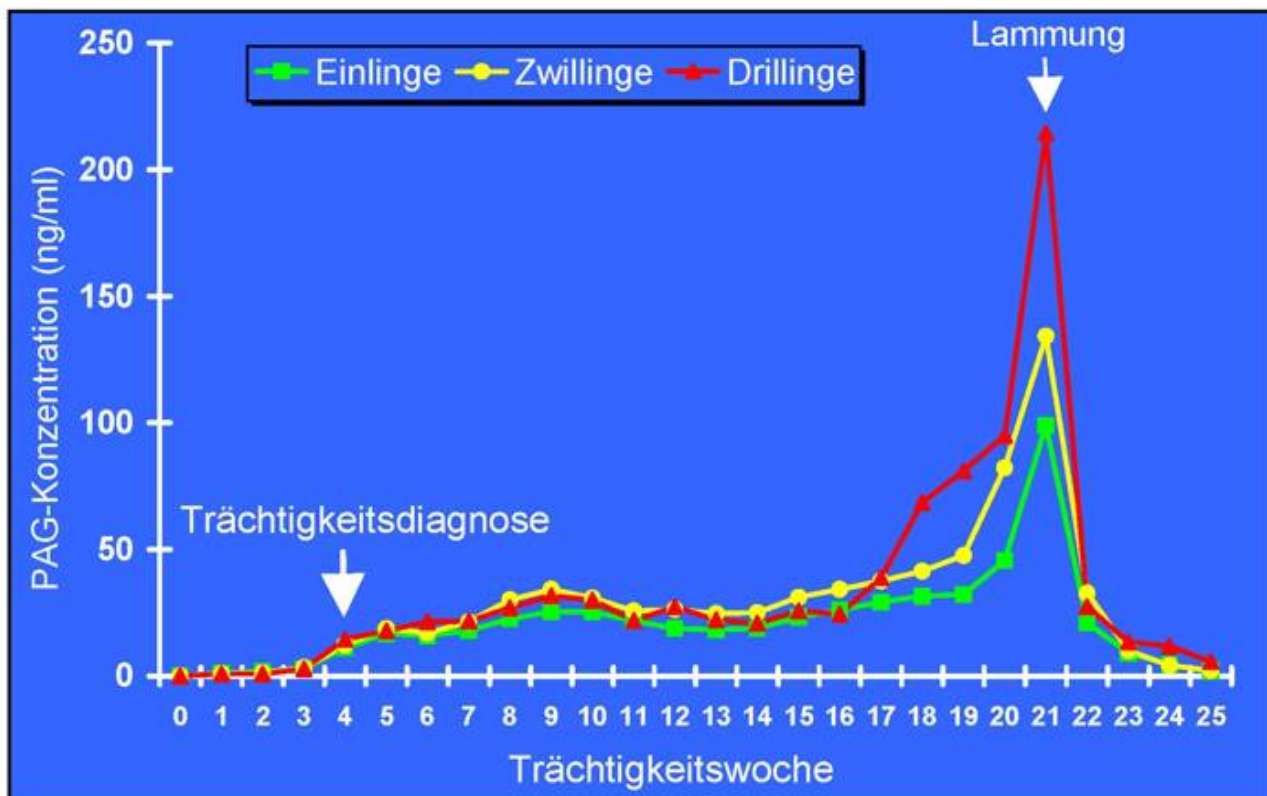


Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) im Blut vom Schaf und Östrogen-Konzentration im Kot der Ziege als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsdiagnose



Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
der Georg-August-Universität Göttingen

**Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) im Blut vom Schaf
und Östrogen-Konzentration im Kot der Ziege
als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsdiagnose**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Rogelio A. Ledezma Torres

Tierarzt M. Sc., geboren in Monclova, Mexiko

Göttingen, im November 2002

Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung des Programms für die Fortbildung der Lehrkräfte (PROMEP) vom mexikanischen Ministerium für öffentliche Erziehung (SEP), der Bundesabteilung für Wissenschaft und Technik (CONACYT) und der Autonomen Universität von Nuevo León durchgeführt. Stipendium UANL-33.

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2002
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2002
ISBN 3-89873-589-3

D7

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Holtz
Korreferent: Prof. Dr. Bertram Brenig
Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2002

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2002
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-589-3

Meiner Frau

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Trächtigkeitsdiagnose bei kleinen Wiederkäuern	2
2.2. Trächtigkeitsdiagnoseverfahren	3
2.2.1. Späte Trächtigkeitsdiagnose	3
2.2.2. Diagnose in der Trächtigkeitsmitte	3
2.2.3. Frühe Trächtigkeitsdiagnose	4
2.3. Hormone und Proteine der Plazenta zur Trächtigkeitsfeststellung bei Wiederkäuern	5
2.3.1. Gestagene	5
2.3.2. Östrogene	6
2.3.3. Placentales Lactogen (PL) bzw. Chorion Somatomammotropin (CS)	7
2.3.4. Early pregnancy factor (EPF) bzw. early conception factor (ECF)	7
2.3.5. Pregnancy-specific protein B (PSPB)	8
2.3.6. Pregnancy-associated Glycoprotein (PAG)	8
2.4. Pregnancy-associated Glycoprotein (PAG) bei Wiederkäuern	
2.4.1. Ursprung der PAGs	10
2.4.2. Struktur der PAGs	10
2.4.3. Funktion von PAG	13
2.4.4. PAG bei Wiederkäuern im Verlauf der Trächtigkeit und post partum	14
2.4.5. Trächtigkeitsdiagnose anhand der Bestimmung der PAG-Konzentration bei Wiederkäuern	19
2.5. Immunassays	20
2.5.1. Definition des Enzymimmunoassay	20
2.5.2. Der kompetitive Enzymimmunoassay	20
2.5.2.1. Prinzip des „kompetitive Doppelantikörpertechnik“-Tests	21
2.6. Biosynthese und intermediärer Stoffwechsel der Östrogene	23
2.6.1. Biosynthese der Östrogene im Eierstock	24
2.6.2. Biosynthese der Östrogene in der Plazenta	25
2.6.3. Funktion der Östrogene	28
2.7. Wege der Hormon-Exkretion	28
2.8. Nutzung und Lagerung der Kotproben	29

