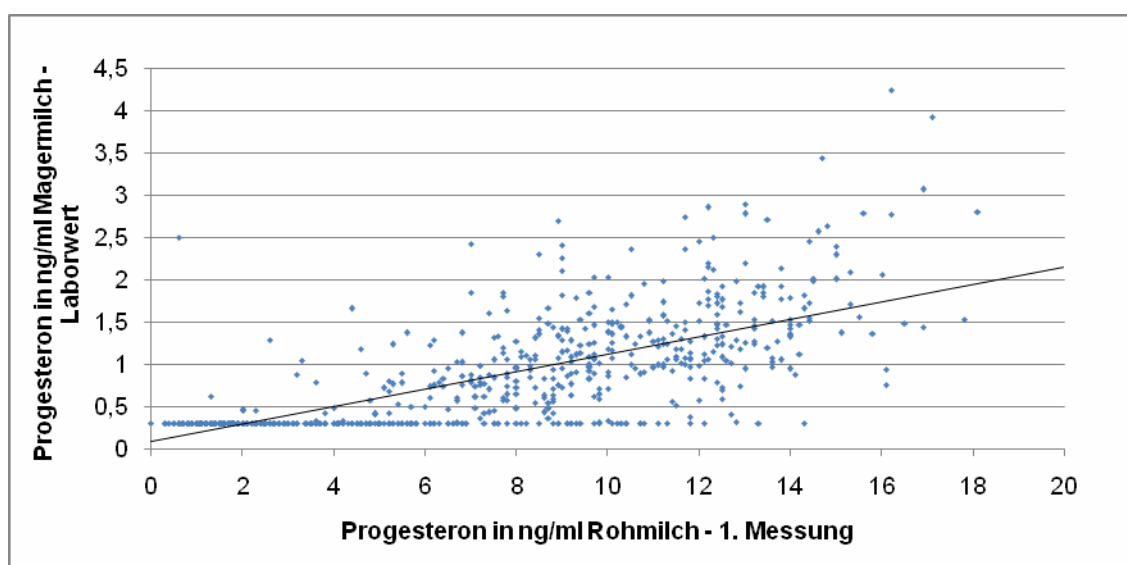


Abbildung 14: Vergleich der Progesterongehalte GW\_1 (Rohmilch) und PW\_L (Magermilch)

Aufgrund der Tatsache, dass ein hoher Anteil der Progesteronwerte (398 Proben = 50,6 %) aus dem Labor unter der Nachweisgrenze ( $< 0,3$  ng/ml Magermilch) lag, wurde die partielle Korrelation zwischen GW\_1 und PW\_L unter Ausschluss der Progesteronwerte gerechnet. Hier ergab sich eine deutlich engere Korrelation von  $r = 0,926$  ( $P = 0,01$ ;  $n = 389$ ) zwischen den Progesteronwerten aus der Rohmilch (GW\_1) und aus der Magermilch (PW\_L).

#### 4.2.4 Brunsterkennung

Insgesamt wurden bei den Tieren im Versuchszeitraum 61 Brunsten visuell beobachtet. Von diesen 61 erkannten Brunsten wurden 49 (80 %) vom Analysegerät mit einem Progesterongehalt unter 3 ng/ml bestätigt. Bei 12 Brunsten (20 %) lag der Progesterongehalt über 3 ng/ml. Im Vergleich dazu wurden mit den Progesterongehalten aus dem Labor 56 von 61 Brunsten (91 %) mit einem Progesterongehalt unter 0,4 ng/ml erkannt.

Des Weiteren wurden durch die Aktivitätssensoren am Hals 15 erhöhte Bewegungsaktivitäten gemessen, was auf eine Brunst schließen lässt. Von den erhöhten Aktivitäten wurden 100 % mit einem Progesterongehalt von unter 3 ng/ml mit Analysegerät erkannt. 11 (22 %) von 50 Tieren zeigten im Versuchszeitraum keinerlei äußere Anzeichen einer Brunst, darunter waren acht Erstkalbinnen und drei Kühe in höherer Laktation. Weil bei der visuellen Brunstbeobachtung Fehler durch die begutachtende Person entstehen können, wurden zusätzlich die Daten der Follikel-Ultraschalluntersuchung mittels Farbdopplersonografie, die einen Tag vor der Besamung durchgeführt wurde, und die Progesterongehalte, die am selben Tag der Ultraschalluntersuchung



vom Gerät ausgegeben wurden, verglichen. Dazu wurde die Sensitivität und Spezifität errechnet. Geprüft wurde, mit welcher Genauigkeit das Analysegerät die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung wiedergeben kann. Dazu wurden die tatsächliche Sachverhalte der Ultraschalluntersuchung und die erkannten Sachverhalte des Analysegerätes in Tabelle 7 gegenübergestellt.

Für das Erkennen der Follikel mit einem Progesteron Gehalt unter 3 ng/ml (DARWASH et al. 1997) wurden eine Sensitivität von 85,42 % und eine Spezifität von 100 % errechnet. Die Spezifität von 100 % resultiert daraus, dass der Test die zwei Kühe, die zur Ultraschalluntersuchung einen Gelbkörper aufwiesen, mit einem Progesteron Gehalt von über 3 ng/ml erkannte. Weil die Angaben in der Literatur zum Progesteron Gehalt während der Brunst (keine Aktivität des Gelbkörpers) unterschiedlich sind, wurde zum Vergleich die Sensitivität und die Spezifität für unter 2 ng/ml (OBRITZHAUSER & BEHM 2005) und für unter 5 ng/ml (NEBEL et al. 1987) berechnet. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 7: Wahrheitstabelle zur Follikeluntersuchung (n = 50)**

		WAHRER SACHVERHALT Ultraschalluntersuchung		
		Follikel, Follikelzyste (< 3 ng/ml)	Gelbkörper (> 3 ng/ml)	
ERKANNTER SACH-VERHALT  durch Analysegerät	Follikel, Follikelzyste (< 3 ng/ml)	41 (TP)	0 (FP)	41
	Gelbkörper (> 3 ng/ml)	7 (FN)	2 (TN)	9
		48	2	Gesamt 50

TP: true positive, FP: false positive, FN: false negative, TN: true negative

**Tabelle 8: Vergleich der Sensitivität und Spezifität für einzelne Progesteronschwellenwerte (n = 50)**

Schwellenwerte für den Progesteron Gehalt	Sensitivität in %	Spezifität in %
unter 2 ng/ml	72,92	100
unter 3 ng/ml	85,42	100
unter 5 ng/ml	95,83	100

#### 4.2.5 Trächtigkeitsdiagnose

Bei der Trächtigkeitsdiagnose war die Referenz die Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall. Auch hier wurden die Sensitivität und die Spezifität des Progesteron-Schnelltestes berechnet sowie zusätzlich noch die Fehlerrate. Die Diagnose „tragend“ oder „nicht tragend“ wurde für jedes Tier anhand des Progesteronprofils nach der KB erstellt. 12 Kühe wurden anhand der ausgegebenen Werte durch das Gerät als „tragend“ eingestuft. Tatsächlich „tragend“ waren aber nur 10 Tiere, worunter sich drei Tiere in der 1. Laktation befanden und sieben Tiere, die bereits in einer höheren Laktation waren. In Tabelle 9 sind die einzelnen Sachverhalte des Analysegerätes und der Ultraschalluntersuchung noch einmal aufgeführt.

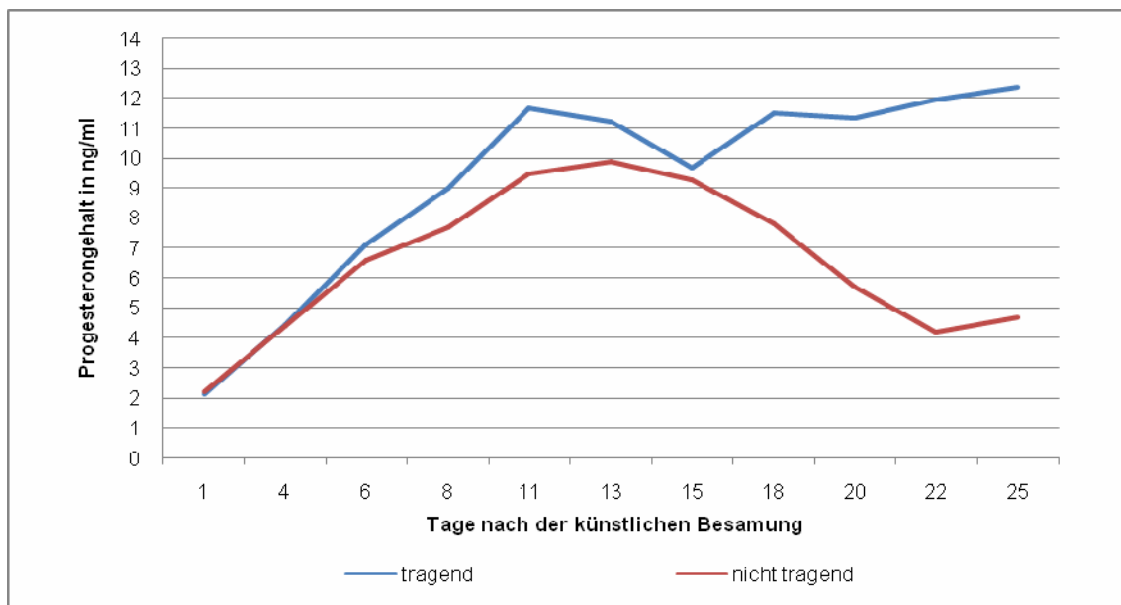
**Tabelle 9: Wahrheitstabelle zur Trächtigkeitsuntersuchung (n = 48)**

		WAHRER SACHVERHALT Ultraschalluntersuchung		ERKANNTER SACH-VERHALT durch Analysegerät	
		tragend	nicht tragend		
ERKANNTER SACH-VERHALT durch Analysegerät	tragend	10 (TP)	2 (FP)	12	TU +
	nicht tragend	0 (FN)	36 (TN)	36	TU -
		10 tatsächlich TU +	38 tatsächlich TU -	Gesamt 48	

TP: true positive, FP: false positive, FN: false negative, TN: true negative

Die Sensitivität betrug 100 %, weil alle tragenden Kühe erkannt wurden. Für die Spezifität wurden 95 % errechnet und die Fehlerrate belief sich auf 16,7 %.

Zusätzlich wurden die Progesteronergehalte am Tag 20, 22 und 25 nach der Besamung überprüft. Hier wurde mittels t-Test ( $P = 0,05$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die tragend und den Tieren, die nicht tragend waren, nachgewiesen. Die Progesteronkonzentration am Tag 20, 22 und 25 nach der Besamung betrug bei den nicht tragenden Tieren ( $n = 36$ )  $_{20} = 5,7 \pm 4,1$  ng/ml,  $_{22} = 4,2 \pm 4,1$  ng/ml und  $_5 = 4,7 \pm 3,5$  ng/ml. Die mittlere Progesteronkonzentration der tragenden Kühe ( $n = 10$ ) am Tag 20, 22 und 25 betrug  $_{20} = 11,4 \pm 2,4$  ng/ml,  $_2 = 12,0 \pm 1,9$  ng/ml und  $_5 = 12,4 \pm 1,8$  ng/ml.



**Abbildung 15: Mittlerer Progesteronverlauf der tragenden (n = 10) und der nicht tragenden Kühe (n = 36)**

In Abbildung 15 ist der mittlere Progesteronverlauf in Abhängigkeit von den Tagen nach der Besamung der tragenden und nicht tragenden Tiere dargestellt. Vier Tiere wurden bei dieser Auswertung nicht mit einbezogen. Dies waren zum einen die zwei Kühe, die nicht besamt wurden und zum anderen die zwei Kühe, die in der Gelbkörperphase besamt wurden.

#### 4.2.6 Bestimmung der Zyklusaktivität

Bis zum 45. Tag p.p., also bis zum Synchronisationsbeginn, zeigten 40 Tiere (80 %) einen aktiven Zyklus. Dagegen hatten 10 Tiere (20 %) bis zum 45. Tag p.p. keinerlei Zyklusaktivität, darunter waren fünf Erstkalbinnen und fünf Kühe höherer Laktation. Von diesen 10 Tieren zeigten sechs Tiere trotz Synchronisation bis zur künstlichen Besamung (63. Tag p.p.) keine Zyklusaktivität. Die Ergebnisse waren bei einem Tier abweichend zu den Ergebnissen der Progesteronprofile aus dem Labor. Hier zeigten nur 39 Tiere bis zum 45. Tag p.p. eine Zyklusaktivität und 11 Tiere keine Zyklusaktivität. Von diesen zeigten sieben Tiere bis zur Besamung weiterhin keine Zyklusaktivität (GOCKEL 2009). Ein Vergleich ist in Tabelle 10 gegeben.

**Tabelle 10: Häufigkeiten und relativer Anteil für das Auftreten aktiver Zyklen und Azyklie im Vergleich**

	Analysegerät		Labor (Magermilch)		
	Häufigkeiten	Prozent	Häufigkeiten	Prozent	
Zyklus			Zyklus		
mind. 2 aufeinander folgende Untersuchungen über 5 ng/ml	40	80	mind. 3 aufeinander folgende Untersuchungen über 0,4 ng/ml und eine davon über 0,9 ng/ml	39	78
Azyklie			Azyklie		
unter Schwellenwert von 5 ng/ml bis zum 42. Tag p.p.	10	20	unter Schwellenwert von 0,4 ng/ml bis zum 42. Tag p.p.	11	22
Gesamt	50	100		50	100

Des Weiteren wurde die Zyklusaktivität nach der Besamung beurteilt. In der Gruppe „tragend“ überschritten drei Tiere am 4. Tag nach der KB den Schwellenwert von 5 ng/ml, weitere fünf Tiere überschritten den Schwellenwert am 6. Tag, ein Tier am 8. Tag und ein Tier am 11. Tag nach der Besamung. In der Gruppe „nicht tragend“ stieg die Progesteronkonzentration bei neun Tieren am 4. Tag nach der Besamung über den Schwellenwert von 5 ng/ml an. Bei weiteren 14 Tieren wurde der Schwellenwert am 6. Tag und bei weiteren sechs Tieren am 8. Tag überschritten. Drei Tiere zeigten erst am 11. Tag nach der Besamung einen Progesteronanstieg über 5 ng/ml und bei zwei Tieren stieg die Progesteronkonzentration erst am 17. Tag nach der Besamung über den Schwellenwert. Weitere zwei Tiere zeigten keinen Anstieg in der Progesteronkonzentration nach der Besamung. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse für den Progesteronanstieg für beide Gruppen und für die Gruppe „nicht tragend“ die Ergebnisse für den Progesteronabfall dargestellt.