2.9.	Östrogenkonzentration während der Trächtigkeit bei Wiederkäuern	30
2.9.1.	Östrogenkonzentration im Blut während der Trächtigkeit bei Wiederkäuern	31
2.9.2.	Östrogenkonzentration im Harn während der Trächtigkeit bei Wiederkäuern	35
2.9.3.	Östrogenkonzentration im Kot während der Trächtigkeit von Wiederkäuern	36

3. Die Plasmakonzentration des pregnancy-associated Glycoprotein (PAG) im Verlauf der Trächtigkeit beim Schaf

3.1.	Material und Methoden	37
3.1.1.	Versuchstiere und ihre Haltung	37
3.1.2.	Blutprobenentnahmen	38
3.1.3.	Testprinzip des Radioimmunoassays (RIA) zur Bestimmung der PAG-Konzentration im Blutplasma	39
3.1.3.1.	Festphasen-RIA	39
3.1.4.	Erstellung der Eichkurve	41
3.1.5.	Herstellung der Kontrollen	41
3.1.6.	Reagenzien für den radioimmunologischen Nachweis	41
3.1.7.	Radioimmunologischer Nachweis	42
3.1.8.	Statistische Auswertung	42
3.2.	Ergebnisse	44
3.2.1.	Qualitätskriterien für das Referenzverfahren	44
3.2.2.	PAG-Konzentration im Blut der Kontrolltiere	44
3.2.3.	Verlauf der PAG-Konzentration im Blut während der Trächtigkeit und 4 Wochen nach der Geburt	44
3.2.4.	Abhängigkeit der PAG-Konzentration von der Wurfgröße	48
3.2.5.	Abhängigkeit der PAG-Konzentration von Geschlecht und Geburtsgewicht der Lämmer	54
3.2.6.	Abhängigkeit der PAG-Konzentration von der Rassezugehörigkeit der Mutterschafe	55
3.2.7.	Abhängigkeit der PAG-Konzentration von der Wurfnummer	55
3.3.	Diskussion	57

4. Bestimmung von Gesamtöstrogenen in Blut, Harn und Kot von Ziegen als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsfeststellung

4.1. Material und Methoden	61
4.1.1. Versuchstiere und ihre Haltung	61
4.1.2. Kotentnahme	61
4.1.3. Harngewinnung	62
4.1.4. Blutentnahme	62
4.1.5. Gesamtöstrogenbestimmung: Enzymimmunoassay (EIA)	62
4.1.5.1. Prinzip der „kompetitiven Doppelantikörpertechnik“	62
4.1.6. Geräte und Chemikalien	64
4.1.6.1. Chemikalien und Lösungen	64
4.1.7. Testvorbereitung	68
4.1.7.1. Beschichtung der Mikrotiterplatten mit IgG	68
4.1.7.2. Zweite Beschichtung mit bovinem Serumalbumin (BSA)	68
4.1.7.3. Lagerung der Mikrotiterplatte	68
4.1.7.4. Qualitätssicherung	68
4.1.8. Durchführung des Tests	69
4.1.8.1. Herstellung der Standardkurve	69
4.1.8.2. Herstellung der Kontrollen	70
4.1.9. Versuchsdurchführung	71
4.1.9.1. Aufbereitung der Proben	71
4.1.9.2. Immunreaktion	75
4.1.10. Auswertung der Messwerte	79
4.1.11. Bestimmung des Feuchtigkeitsverlustes der Kotproben während der Lagerung	80
4.1.12. Statistische Auswertung	81
4.2. Ergebnisse	82
4.2.1. Etablierung eines Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Gesamtöstrogenen im Kot, Harn und Serum von Ziegen	82
4.2.2. Gesamtöstrogenkonzentrationen in Kot, Harn und Serum	83
4.2.3. Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot	86

4.2.4.	Einflüsse auf die Gesamtöstrogenkonzentration im Kot von trächtigen Burenziegen	91
4.3.	Diskussion	93
5.	Zusammenfassung	98
6.	Summary	102
7.	Literaturverzeichnis	106
8.	Anhang	123
8.1.	PAG von nicht trächtigen Kontrolltieren	123
8.2.	Gesamtöstrogenbestimmung im Kot	124

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
α	alpha
β	beta
b	bovin
B/Bo	prozentuale Tracerbindung im Verhältnis zum Nullstandard
BSA	Bovines Serumalbumin
BST	Bovines Somatotropin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C.l.	Corpora lutea
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
CV	Variationskoeffizient
d	Tag
Da	Dalton
d.h.	das heisst
E ₁	Östron
E ₂	Östradiol-17 β
eCG	equines Choriongonadotropin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GH	Growth Hormone, Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin Releasinghormon
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheiten
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös

Abkürzungen

kg	Kilogramm
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
Max.	Maximum
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
Min.	Minimum
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
ng	Nanogramm
ov	ovin
p	porcin
P ₄	Progesteron
pg	Picogramm
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
vs	versus
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
\bar{x}	Mittelwert
x g	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die Ziegen- und Schafhaltung in der Welt gewinnt durch die Extensivierung in der Landwirtschaft an Bedeutung, weil mit kleinen Wiederkäuern, insbesondere Ziegen, auf marginalen Böden und unter extremen Klimabedingungen noch Erträge erwirtschaftet werden können. In vielen, besonders den ärmeren Ländern der Erde, spielt der kleine Wiederkäuer als landwirtschaftliches Nutztier eine bedeutende Rolle bei der Erzeugung von Fleisch, Milch, Häuten und Fasern.

Für eine rentable Produktion von Ziegen- und Schaffleisch ist im Rahmen einer guten zuchthygienischen Betreuung einer Herde die frühe und sichere Trächtigkeitsdiagnose besonders wichtig. Es gibt verschiedene Methoden eine Trächtigkeitsdiagnose bei kleinen Wiederkäuern durchzuführen. Besonders praktikabel sind viele davon nicht, weil sie entweder sehr spät durchzuführen, invasiv oder teuer sind. Nach Möglichkeit soll nicht nur eine Trächtigkeit diagnostiziert, sondern auch Informationen über Vitalität und eventuell Anzahl der Feten erlangt werden, bei geringstmöglicher Beeinträchtigung der Tiere. Deshalb beschäftigt sich Teil 1 dieser Arbeit mit der Untersuchung der Plasmakonzentration des „pregnancy-associated“ Glycoproteins (PAG) im Verlauf der Trächtigkeit beim Schaf mit dem Ziel a) die Plasmakonzentration des PAGs bei verschiedenen Schafrassen während der Trächtigkeit und nach der Geburt darzustellen und b) diese zur Trächtigkeitsdiagnose zu nutzen. Teil 2 dieser Arbeit beinhaltet die Bestimmung von Gesamtöstrogenen in Blut, Harn und Kot von tragenden Ziegen. Besondere Berücksichtigung findet die Eignung der Kot-Östrogenkonzentration als Möglichkeit einer Trächtigkeitsdiagnose bei Ziegen und, in diesem Zusammenhang, die Möglichkeit der Lagerung der Kotproben bis zur Analyse.

2. Literaturübersicht

2.1. Trächtigkeitsdiagnose bei kleinen Wiederkäuern

Die frühe und sichere Diagnose einer Trächtigkeit spielt in der Tierzucht eine bedeutende Rolle, da nur so sowohl eine bedarfsgerechte Haltung und Fütterung der trächtigen Tiere gewährleistet werden kann als auch ein wirtschaftliches Arbeiten möglich ist. Dies beinhaltet ein schnelles Wiederbelegen nicht trächtiger Tiere, das frühzeitige Erkennen von Fruchtbarkeitsstörungen von Einzeltieren oder einer eventuellen Herdenproblematik und gegebenenfalls das Merzen der Tiere.

Während der Trächtigkeit weist das Muttertier typische Veränderungen auf, die durch eine klinische Untersuchung, mit technischen Hilfsmitteln, wie z.B. Ultraschallverfahren, oder über verschiedene Labormethoden nachgewiesen werden können. Generell wird zwischen indirekten Trächtigkeitsschleissweisen, wie z.B. Ausbleiben der Brunst, Echolot oder hohem Progesterongehalt im Blut oder in der Milch, und direkten Nachweisen des Fetus oder der Fruchthüllen unterschieden. In der Plazenta werden während der Trächtigkeit bestimmte Proteine und Hormone speziell oder in besonderen Mengen exprimiert und synthetisiert, die in den Blutkreislauf des Muttertieres gelangen und teils über Milch, Harn oder Kot ausgeschieden werden. Hierzu zählen unter anderem Östrogene und sog. „pregnancy-associated“ Glycoproteine (PAGs), die sich besonders für eine Trächtigkeitsschleissdiagnose eignen, da sie über eine funktionelle Plazenta zusätzlich einen direkten Hinweis auf das Leben der Feten geben. In Kapitel 2.2 werden verschiedene Diagnoseverfahren in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt während der 151 ± 5 Tage (Bostedt und Dedié, 1996) dauernden Trächtigkeit (späte, mittlere und frühe Trächtigkeitsschleissdiagnosen) aufgezeigt, im Kapitel 2.3 verschiedene Hormone und Proteine der Plazenta, die sich zur Trächtigkeitsschleissdiagnose eignen, beschrieben.

2.2. Trächtigkeitsdiagnoseverfahren

2.2.1. Späte Trächtigkeitsdiagnose

Als späte Diagnoseverfahren werden solche bezeichnet, die ab dem 60. Tag nach der Bedeckung bei Schaf und Ziege zum Einsatz kommen. Die abdominale Palpation kann etwa ab dem 100. Trächtigkeitstag Aufschluss geben (Küst und Schaetz, 1983). Die bi-manuelle (rektal und abdominal) Palpationstechnik bei kleinen Wiederkäuern wurde von Kutty (1999) entwickelt. Die Diagnosegenauigkeit dieser Technik beträgt ab dem 28. Tag der Trächtigkeit 56%, ab dem 90. Tag 100%. Aborte traten dabei nicht auf. Bei der Rektal-Abdominalen Palpation wird ab dem 60. Trächtigkeitstag eine 90%ige (Memon und Ott, 1980) und vom 65. bis 70. Tag der Trächtigkeit eine 92 bis 100%ige Diagnosegenauigkeit erreicht (Hulet, 1972; Turner und Hindson, 1975; Tyrrell und Plant, 1979; Plant, 1980; Ott et al., 1981). Nachteilig hierbei sind jedoch mögliche Verletzungen des Darms, Absterben von Feten und/oder Aborte ausgelöst durch die Untersuchung (Turner und Hindson, 1975; Ott et al., 1981; Trapp und Slyter, 1983). Hingegen wurde bei Plant (1980) kein Beweis für eine erhöhte fetale Sterblichkeit oder Aborte bedingt durch die Anwendung dieses Verfahrens festgestellt.

Die Euterentwicklung bei der Ziege kann ab dem zweiten Trächtigkeitsmonat auf eine bestehende Trächtigkeit hindeuten, jedoch kommt es häufig vor, dass die Entwicklung des Euters erst im letzten Monat stattfindet (Watt et al., 1984). Bei der Röntgenuntersuchung kann eine Trächtigkeit mit einer Genauigkeit von 100% ab dem 70. Tag nach der Bedeckung festgestellt werden (Memon und Ott, 1980; Wilson, 1981; Saleh et al., 1988) und ab Tag 90 kann mit Sicherheit die Fetenzahl vorausgesagt werden (Memon und Ott, 1980). Die Verwendung von Echolot-Geräten trifft eine zuverlässige Diagnose beim Schaf ab dem 60. und bei der Ziege ab dem 110. Tag (Holtz, 1982). Durch den Nachweis von speziellen Proteinen, wie z.B. „placental lactogen“ (PL), wird ab der zweiten Hälfte der Trächtigkeit eine Diagnosegenauigkeit von 100% erreicht (Robertson et al., 1980).

2.2.2. Diagnose in der Trächtigkeitsmitte

Zu den Trächtigkeitsdiagnoseverfahren, die zwischen dem 35. und dem 60. Tag der Trächtigkeit angewendet werden können, zählt die Entnahme einer Zervikalschleimprobe. Damit wurde ab dem 42. Trächtigkeitstag ein 99%iger Trächtigkeitssachweis erbracht

(Bostedt et al., 1972). Vierzig Tage nach der Bedeckung lässt sich ein 97%iger Nachweis durch Untersuchung der Veränderungen am Vaginalepithel (Vaginalbiopsie) erzielen (Ghannam et al., 1972; Memon und Ott, 1980). Mittels Messung des Östronsulfats im Blut ab dem 49. Tag nach der Bedeckung, in der Milch ab Tag 35 der Trächtigkeit und Gesamtöstrogenkonzentration im Kot ab dem 56. Tag der Trächtigkeit ließ sich eine Trächtigkeit mit einer Genauigkeit von 100%, 88% bzw. 96.0% nachweisen (Tamanini et al., 1986; Murray und Newstead, 1988; Sindermann et al., 1992; Janowski et al., 1999).

2.2.3. Frühe Trächtigkeitsdiagnose

Hier finden sich alle Trächtigkeitsdiagnoseverfahren, die kurz nach der Bedeckung (weniger als 35 Tage) bei Schaf und Ziege anwendbar sind. Die Laparotomie zur digitalen Palpation der Gebärmutter wurde bei Memon und Ott (1980) ab dem 28. Trächtigkeitstag mit 97%iger Sicherheit durchgeführt. Die Ultrasonographie (Echtzeit-Ultraschallgerät, B-Mode), als nicht-invasive Trächtigkeitsdiagnosemethode (transrektal und transabdominal), kann zwischen lebenden und toten Feten und zwischen Einlingen und Mehrlingen unterscheiden. Sie wurde beim Schaf nach dem 21. Tag der Trächtigkeit (Kahn et al., 1990; Kahn et al., 1993; Kaulfuss et al., 1996a; Kaulfuss et al., 1996b; Zipper et al., 1997) und bei der Ziege, mittels der transrektalen Methode, am Tag 20 zur Erkennung von Fruchtwasser und am Tag 23 für den Nachweis des fetalen Herzschlages eingesetzt (Martinez et al., 1998). Die fetale Geschlechtsbestimmung war bei Schafen ab dem 60. Tag mit einer Sicherheit von 89% möglich (Coubrough und Castell, 1998). Transabdominal ließ sich Fruchtwasser am Tag 25 und fetaler Herzschlag am Tag 29 feststellen. Eine sichere Trächtigkeitsdiagnose ist mit Hilfe einer transrektalen Sonde ab Anfang der 4. Trächtigungswoche, bei transabdominaler Messung eine Woche später möglich (Kahn et al., 1990; Padilla und Holtz, 1999). Die Bestimmung der Progesteronkonzentration im Blut wurde mit 90%iger Sicherheit nach dem 20. Trächtigkeitstag (Memon und Ott, 1980; Agwu und Holtz, 1986) und in der Milch mit 88%iger Erfolgsrate (Pennington et al., 1982; Dionysius, 1991; Engeland et al., 1997) benutzt. Dies wurde durch Untersuchungen an Schafen durch ähnliche Ergebnisse bestätigt (Shemesh et al., 1979; Dickie und Holzmann, 1992). In der Gegenwart gibt es verschiedene Trächtigkeitsdiagnoseverfahren, die unterschiedliche Hormone oder Proteine verwenden. Einige Proteine, wie das Pregnancy-Specific Protein B (PSPB) wurden beim Schaf und bei der Ziege im Blutplasma ab dem 24. Tag der Trächtigkeit nachgewiesen (Willard et al., 1987; Humblot et al., 1990). Die PSPB-Konzentration konnte beim Schaf bis 30 Tage und bei der