**Tabelle 11: Verteilung der Probanden an ausgewählten Zyklustagen nach der Besamung hinsichtlich des Über- bzw. Unterschreitens eines Schwellenwertes von 5 ng/ml Rohmilch**

		Anstieg der Progesteronkonzentration über 5 ng/ml						
Tag nach der Besamung	kein Anstieg	4	6	8	11	17	gesamt	
n gesamt	2	12	19	7	4	2	46*	
davon „tragend“		( 3 )	( 5 )	( 1 )	( 1 )		( 10 )	
% gesamt	4,3	26,2	41,3	15,2	8,7	4,3	100	

		Abfall der Progesteronkonzentration unter 5 ng/ml							
Tag nach der Besamung	11	13	15	18	20	22	25	kein Abfall	gesamt
n	1	1	1	8	8	8	5	2	34**
%	2,9	2,9	2,9	23,5	23,5	23,5	14,8	5,9	100

\* ohne die Tiere, die nicht besamt und in der Gelbkörperphase besamt wurden

\*\* wie \* zusätzlich ohne tragende Tiere und ohne die Tiere, die keinen Progesteronanstieg nach der KB zeigten

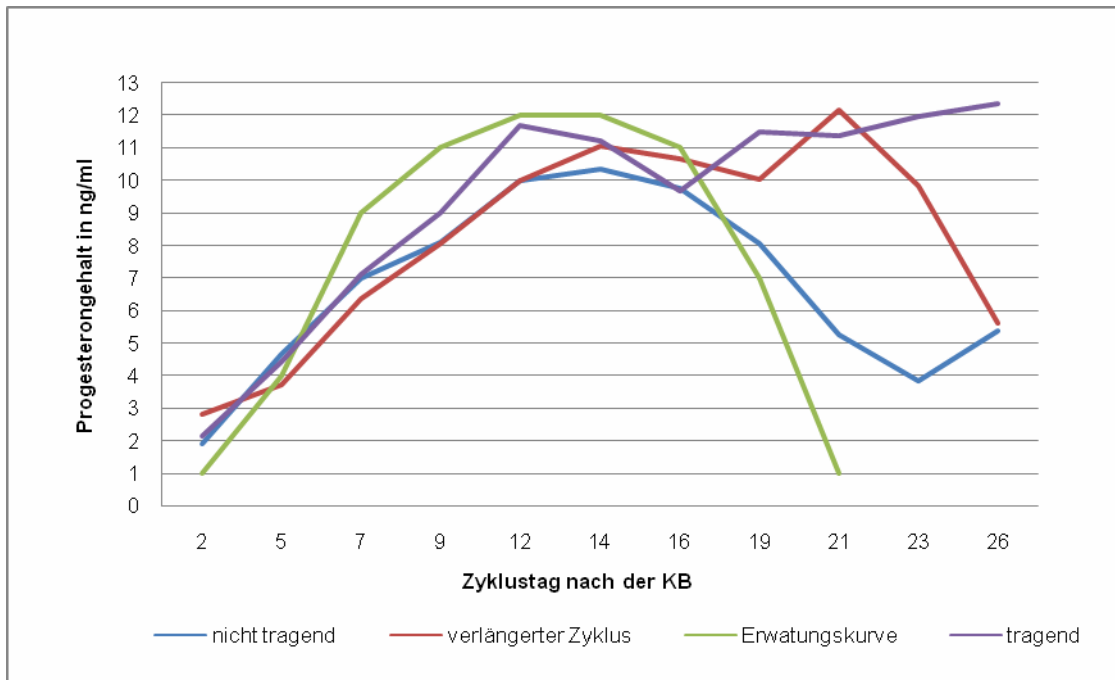
Aus Tabelle 11 kann abgeleitet werden, dass der Schwellenwert von 5 ng/ml im Durchschnitt am 7. Tag nach der Besamung überschritten wird, bis im Durchschnitt am 20. Tag nach der Besamung die Grenze wieder unterschritten wird. Ein Vergleich zu den Progesteronwerten aus dem Labor konnte hier nicht stattfinden, weil ab dem 75. Tag p.p. nur noch einmal wöchentlich eine Milchprobe genommen wurde. Damit standen zu wenig Progesterongehalte zur Verfügung, um eine Einschätzung vornehmen zu können.

#### 4.2.7 Beurteilung der Zyklusqualität mittels Progesteronprofilen

In diesem Abschnitt wurde überprüft, inwieweit sich die Progesteronprofile nach der künstlichen Besamung von den Probanden mit einem aktiven, zyklischen Gelbkörper mit einer Erwartungskurve des Progesterongehaltes nach RIOUX & RAJOTTE (2004) vergleichen lassen. Der mittlere Progesteronverlauf der Gruppen und die Erwartungskurve sind in Abbildung 16 dargestellt.

In den ersten zwei Dritteln des Zyklus konnten enge bis mittlere partielle Korrelationen zwischen der Erwartungskurve und den tatsächlichen Progesteronprofilen geschätzt werden. Für die normal zyklischen, nicht tragenden Tiere (n = 33) wurde eine Korrelation nach Pearson von  $r = 0,92$  ( $P = 0,01$ ) zwischen den Erwartungswerten bis zum 16. Zyklustag und den Progesteronwerten berechnet. Bei den tragenden Tieren (n = 10) wurde ein Zusammenhang von 0,81 ( $P = 0,05$ ) geschätzt. Für die Progesteronverlaufskurve der Tiere mit einem verlängertem Zyklus (n = 3) und der Erwartungskurve lag der Korrelationskoeffizient aufgrund der geringen Stichprobe deutlich niedriger ( $r = 0,42$ ;  $P = 0,01$ ).

Des Weiteren konnte zwischen der Erwartungskurve für den 19., 21. und 23. Zyklustag und der Progesteronverlaufskurve der nicht tragenden Tiere, die einen normalen Zyklus nach der künstlichen Besamung zeigten, kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ( $P < 0,05$ ).



**Abbildung 16: Vergleich einer Standardprogesteronkurve (nach Rioux & RAJOTTE 2004) mit den gemittelten Progesteronverläufen**

Zum Schluss wurde überprüft, ob es Unterschiede im Progesteronanstieg zwischen den tragenden und nicht tragenden Tieren gab. Hier wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Anstiegen der Progesteronkonzentration in den beiden Gruppen gefunden.

## 5 Diskussion

Ziel der Untersuchung war es, den neu entwickelten Dosier- und Analyseautomat eProCheck<sup>®</sup> zur Progesteronbestimmung auf seine Handhabung und Genauigkeit in Bezug auf Brunsterkennung, Trächtigkeitsdiagnose und Einschätzung der Zyklusaktivität zu beurteilen. Dazu wurden von 50 Milchkühen des LVG Köllitsch ab dem 28. Tag p.p. dreimal wöchentlich Milchproben entnommen und mit dem Analysegerät auf den Progesteron Gehalt untersucht. Zum Vergleich standen die Progesteron Gehalte der gleichen Milchproben aus der Laboranalyse und gynäkologische Befunde der Tiere zur Verfügung.

Im Vergleich zu manuellen Progesteron-Schnelltests hat das hier getestete Gerät den Vorteil, dass keine Reagenzien selbst gemischt werden müssen. Auch die Farbveränderung wird mittels Laser automatisch gemessen und muss nicht mit dem bloßen Auge abgelesen werden. Der zur Funktion der Farbintensität errechnete Progesteron Gehalt wird im Display ausgegeben und lässt sich über eine PC-Schnittstelle auf den Stallcomputer übertragen und mittels mitgelieferter Software weiter bearbeiten, was bei manuellen Schnelltests nicht möglich ist. Ein weiterer Vorteil des Gerätes ist die Anzahl der zu testenden Milchproben. Es können bis zu sieben Milchproben gleichzeitig getestet werden, wodurch der Gesamtzeitaufwand geringer wird.

Die Genauigkeit zwischen dem Analysegerät als „on-farm-test“ unter Stallbedingungen und dem EIA-Test unter Laborbedingungen wurde über Korrelationen berechnet. Im Gesamtmaterial wurde eine Korrelation zwischen den Progesteron Gehalten des Analysegerätes und den Progesteron Gehalten aus dem Labor von  $r = 0,742$  erreicht. Es besteht also ein positiver Zusammenhang zwischen den Progesteron Gehalten, die das Gerät ausgab und den Progesteron Gehalten, die im Labor bestimmt wurden. In einer früheren Studie von NEBEL et al. (1987) wurde die Übereinstimmung einer laborgebundenen Methode (RIA) und einem ELISA on-farm-test bestimmt. Die Korrelation der beiden Methoden betrug  $r = 0,79$ .

In einer weiteren Studie von SORBIRAJ et al. (1995) wurden vier verschiedene Milchprogesteron-Schnelltests im Vergleich zu einer laborgebundenen Methode (EIA) untersucht. Hier betrug die Übereinstimmung zwischen Labormethode und Pro-

gesteron-Schnelltests über das Gesamtmaterial 69,5 % bis 91 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Genauigkeit des Gerätes noch Verbesserungsbedarf besteht. Bei den Tieren im AMS-Stall konnte nicht wie bei den Tieren aus dem Laufstall gewährleistet werden, dass die Milchproben aus dem Anfangsgemelk entnommen wurden. Weil sich Anfangsgemelk und Nachgemelk im Fettgehalt unterscheiden und die Progesteronkonzentration mit der Milchfettkonzentration positiv korreliert (NUTI et al. 1975, GINTHER et al. 1976), kann es zur Verschiebung einzelner Progesteronmesswerte gekommen sein.

Diese These konnte jedoch in einer nachfolgenden Studie nicht bestätigt werden. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Progesteronwerten aus dem Anfangs- und aus dem Nachgemelk betragen  $r_p = 0,98$  bzw.  $r_{sp} = 0,93$ . Im Erwartungsbereich unter 6 ng Progesteron je ml Rohmilch lagen die Analysewerte aus dem Anfangsgemelk tendenziell leicht über denen aus dem Nachgemelk. Bei einem aktiven Gelbkörper war jedoch dieser Trend genau umgekehrt und es wurden deutlich höhere Progesteronwerte im Nachgemelk gefunden.

Bei den Laborproben wurde hingegen die Magermilch zur Analyse verwendet. Die Rohmilchproben wurden durch Zentrifugation entfettet, wodurch die Milchproben jederzeit unabhängig entnommen werden können. Hier unterscheiden sich Progesterongehalte von Anfangs- und Nachgemelksproben nicht. Das kann bei den Rohmilchproben, die mit dem Gerät analysiert wurden, einzeln verschobene Progesterongehalte ergeben, wodurch schlechtere Korrelationswerte zwischen den Progesteronwerten vom Gerät und aus dem Labor entstanden sein könnten. Die hier vorliegenden Ergebnisse führten bereits zu einer Weiterentwicklung des Gerätes. Das neu entwickelte Analysegerät arbeitet nun mit zwei statt nur mit einem Standard, wodurch die Schätzgleichung, mit der die Progesterongehalte der Milchprobe berechnet werden, genauer sind.

Wie bereits erwähnt, spielt die Brunstbeobachtung und -erkennung eine Schlüsselrolle im Fruchtbarkeitsmanagement. Denn nur wenn die Tiere mehrmals täglich beobachtet werden, kann eine gute Brunsterkennungsrate erreicht werden und damit auch eine erfolgreiche Besamung der Kühe stattfinden. Im Versuch wurden 61 Brunsten visuell beobachtet. Davon wurden 49 (80 %) mit einem Progesterongehalt unter 3 ng/ml erkannt und 14 (20 %) Kühe wiesen zum Zeitpunkt der beobachteten Brunst einen Progesterongehalt über 3 ng/ml auf. Ähnliche Resultate wurden von NEBEL et al. (1987) beobachtet, bei denen 24,4 % der Kühe, die als brünstig beobachtet wurden, einen erhöhten Progesterongehalt aufwiesen. In einer weiteren Studie von MOORE & SPAHR (1991) gab es zwischen Brunstbeobachtung und on-farm-Progesterontest eine Übereinstimmung von 98 %. Die 20 % der visuell beobachteten Brunsten, die nicht vom Gerät erkannt wurden, müssen nicht zwangsläufig der Gerätegenauigkeit zugeschrieben werden. Ein Teil davon kann durch Fehler in der Brunstbeobachtung entstanden sein. Die Fehlerrate bei der Brunstbeobachtung wird mit 20 % angegeben (BOOTH 1979, GRUNERT 1999a, OBRITZHAUSER & BEHM 2005).

Im Versuch wurde nur eine zweimalige Brunstbeobachtung durchgeführt, was zu einer geringeren Brunsterkennungsrate führen kann. In der Literatur wird mindestens eine zweimal tägliche, idealerweise aber eine drei- bis viermalige Beobachtung der Tiere empfohlen (HOLTZ & MEINHARDT 1993). Aufgrund der Tatsache, dass die Brunstbeobachtungen fehlerhaft sein können, wurden die Sensitivität und die Spezifität der ausgegebenen Progesterongehalte des Gerätes zu den Follikel-Ultraschalluntersuchungen berechnet, die einen Tag vor der Besamung der Tiere stattfanden. Aufgrund der verschiedenen Literaturangaben wurde die Berechnung für drei Schwellenwerte durchgeführt. Die Sensitivitäten für die Schwellenwerte 2 ng/ml, 3 ng/ml und 5 ng/ml betragen 72,92 %, 85,42 % und 95,83 %.

Die Spezifität betrug in allen Fällen 100 %. Dazu wurden in der Literatur keine Vergleichsarbeiten gefunden. Aus den Ergebnissen ist aber ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines Follikels und einer niedrigen Progesteronkonzentration zu erkennen. Die Bestimmung des Progesterongehaltes in der Milch kann ein nützliches Hilfsmittel zur Brunsterkennung sein. Gerade bei Kühen, die nur schwache Brunstsymptome zeigen und bei denen sich die zu beobachtende Person nicht sicher sein kann, ob sich die Kuh tatsächlich in Brunst befindet oder nicht, kann eine Analyse der Milchprobe Aufschluss bringen. Der Progesteron-Schnelltest bringt ein zusätzliches Merkmal in die Brunstbeobachtung ein, kann und soll die Brunstbeobachtung aber nicht ersetzen. Liegt der Progesteronwert unter einem Schwellenwert, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Kuh in der Brunst befindet. Er zeigt aber nicht den optimalen Besamungszeitpunkt an. Liegt der Progesteronwert über einem Schwellenwert, ist davon auszugehen, dass sich die Kuh in der Gelbkörperphase befindet und nicht in Brunst ist.