Ziege bis 50 Tage nach der Geburt noch gemessen werden (Humblot et al., 1990). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die „pregnancy-associated“ Glycoproteine (PAGs) als nützlicher Trächtigkeitsindikator eingesetzt werden können. Durch Untersuchung von PAG in der Ziegenmilch konnten Trächtigkeiten ab dem 32. Tag nach der Bedeckung festgestellt werden (González et al., 2001). Im Blut erzielten Sousa et al. (1999) schon ab Tag 24, González et al. (1999) ab dem 21. und Benítez-Ortiz (1992) beim Schaf ab dem 25. Tag Erfolge. Karen et al. (2002) stellten beim Schaf (Awassi x Merino) am Tag 22 mit einer Genauigkeit von 100 % die Trächtigkeit fest.

2.3. Hormone und Proteine der Plazenta zur Trächtigkeitsfeststellung bei Wiederkäuern

2.3.1. Gestagene

Gestagene sind Steroidhormone mit 21 Kohlenstoffatomen, die in ihrer Chemie dem Cholesterin nahestehen und im Eierstock (Gelbkörper und Follikel) und in der Plazenta gebildet werden (Band et al., 1987). Das Progesteron wird als hauptsächliches Hormon bei Wiederkäuern während der Gelbkörperphase der Brunst gebildet (Sangha et al., 2002). Dieses Hormon wird bei der Ziege hauptsächlich im Gelbkörper gebildet (Challis und Linzell, 1971). Die Gestagene leiten ihre Bezeichnung von ihrer Bedeutung für die Erhaltung der Trächtigkeit ab. Sie werden als Progesteron im Blutplasma, in der Milch und im Harn und als Progesteronmetaboliten (Pregnandion und hydroxyliertes Pregnan) im Kot bestimmt (Schwarzenberger et al., 1993; Schwarzenberger et al., 1996b; Palme et al., 1997). Bei Wiederkäuern werden die Progesteronmetaboliten über den Kot, als wichtigsten Ausscheidungsweg, und über den Harn ausgeschieden (Velle, 1963; Adams et al., 1994; Palme et al., 1996).

Progesteron wird im Blutplasma und in der Milch bestimmt und als Trächtigkeitsdiagnose bei der Ziege (Memon und Ott, 1980), beim Schaf (Robertson und Sarda, 1971; Shemesh et al., 1979; Memon und Ott, 1980), beim Rind (Robertson und Sarda, 1971; Humblot et al., 1988a; Humblot, 2002), beim Hirsch (Willard et al., 1996, 1998) und anderen Zootieren (White et al., 1995) benutzt. Im Harn und im Kot wurden die Progesteronmetaboliten (Schwarzenberger et al., 1996b) zur Überwachung der Funktion des Gelbkörpers während des Zyklus, bei Abortrisiko, Eintritt der Pubertät, Saisonalität und zur Trächtigkeitsdiagnose bei Ziege, Schaf, Rind und wiederkäuenden Zootieren verwendet (Borjesson et al., 1996; Desaulniers et al.,

1989; Bamberg und Schwarzenberger, 1990; Kirkpatrick et al., 1993; Larter et al., 1993; Larter et al., 1994; Matsuda-Motomura et al., 1995; Schwarzenberger et al., 1996a; Möstl et al., 1993; Shideler et al., 1993a; Brown et al., 1995; Schwarzenberger et al., 1996a, 1996b; Heistermann et al., 1998; Morrow und Monfort, 1998; Patzl et al., 1998; Schwarzenberger et al., 1998). Jedoch zeigen die Gestagene lediglich das Vorhandensein funktioneller Gelbkörper an. Das Vorhandensein von Progesteron wird bei Gelbkörpern während des Zyklus, während der Trächtigkeit, aber auch bei persistierenden Gelbkörpern oder bei Gelbkörperzysten nachgewiesen.

2.3.2. Östrogene

Die Östrogene besitzen 18 Kohlenstoffatome und sind wie die Gestagene (C-21) und Androgene (C-19) Steroidhormone, die in ihrer Struktur dem Cholesterin nahestehen und im Eierstock (Follikel), den Hoden in geringen Mengen, der Nebennierenrinde und in der Plazenta gebildet werden (s. 2.6). Es kommen im wesentlichen drei Östrogene mit unterschiedlicher biologischer Aktivität vor: Östron, Östradiol und Östriol (Velle, 1963).