Es gab bereits zahlreiche Studien, die das Einsetzen der Progesteronanalyse zur frühen Trächtigkeitsdiagnose bestätigten (PENNINGTON et al. 1975, COX et al. 1978, NEBEL et al. 1987, RAJAMAHENDRAN et al. 1993, OBRITZHAUSER & BEHM 2005). Die Sensitivität, mit der die tragenden Tiere (n=10) erkannt wurden, betrug in dieser Untersuchung 100 %. Eine solch hohe Genauigkeit

wurde in anderen Arbeiten nicht erzielt. Hier beliefen sich die Sensitivitäten für das Erkennen tragender Tiere auf 67 % (Cox et al. 1978), 75,8 % (NEBEL et al. 1987) und 72 % (RAJAMAHENDRAN et al. 1993). Die hohe Sensitivität in dieser Arbeit beruht sicherlich darauf, dass die Diagnosen „tragend“ oder „nicht tragend“ anhand des gesamten Progesteronprofils nach der Besamung gestellt wurde. Die Spezifität, mit der nicht tragende Tiere (n=36) erkannt wurden, betrug 95 % und stimmt mit den Ergebnissen von anderen Untersuchungen überein. Dort wurden 87 % (Cox et al. 1978), 93,9 % (NEBEL et al. 1987) und 94 % (RAJAMAHENDRAN et al. 1993) der nicht tragenden Kühe mittels Progesteronanalyse erkannt.

Des Weiteren konnten in dieser Untersuchung signifikante Unterschiede in der Progesteronkonzentration von tragenden und nicht tragenden Tieren an den Tagen 20, 22 und 25 nach der Besamung nachgewiesen werden. In einer Studie von Cox et al. (1978) wurde ebenfalls für den 20. ± 3 Tage ein signifikanter Unterschied zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren nachgewiesen. Auch RAJAMAHENDRAN et al. (1993) bestätigt die Unterschiede in der Progesteronkonzentration am 21. Tag nach der Besamung bei tragenden und nicht tragenden Kühen. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass der Progesteron-Schnelltest dazu geeignet ist, bereits ab dem 20. Tag nach der Besamung Aussagen hinsichtlich der Trächtigkeit bzw. Nicht-Trächtigkeit zu geben. Damit kann der Progesteron-Test die frühestmöglichen Ergebnisse in der Trächtigkeit- bzw. Nicht-Trächtigkeitsdiagnose liefern. Um die Genauigkeit zu erhöhen, empfiehlt es sich, zwei bis drei Progesteronanalysen z. B. am 19., 21. und 23. Tag nach der Besamung durchzuführen. Bei Tieren, die als „nicht tragend“ bestimmt wurden, kann somit der zu erwartende Östrus für eine wiederholte Besamung genutzt werden. Dadurch lassen sich die Güst- und Zwischenkalbezeit deutlich verkürzen und die Wirtschaftlichkeit des Betriebszweiges Milcherzeugung verbessern.

Bei der Diagnose „tragend“ aufgrund des hohen Progesterongehaltes in der Rohmilch sollten aber auch weitere Ursachen wie eine Gelbkörperzyste oder ein verlängerter Zyklus abgeklärt werden. Aus diesem Grund sollte nicht auf eine tierärztliche Trächtigkeitsdiagnose verzichtet werden.

Das Einsetzen der Zyklusaktivität nach der Abkalbung ist ein wichtiger Aspekt im reproduktiven Fruchtbarkeitsgeschehen der Milchkuhe. Mit gezielten Untersuchungen von Milch- oder Blutproben auf den Progesterongehalt nach der Abkalbung, können wichtige Informationen über das Zyklusgeschehen der Kühe getroffen werden. Aus diesem Grund wurde für das geprüfte Gerät eine Einschätzung zur Bestimmung der Zyklusaktivität vorgenommen. Es zeigten 80 % der Versuchstiere bis zum Beginn des Synchronisationsprogramms, also bis zum 45. Tag, bereits eine Zyklusaktivität. Kriterium für das Vorhandensein einer Zyklusaktivität war, dass der Progesterongehalt bei zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen > 5 ng/ml sein musste (WINDIG et al. 2007). 20 % der Tiere zeigten bis zum 45. Tag und 12 % bis zur Besamung (63. Tag p.p.) keine Zyklusaktivität. In einer Studie von PETERSSON et al. (2008), in der die verzögerte Ovaraktivität mit niedrigen Progesteronwerten ≥ 45. Tag p.p. definiert ist, waren 18 % der Tiere betroffen.

Mit der ersten Ovulation nach der Kalbung beginnt die Zyklusaktivität. Nach RIECK & ZEROBIN (1985) ovulieren 50 % der Milchkuhe innerhalb der ersten 30 Tage, 80 % innerhalb von 45. Tagen und 100 % innerhalb von 120 Tagen das erste Mal nach der Abkalbung. Diese These wurde auch im Versuch durch den Progesteron-Schnelltest bestätigt. Ebenso konnte eine Übereinstimmung von 91 % zwischen den Ergebnissen der Laboranalysen zur Zyklusaktivität und den Ergebnissen des Analysegerätes beobachtet werden.

Im Versuch wurden dreimal wöchentlich Milchproben von den Versuchstieren entnommen. Dies wäre zur Zyklusüberwachung nach der Abkalbung zum einen zu kostenintensiv und zum anderen sehr aufwändig. Nichtsdestotrotz ist der Progesteron-Schnelltest zur Überwachung der Zyklusaktivität p.p. gut geeignet. Nach einer Studie von PETERSSON et al. (2008) ist die Analyse des Progesterongehaltes in der Milch einmal im Monat ein sinnvolles Hilfsmittel, die Kühe bis zum 60. Tag p.p. zu überwachen. Je öfter Milchproben auf den Progesterongehalt untersucht werden, desto höher wird die Genauigkeit, mit der die Zyklusaktivität p.p. gemessen werden kann. Ruiz (1992) hingegen gibt in einer Studie an, dass es am effektivsten war, von Kühen, die keine Brunstanzeichen nach der Abkalbung zeigten, ab der 3. Woche p.p. einmal wöchentlich eine Milchprobe zu entnehmen und auf den Progesterongehalt zu untersuchen. Dies ist zwar etwas aufwändiger, aber gerade bei Problemkühen empfehlenswert. Liegt der Progesteronwert über mehrere Messungen im niedrigen Bereich, sollte aber auch hier nicht auf eine tierärztliche Diagnose verzichtet werden.

Die Untersuchungen der Ovaraktivität nach der künstlichen Besamung sollten veranschaulichen, inwieweit die Ergebnisse des Analysegerätes mit Angaben in der Literatur zum Progesteronanstieg und Progesteronabstieg nach der KB übereinstimmen.



Nach der Besamung war das Synchronisationsprogramm beendet. Dadurch konnte bei den nicht tragenden Tieren wieder ein normaler Zyklus ablaufen. Der Anstieg der Progesteronkonzentration am 7. Tag nach der Besamung über einen Schwellenwert von 5 ng/ml weicht gering von den Angaben in der Literatur ab. OBRITZHAUSER & BEHM (2005) beschrieben, dass der Progesterongehalt am 5. bis 6. Zyklustag über 5 ng/ml ansteigt und bereits am 7. Zyklustag einen Wert von > 10 ng/ml überschritten werden sollte. Bei der einzelnen Betrachtung wird deutlich, dass 67,5 % der Tiere den Schwellenwert zwischen dem 4. und 6. Tag nach der Besamung überschreiten, was wiederum mit den Literaturangaben übereinstimmt. Des Weiteren wird der Abfall der Progesteronkonzentration innerhalb eines Zyklus von OBRITZHAUSER & BEHM (2005) unter den Schwellenwert von 5 ng/ml für den 19. Zyklustag angegeben. Im Versuch fällt die Progesteronkonzentration am 20. Tag nach der Besamung unter den Schwellenwert, wobei hier große tierindividuelle Schwankungen auftraten. Abschließend kann jedoch gesagt werden, dass die Zyklen nach der Besamung mit ausreichender Genauigkeit abgebildet wurden.

Bei der Untersuchung des Progesteronanstieges nach der künstlichen Besamung von tragenden und nicht tragenden Tieren konnte in dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dies liegt möglicherweise an dem zu geringen Stichprobenumfang der Tiere in den einzelnen Gruppen. Gerade bei diesem Punkt besteht großes Forschungspotenzial. Denn es wurde nachgewiesen, dass bei einem schnellen Progesteronanstieg nach der Besamung das Wachstum der Embryonen stärker ist als bei einem langsamen Anstieg. Nach DE KRUIF et al. (2006) besteht ein Zusammenhang zwischen dem Metabolismus von Progesteron in der Leber und der Futteraufnahme. Tiere mit hoher Milchleistung und dementsprechend hohen Futteraufnahmen haben einen erhöhten Leberstoffwechsel, wodurch Progesteron schneller abgebaut wird und zum Zeitpunkt der erwarteten Ovulation in geringerer Konzentration zur Verfügung steht. Dementsprechend könnten mit gezielten Progesteroninjektionen intramuskulär, aber auch durch das Einsetzen einer Progesteron-Spirale die embryonale Frühverluste vermindert werden.

Fasst man alle Ergebnisse der Untersuchung zusammen, konnte gezeigt werden, dass der automatisierte Progesteron-Schnelltest für den Einsatz in der Praxis geeignet ist. Die Vorteile des Analysegerätes sind, dass die Analyseschritte vollautomatisch durchgeführt werden und bis zu sieben Milchproben innerhalb von 23 Minuten inklusive Probenvorbereitung und innerhalb einer Stunde ca. 18 Milchproben auf den Progesterongehalt untersucht werden können. Die Ergebnisse stehen sofort nach der Analyse zur Verfügung und können im Stallcomputer weiter bearbeitet werden. Die Genauigkeit des Gerätes zum Feststellen oder Ausschließen einer Trächtigkeit sowie zur Brunsterkennung oder Ausschließen einer Brunst war ausreichend. Ebenso wie die Genauigkeit, mit der das Analysegerät die Zyklusaktivitäten erkannte.

Weiterer Entwicklungs- und Forschungsbedarf zur Progesteronanalyse in der Milch besteht insbesondere in der Verbesserung der Analysegenauigkeit, der automatischen Probenahme und Probenzuführung sowie bei der Datenaufbereitung und der Informationsbereitstellung für den Herdenmanager. Die frühe und Erfolg versprechende Nutzung geeigneter natürlicher Brunstzyklen birgt noch ein großes Potenzial zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit einerseits. Andererseits ermöglichen die Verlaufskurven des Progesterongehaltes in der Rohmilch dem Tierhalter Aussagen zur Zuchthygiene und zur Erkennung von Fruchtbarkeitsstörungen. Ebenso ist die schnelle Bestimmung des Progesterongehaltes im Stall interessant für Besamungstechniker und Tierärzte als zusätzliche Diagnoseinformation.

## 6 Zusammenfassung

Ein neu auf dem Markt erschienener automatisierter Progesteron-Schnelltest, welcher mit einem Enzymimmunoassay-Verfahren den Progesterongehalt in der Milch bestimmt, wurde in dieser Arbeit auf seine Eignung zur Brunsterkennung, Trächtigkeitsfrühdiagnose sowie zur Beurteilung der Zyklusaktivität post partum untersucht. Dazu wurden von 50 Milchkühen des Lehr- und Versuchsgutes Köllitsch ab dem 28. Tag post partum dreimal wöchentlich Milchproben entnommen und mit dem Analysegerät auf den Progesterongehalt untersucht. Die Tiere durchliefen ab dem 45. Tag post partum ein Synchronisationsprogramm mit einer abschließenden terminorientierten Besamung. Des Weiteren standen veterinärmedizinische Untersuchungsdaten zum Gesundheits- und Fruchtbarkeitsstatus der Tiere zur Verfügung. Referenzwerte zu den ausgegebenen Werten des Analysegerätes waren die Progesterongehalte der Milchproben, die zusätzlich zweimal wöchentlich im Labor, ebenfalls mit einem Enzymimmunoassay-Verfahren, bestimmt wurden.

Die Korrelation über das Gesamtmaterial zwischen den Progesterongehalten des automatisierten Progesteron-Schnelltests und den Progesterongehalten aus dem Labor betrug  $r = 0,742$  ( $P=0,01$ ). Der positive Zusammenhang zwischen den Methoden wurde nach Ausschluss der Progesteronwerte, die bei der Labor-Methode unter der Nachweisgrenze lagen, mit einem partiellen Korrelationskoeffizient von  $r = 0,926$  ( $P = 0,01$ ;  $n = 389$ ) deutlich enger.

Die Sensitivität und Spezifität für die Brunsterkennung, deren Referenz die Follikel-Ultraschalluntersuchung einen Tag vor der künstlichen Besamung war, belief sich für einen Schwellenwert von  $> 3$  ng/ml auf 85,4 % (Sensitivität) und 100 % (Spezifität). Insgesamt wurden 80 % der visuell beobachteten Brunsten vom Analysegerät erkannt.

Mit dem Progesteron-Schnelltest wurden insgesamt 100 % der tragenden Tiere ( $n=10$ ) und 95 % der nicht tragenden Tiere ( $n=38$ ) erkannt. Des Weiteren wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Progesterongehalten der beiden Gruppen an den Tagen 20, 22 und 25 nach der künstlichen Besamung nachgewiesen.

Von 11 Tieren, die bis zum Beginn des Synchronisationsprogramms durch die Progesteronhalte aus dem Labor sowie durch die gynäkologischen Untersuchungen als azyklisch klassifiziert wurden, konnten ebenfalls 10 Probanden (91 %) an Hand der mittels Schnelltest bestimmten Progesteronhalte in der Rohmilch als azyklisch erkannt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Genauigkeit des Progesteron-Schnelltests noch Verbesserungspotenziale aufweist, welche bereits in neueren Geräten überarbeitet wurden und in der weiteren Entwicklung Berücksichtigung finden. Sie zeigen aber auch, dass der Test in der Praxis gerade in Problemherden oder größeren Beständen ein nützliches Hilfsmittel für das Herdenmanagement sein kann. Mit dem ausgegebenen Progesteronwert der einzelnen Kuh wird ein zusätzliches Merkmal geschaffen, das einen Einblick in den Fruchtbarkeitsstatus der Herde liefern kann.