Generell wurden Östrogene als unkonjugiertes freies Östron und/oder Östradiol-17 α oder Östradiol-17 β mit spezifischen Antikörpern oder mit gegen unkonjugierte Gesamtöstrogene gerichtete Antikörper in Blut, in der Milch, Harn und Kot bestimmt. Der Nachweis von Östrogenen wird zur Trächtigkeitsdiagnose bei Ziege (Tamanini et al., 1986; Safar-Hermann et al., 1987; Murray und Newstead, 1988; Sindermann, 1991; Holtz, 1992; Janowski et al., 1999), Rind (Holdsworth et al., 1982; Bamberg et al., 1985) und wiederkäuenden Zootieren (Safar-Hermann et al., 1987; Chapeau et al., 1993; White et al., 1995) benutzt.

Im Vergleich zu den Gestagenen bietet eine hohe Östrogenkonzentration einen direkten Hinweis auf das Funktionieren der Feto-Plazentalen-Einheit und damit das Vorhandensein lebender Feten (Wooding und Flint, 1994). Ab dem 56. Trächtigkeitstag kann bei der Ziege im Kot eine Trächtigkeit mit einer Genauigkeit von 96% festgestellt werden (Sindermann et al., 1992). Eine subnormale Östrogenkonzentration hingegen zeigt eine Störung der endokrinologischen Funktion der Feto-Plazentalen-Einheit an (Engeland et al., 1999). Das Hormon Östradiol-17 α wird in der Feto-Plazentalen-Einheit synthetisiert (Currie et al., 1973 in Holtz, 1992; Dhinsda et al., 1981) und hauptsächlich in der Leber zu Östronsulfat umgewandelt (Thorburn et al., 1972).

2.3.3. Placentales Lactogen (PL) bzw. Chorion Somatomammotropin (CS)

Das Placentale Lactogen (PL) ist ein Proteohormon, bestehend aus 198 Aminosäuren (Martal und Djiane, 1975; Colosi et al., 1989) und ist verwandt mit dem Wachstumshormon (GH) und Prolactin (PRL) (Ogren und Talamantes, 1988). Dieses Protein wird in binukleären Zellen des Trophoblasts bzw. der Plazenta synthetisiert. Die PL-Konzentration im Blutplasma wurde bei Ziege (Currie et al., 1990), Schaf (Chan et al., 1978) und Rind (Guilbault et al., 1988) ermittelt. Die Konzentration des PLs steigt beim Schaf zwischen dem 70. und 130. Tag der Trächtigkeit an. Bei der Ziege ist die PL-Konzentration ab Tag 45 bis Ende der Trächtigkeit und bei der Kuh zwischen dem 26. und 110. Tag der Trächtigkeit erhöht (Beckers et al., 1982). Die Funktionen des PLs bestehen in der Förderung der Plazenta-Entwicklung, der Gewichtszunahme des Fetus (somatogene Aktivität), der Milchproduktion (lactogene Aktivität) und der Regulierung der Steroidsynthese im Eierstock. Der Vorteil besteht darin, dass bei Nachweis der entsprechenden Substanz (PL) im Blut von einem lebenden Fetus im Uterus ausgegangen werden kann. Blut-PL-Konzentrationen werden ab der Mitte der Trächtigkeit zur Trächtigkeitsdiagnose beim Schaf, bei der Ziege und beim Rind benutzt (Robertson et al., 1980).

2.3.4. Early pregnancy factor (EPF) bzw. early conception factor (ECF)

Der „early conception“ Faktor (ECF), früher als „early pregnancy“ Faktor (EPF) bezeichnet, ist ein Glykoprotein, das die Lymphozytenaktivität vermindert und somit eine Immunsuppression im Uterus bewirkt. Dieses Protein wird in Zellen des Trophoblasten synthetisiert und wurde bei verschiedenen Spezies einschließlich Schaf nachgewiesen (Nancarrow et al., 1979; Morton et al., 1983; Mori, 1991; Takagi et al., 1998). Die EPF-Konzentration kann beim Schaf ab dem ersten Tag nach der Ovulation oder Bedeckung im Serum festgestellt und ab Tag 19 nach der Bedeckung als früher Hinweis auf eine Trächtigkeit oder aber auch bei abnormen Konzentrationen zum Erkennen eines Aborts genutzt werden (Morton et al., 1979; Shaw und Morton, 1980). Eine niedrige EPF-Konzentration im Blut zeigt, dass die Schafe abortiert haben oder nicht trächtig sind. Die EPF-Konzentrationen werden mit dem rosette inhibition Test (RIT) gemessen. Der Test ist von der Verfügbarkeit von Spendertieren für Lymphozyten abhängig, die nur in geringen Mengen pro Entnahme gewonnen werden können (Nancarrow et al., 1979). Hingegen wurden von Gandy et al. (2001) ein einfacher qualitativer Test (Early Conception Factor-test; ECF

früher EPF) für Serum und Milch von Kühen mit monoclonalen und polyclonalen Antikörpern entwickelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten aber, dass die Genauigkeit des Tests nicht zuverlässig war (Cordoba et al., 2001).