## 7 Literaturverzeichnis

- BIERSCHWAL, C.J., H.A. GARVERICK, C.E., MARTIN, R.S. YOUNGQUIST, T.C. CANTLEY & M.D. BROWN (1975): Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *Journal of Animal Science* 41: 1660-1665.
- BOLLWEIN, H. (2006): Fruchtbarkeitsstörungen bei Hochleistungsrindern – Welche Wege sind zu beschreiten? Vortrag zum sächsischen Milchrindtag, Reichenbach (Vogtland), 01.11.2006
- BOOTH, J.M. (1979): Milk progesterone testing: Application to herd management. *Journal of Dairy Science* 62: 1829-1834.
- BOSTEDT, H. (2003): Fruchtbarkeitsmanagement bei Rindern.(4.Auflage) DLG- Verlag, Frankfurt am Main.
- BULMAN, D.C. & G.E. LAMMING (1978): Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 447-458.
- COX, N.M., F.N. THOMPSON & D.H. CULVER (1978): Milk progesterone to predict reproductive status in a commercial dairy herd. *Journal of Dairy Science* 61: 1616-1621.
- DARWASH, A. O., G. E. LAMMING & J. A. WOOLLIAMS (1997): Estimation of genetic variation in the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80: 1227-1234.
- DE KRUIF, A., R. MANSFELD & M. HOEDEMAEKER (2006): Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. Parey Buchverlag, BERLIN.
- FARRIS, E.J. (1954): Activity of dairy cows during the estrus. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 125: 117.
- FOURICHON, C., H. SEEGER & X. MAHLER (2000): Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis (Abstract). *Theriogenology* 53: 1729-1759.
- FRIGGENS, N.C., M. BJERRING, C. RIDDER, S. HØJSGAARD & T. LARSEN (2008): Improved detection of reproductive status in dairy cows using milk progesterone measurements (Abstract). *Reproduction in Domestic Animals* 43:113-121.
- GARBARINO, E.J., J.A. HERNANDEZ, J.K. SHEARER, C.A. RISCO and W.W. THATCHER (2004): Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 87: 4123-4131.
- GINTHER, O.J., L.C. NUTI, M.C. GARCIA, B.C. WENTWORTH & W.J. TYLER (1976): Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products. *Journal of Animal Science* 42: 155-159.
- GOCKEL, J. (2008a): Laboranweisung für die Bestimmung des Progesterongehaltenes. Köllitsch: Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Persönliche Mitteilung, 05.05.2008.

- GOCKEL, J. (2008b): Farbdopplersonographische Untersuchung der Durchblutung der präovulatorischen Follikel und Corpora lutea in Abhängigkeit vom Wiedereinsetzen des Zyklus nach der Geburt beim Rind. Vortrag im Rahmen des Montagsseminars im Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie am 05.05.2008 in Köllitsch.
- GOCKEL, J. (2009): Farbdopplersonographische Untersuchung der Durchblutung der präovulatorischen Follikel und Corpora lutea in Abhängigkeit vom Wiedereinsetzen des Zyklus nach der Geburt beim Rind. Hannover: Tierärztliche Hochschule, Dissertation 2009.
- GOTTSCHALK, J. (2007): Umrechnung der Progesterongehalte von Magermilch auf Vollmilch Leipzig: Veterinärmedizinische Universität, persönliche Mitteilung, 19.03.2007.
- GRUNERT, E. (1999a): Sexualzyklus. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Buchverlag, Berlin, S: 3-12.
- GRUNERT, E. (1999b): Ovarielle Dysfunktion. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Buchverlag, Berlin, S: 111-146.
- GRUNERT, E. (1999c): Zyklus und Brunststörungen. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Buchverlag, Berlin, S: 147-157.
- GRUNERT, E. (1999d): Brunsterkennung. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Buchverlag, Berlin, S: 68-77.
- HEERSCHKE, J.R. & R.L. NEBEL (1994): Measuring efficiency and accuracy of detection of estrus. *Journal of Dairy Science* 77: 2754-2761.
- HOFFMANN, B. (1999): Regulation der Sexualfunktion. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Buchverlag, Berlin, S: 13-28.
- HOLTZ, W. & M.H. MEINHARDT (1993): Die Brunstdiagnose beim Rind. *Reproduction in Domestic Animals* 28: 315-341.
- HUSSAIN SHA NASIR, S., W. KOOPS, H.A. SAMAD & D.F. VAN DE WIEL (1988): A simple enzymimmunoassay of milk progesterone for monitoring fertility in dairy buffaloes *Theriogenology* 30(2): 211-5.
- KELTON, D.F., K.E. LESLIE, W.G. ETHERINGTON, B.N. BONNETT & J.S. WALTON, (1991): Accuracy of rectal palpation and of a rapid milk progesterone enzymimmunoassay for determining the presence of a functional corpus luteum in subestrus dairy cows. *Canadian Veterinary Journal* 32: 286-291.
- KESLER, D.J. & H.A. GARVERICK (1982): Ovarian cysts in dairy cattle: A review. *Journal of Animal Science* 55: 1147-1159.
- KIDDY, C.A. (1977): Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows *Journal of Dairy Science* 60: 235-243.
- LAING, J.A. & R.B. HEAP (1971): The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle (Abstract). *British Veterinary Journal* 127: 19-22.
- LAMMING G.E. & A.O. DARWASH (1998): The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows (Abstract). *Animal Reproduction Science* 52(3):175-90.
- LOTTHAMMER K.H. & G. WITTKOWSKI (1994): Fruchtbarkeit und Gesundheit der Rinder. Ulmer-Verlag, Stuttgart.
- LOTTHAMMER, K.H. (1999): Umweltbedingte Fruchtbarkeitsstörungen. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Buchverlag, Berlin, S: 307-336.
- LUCY, M.C. (2001): Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science* 84: 1277-1293
- MANSFELD, R., A. DE KRUIF, M. HOEDEMARKER & W. HEUWIESER (1999): Fruchtbarkeitsüberwachung auf Herdenbasis. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Buchverlag, Berlin, S: 337-350.
- MEYR, M. (2009): Prinzip Progesterontest eProCheck. Persönliche Mitteilung, 23.02.2009.
- MOORE, A.S. & S.L. SPAHR (1991): Activity monitoring and an enzyme immunoassay for milk progesterone to aid in the detection of estrus. *Journal of Dairy Science* 74: 3857-3862.
- MIALOT, J.P., LAUMONNIER G., PONSART C., FAUXPOINT H., BARASSIN E., PONTER A.A. & DELETANG F. (1999): Postpartum subestrus in dairy cows: Comparison of treatment with prostaglandinF2 $\alpha$  or GnRH+prostaglandinF2 $\alpha$ +GnRH. *Theriogenology* 52: 901-911.
- NEBEL, R.L., W.D. WHITTIER, B.G. CASSELL & J.H. BRITT (1987): Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assay for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *Journal of Dairy Science* 70: 1471-1476.
- NEBEL, R.L. (1988): On-farm milk progesterone tests. *Journal of Dairy Science* 71: 1682-1690.
- NEBEL, R.L. & M.L. MCGILLIARD (1993): Interaction of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76: 3257-3268.
- NUTI, L.C., B.C. WENTWORTH, H.J. KARAVOLAS, W.J. TYLER & O.J. GINTHER (1975): Comparison of radioimmunoassay and gas-liquid chromatography analyses of progesterone concentration in cow's milk (Abstract). *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 149(4): 877-880.