2.3.5. Pregnancy-specific protein B (PSPB)

„Pregnancy-specific protein B“ wurde erstmals aus der Plazenta der Kuh isoliert (Butler et al., 1982). Es wird ebenso wie Placentales Lactogen und „pregnancy-associated“ Glycoprotein in den binukleären Trophoblastzellen synthetisiert (Reimers et al., 1985). PSPB hat eine molekulare Masse von 78 kDa (Sasser et al., 1989) und könnte ein „pregnancy-associated“ Glycoprotein (PAG-1, 67 kDa) sein (Xie et al., 1991; Lynch et al., 1992; Xie et al., 1996). Es wurde ein Radioimmunoassay zum PSPB-Nachweis im Blutplasma entwickelt (Sasser et al., 1986). PSPB und Interferon-Tau (INF- τ) bewirken die Sekretion und Regulierung des „granulocyte chemotactic protein-2“ (GCP-2) im Endometrium während der frühen Trächtigkeit beim Rind (Austin et al., 1997). PSPB-Konzentrationen werden bei Kuh, Ziege, Schaf und bei wiederkäuenden Zootieren im Blut kurz nach der Bedeckung und während der Trächtigkeit gemessen und zur Trächtigkeitsdiagnose und als Indikation von abgestorbenen Embryonen verwendet (Humblot et al., 1988a, 1988b, 1990; Patel et al., 1995; Zoli et al., 1995; Willard et al., 1987, 1996, 1998). Über eine Bestimmung der PSPB-Konzentration im Blut kann beim Schaf ab dem Tag 21 nach der Bedeckung eine Trächtigkeit festgestellt werden (Willard et al., 1987; Ruder et al., 1988).

2.3.6. „Pregnancy-associated“ Glycoprotein (PAG)

„Pregnancy-associated“ Glycoproteine werden in binukleären Zellen des Trophoblasten bzw. der Plazenta synthetisiert (Zoli et al., 1992a). Es wurde bereits im Blutplasma bei Schaf (Zoli et al., 1990), Rind (Zoli et al., 1991), Pferd (Green et al., 1994; ePAG, Green et al., 1998), Schwein (pPAG1, Szafranska et al., 1995; pPAG2, Dore et al., 1996), Hirsch (Osborn et al., 1996), Zebra, Katze (Gan et al., 1997) und Ziege (Garbayo et al., 1998) während der Trächtigkeit nachgewiesen. Anhand der Bestimmung der PAG-Konzentration im Blutplasma kann eine Trächtigkeitsdiagnose bei Ziegen und Schafen ab dem 21. (González et al., 1999) bzw. 25. Tag (Benítez-Ortiz, 1992) nach der Bedeckung erfolgen. Von González et al. (2001) wurden PAGs in der Ziegenmilch nachgewiesen. Mit Hilfe dessen kann ab dem 32. Tag nach der Belegung zuverlässig eine Trächtigkeit festgestellt werden (s. 2.4). Der Vorteil dieser

Methode besteht darin, dass bei Nachweis entsprechend hoher PAG-Konzentrationen im Blut oder in der Milch von der Anwesenheit eines lebenden Fetus im Uterus ausgegangen werden kann (Patel et al., 1997; Zarrouk et al., 1999).

2.4. Pregnancy-associated Glycoprotein (PAG) bei Wiederkäuern

2.4.1. Ursprung der PAGs

Pregnancy-associated Glycoproteine werden in binukleären Zellen des Trophoblasts bzw. der Plazenta (Chorion) synthetisiert (Zoli et al., 1992a). Bei der epitheliochorialen Plazenta von Wiederkäuern bestehen 15-20% des trophektodermalen Epithels aus sog. binukleären Zellen (Wooding et al., 1986). Obwohl sie ein ähnliches Aussehen besitzen, existieren verschiedene Subpopulationen (Munson et al., 1989; Jones et al., 1994). Sie können während der gesamten Trächtigkeit in das Gewebe der Gebärmutter, den Karunkeln, auswandern, um später mit den maternalen Uterusepithelzellen zu fusionieren. Bei dieser Fusion bilden sich temporär hybride dreikernige Zellen (Wooding, 1982; Wooding, 1992; Schlafer et al., 2000). PAGs werden im Zytoplasma der binukleären Zellen als Granula gespeichert und gelangen mittels Exocytose in den mütterlichen Blutkreislauf (Zoli et al., 1992a). Die PAG-Konzentration im Blutplasma der Mütter ist höher als in dem der Feten (Zoli et al., 1992b).

2.4.2. Struktur der PAGs

Von Xie et al. (1997) wurden verschiedene Arten von PAGs charakterisiert, bei deren Synthese mehr als 100 Gene bei Rind und Schaf beteiligt sein können (Green et al., 1998). Die einzelnen PAGs zeigen während der Trächtigkeit verschiedene Expressionsmuster bei Rind (bPAG), Schaf (oPAG) (Xie et al., 1997; Green et al., 2000) und Ziege (caPAG) (Garbayo et al., 1998; Garbayo et al., 2000). Beim Schaf wurde 1993 das Vorkommen von drei unterschiedlich großen PAG-Molekülen (69, 62 und 57 kDa) festgestellt, die eine partiell ähnliche Sequenz von oPAG1 und bPAG1 zeigten (Atkinson et al., 1993). Aus den Kotyledonen des Schafes isolierte Zoli et al. (1995) zwei pregnancy-associated Glycoproteine (PAG), welche später als ovPAG1 (oPAG1) und ovPAG2 bezeichnet wurden. Xie et al., 1997 konnten sieben (ovPAG3 bis ovPAG9) aus der Plazenta beim Schaf am Tag 100 der Trächtigkeit identifizieren, die sich von der des ovPAG1 unterschieden. Insgesamt wurden 9 cDNA-Sequenzen beim Schaf identifiziert. El Amiri et al. (2002) beschrieben und charakterisierten die biochemische Reinigung von ovPAG6. Abb. 1 zeigt die verschiedenen PAG-Expressionsmuster während der Trächtigkeit bei Rind und Schaf.