- OBRITZHAUSER, W. & D. BEHM (2005): Programm zur Bekämpfung von Gesundheits- und Fruchtbarkeitsstörungen in der österreichischen Rinderhaltung zur Verbesserung des Leistungszustandes der Rinderbestände. Amtliche Veterinärnachrichten Nr.5a/05.
- PENNINGTON, J.A., S.L. SPAHR & J.R. LODGE (1975): Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk. *Journal of Dairy Science* 59: 1528-1531.
- PENNINGTON, J.A., S.L. SPAHR & J.R. LODGE (1981): Influences on progesterone concentration in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 64: 259-266.
- PENNINGTON, J.A., L.H. SCHULTZ & W.F. HOFFMAN (1985): Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: Field study in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 68: 2740-2745
- PETERS, A.R., L. MAWHINNEY, S.B. DREWS, S.J. WARD, M.J. WAREN & P.J. GORDON (1999): Development of a gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin regime for planned breeding of dairy cows. *The Veterinary Record* 145: 2403-2406.
- PETERSSON, K.-J., E. STRANDBERGER, H. GUSTAFSSON, M.D. ROYAL & B. BERGLUND (2008): Detection of delayed cyclicity in dairy cows based on progesterone content in monthly milk samples. *Preventive Veterinary Medicine* 86: 153-163.
- RAJAMAHENDRAN, R., B. BURTON & J. SHELFORD (1993): A field study on the usefulness of milk progesterone determination to confirm estrus and pregnancy of dairy cows in the Fraser Valley area of British Columbia. *Canadian Veterinary Journal* 34: 349-352.
- RIECK, G.W. & K. ZEROBIN (1985): Biologische und betriebswirtschaftliche Voraussetzungen einer ungestörten Fertilität; Genetik der Fruchtbarkeit. *Zuchthygiene Rind, Pareys Studentexte*, Berlin u. Hamburg. 18-52 u. 105-112.
- RIoux, P. & D. RAJOTTE (2004): Progesterone in milk: a simple experiment illustrating the Estrous cycle an enzyme immunoassay. *Advances in Physiology Education* 28: 64-67.
- ROSSOW, N. (2006): Eignung des Milchprogesterontests in der Milch für die Fruchtbarkeitsüberwachung in Milchkuhbeständen. [www.portal-rind.de](http://www.portal-rind.de)
- RUIZ, F.J., P.A. OLTENACU & R.D. SMITH (1989): Evaluation of on-farm milk progesterone tests for determine nonpregnant cows and to prevent insemination errors. *Journal of Dairy Science* 72: 2718-2727.
- RUIZ, F.J., P.A. OLTENACU & R.D. SMITH (1992): Cost-benefit evaluation of on-farm milk progesterone testing to monitor return to cyclicity and to classify ovarian cysts. *Journal of Dairy Science* 75: 1036-1043.
- RUTTER, L.M. & R.D. RANDEL (1984): Postpartum nutrient intake and body condition: Effect on pituitary function and onset of estrus in beef cattle. *Journal of Animal Science* 58: 265-274.
- SCHIAVO, J.J., R.L. MATUSZCZAK, E.B. OLTENACU & R.H. FOOTE (1974): Milk progesterone in postpartum and pregnant cows as a monitor of reproductive status. *Journal of Dairy Science* 58: 1713-1716.
- SCHNURRBUSCH, U. & B. VOGLER (2005): *Gynäkologie für Veterinärmediziner (Teil 1) (3. Auflage)*. Verlag Wissenschaftlicher Schriften, Zwickau.
- SCHOPPER, D., R. SCHEMER, U. WEILER & R. CLAUS (1993): Einfluss der Milchleistung auf Fruchtbarkeitskriterien der Milchkuh post partum: Auswertung von Progesteronprofilen (Abstract). *Reproduction in Domestic Animals* 28: 225-235.
- SENGER, P.L. (1994): The estrus detection problem: new conception, technology and possibilities. *Journal of Dairy Science* 77: 2745-2753.
- SMIDT, D. (1970): Meteorologische Einflüsse auf die Fortpflanzung bei Haustieren. *Tierzüchter*, 22: 188-190.
- SORBIJAJ, A., K. SYREK-INTAS, B. WOLLGARTEN & B. TADAY (1995): Die Anwendungseignung aktueller Milchprogesteron-Schnelltests für Rinder im Vergleich zu einer Laborgebundenen Routinemethode. *Tierärztliche Praxis* 23(1): 32-6.
- STABELS, C.R., W.W. THATCHER & J.H. CLARK (1990): Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum, period of high producing dairy cows *Journal of Dairy Science* 73: 938-947.
- VAN DER WEIJDEN, G.C. & M. TRAVERNE (1999): Trächtigkeitsuntersuchung. In: E. Grunert, Ad. Kruif (Hrsg.), *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. Parey Buchverlag, Berlin, S: 78-92.
- WALKER, W.L., R.L. NEBEL, M.L. MCGILLIARD (1996): Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 79: 1555-1561.
- WEHREND, A. & S. GRÖGER (2006): Einflussfaktoren auf die Follikelfunktion und den Ovulationszeitpunkt. ATF-Kurs: *Subklinische Fruchtbarkeitsstörungen beim Rind*, 29. September 2006 in Leipzig.
- WINDIG, J.J., B. BEERDA & R.F. VEERKAMP (2007): Relationship between milk progesterone profiles and genetic merit for milk production, milking frequency, and feeding regimen in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 91:2874-2884.
- XU, Z.Z., D.J. MCKNIGHT, R. VISHWANATH, C.J. PITT & L.J. BURTON (1998): Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science* 81: 2890-2896.

- ZELFEL, S. (2008): Sind hohe Milchleistungen mit guten Reproduktionsergebnissen bei Schwarzbunten Holsteins vereinbar?  
[www.portal-rind.de](http://www.portal-rind.de)
- ZEMJANIS, R. (1970): Diagnostic and therapeutic techniques in animal reproduction (2<sup>nd</sup> edition) Williams and Wilkins, Baltimore.

**Herausgeber:**

Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie  
Pillnitzer Platz 3, 01326 Dresden  
Telefon: + 49 351 2612-0  
Telefax: + 49 351 2612-1099  
E-Mail: [lfulg@smul.sachsen.de](mailto:lfulg@smul.sachsen.de)  
[www.smul.sachsen.de/lfulg](http://www.smul.sachsen.de/lfulg)

**Autoren:**

Dr. Steffen Pache, Sigrun Birndt  
Abteilung Tierische Erzeugung/Referat Tierhaltung, Fütterung  
Am Park 3, 04886 Köllitsch  
Telefon: + 49 34222 46-2209  
Telefax: + 49 34222 46-2299  
E-Mail: [steffen.pache@smul.sachsen.de](mailto:steffen.pache@smul.sachsen.de)  
Nicole Reinhardt  
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Karl-Freiherr-von-Fritsch-Str. 4, 06120 Halle  
Jenny Gockel  
Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.  
Bernauer Allee 10, 16321 Schönow

**Redaktion:**

siehe Autoren

**Redaktionsschluss:**

29.04.2011

**ISSN:**

1867-2868

**Hinweis:**

Die Broschüre steht nicht als Printmedium zur Verfügung, kann aber als PDF-Datei unter <http://www.smul.sachsen.de/lfulg/6447.htm> heruntergeladen werden.

**Verteilerhinweis**

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen ihrer verfassungsmäßigen Verpflichtung zur Information der Öffentlichkeit herausgegeben. Sie darf weder von Parteien noch von deren Kandidaten oder Helfern im Zeitraum von sechs Monaten vor einer Wahl zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen.

Missbräuchlich ist insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken oder Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist auch die Weitergabe an Dritte zur Verwendung bei der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die vorliegende Druckschrift nicht so verwendet werden, dass dies als Parteinahme des Herausgebers zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte.

Diese Beschränkungen gelten unabhängig vom Vertriebsweg, also unabhängig davon, auf welchem Wege und in welcher Anzahl diese Informationsschrift dem Empfänger zugegangen ist. Erlaubt ist jedoch den Parteien, diese Informationsschrift zur Unterrichtung ihrer Mitglieder zu verwenden.