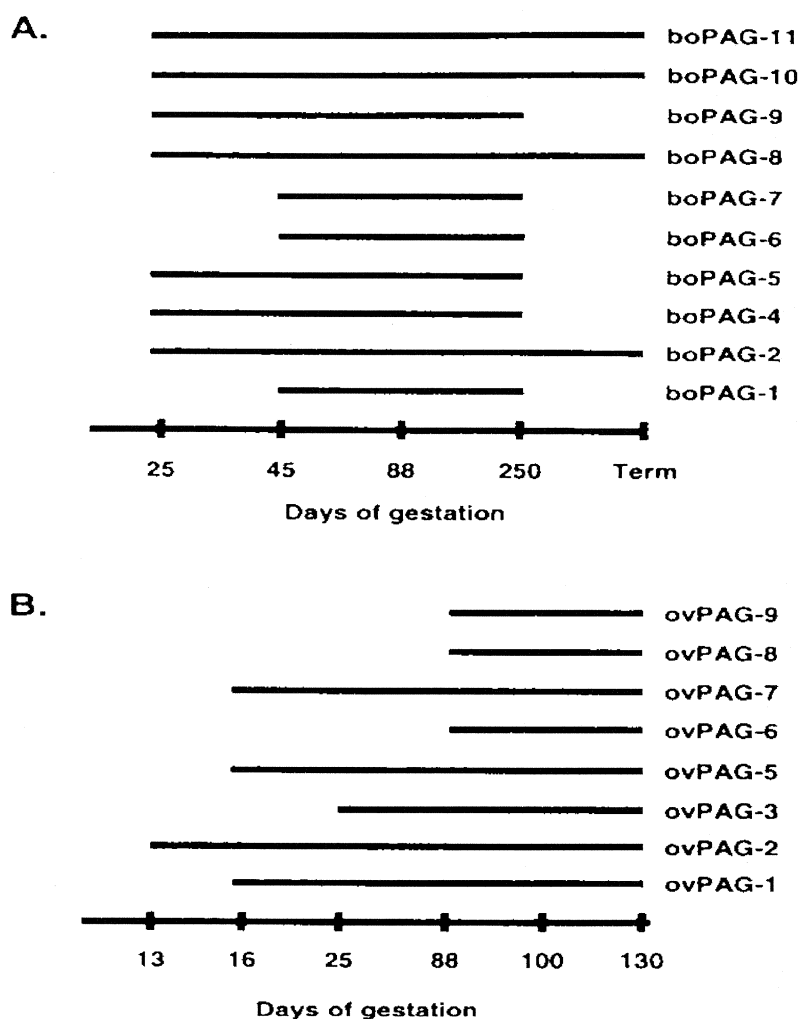


Abbildung 1: Graphische Darstellung der PAG-Expressionsverläufe während der Trächtigkeit bei Rind (A) und Schaf (B) (nach Green et al., 2000).

Bei der Ziege isolierte Garbayo et al. (1998) aus der fetalen Plazenta (Kotyledon) zwischen dem 48. und 69. Tag der Trächtigkeit caPAG und caPAG1. Danach gelang es durch die Klonierung von PAG neun cDNAs (caPAG1, caPAG3-7 und caPAG9-11) ab dem Tag 45 der Trächtigkeit zu isolieren. Inzwischen sind auch caPAG2 und caPAG8 bekannt, die nur am Tag 18 und 19 bzw. während nahezu der gesamten Trächtigkeit (von Tag 18-115) exprimiert werden (Garbayo et al., 2000). Bei der Ziege wurden insgesamt 11 PAG-cDNAs differenziert.

Beim Rind wurden pregnancy-associated Glycoproteine (PAG) durch Zoli et al. (1991) isoliert und als bPAG1 oder boPAG1 bezeichnet. Eine zweite cDNA (bPAG2 oder boPAG2) wurde mit ähnlicher Struktur, aber immunologisch unterschiedlich isoliert (Xie et al., 1994). Später identifizierten Green et al. (2000) beim Rind 19 PAG-cDNAs (von boPAG3 bis boPAG21). Insgesamt sind 21 boPAG-cDNAs identifiziert.

Das PAG zählt zu der Aspartat-Proteinasen-Genfamilie (Pepsin, Pepsinogen, Cathepsin D und Cathepsin E) ohne proteolytische Aktivität (Tab. 1) (Xie et al., 1991; Roberts et al., 1995; Guruprasad et al., 1996; Green et al., 1999). Das PAG bei Schaf und Rind hat ein Molekülgewicht zwischen 47 und 90 kDa, bestehend aus 382 Aminosäuren und zu etwa 10.0% aus Kohlenhydraten. bPAG wurde mit 39 N-terminalen Resten und vier Isoformen (pI: 4.4, 4.6, 5.2 und 5.4) isoliert (Xie et al., 1991). Garbayo et al. (1998) ermittelte beim PAG der Ziege (cPAG) Molekülgewichte von 55, 59 und 62 kDa und isolierte Isoformen (pI: 4.8-6.2) mit 27 N-terminalen Resten.

Tabelle 1: Phylogenetischer Vergleich zwischen verschiedenen PAGs und aspartatischer Proteinase (nach Guruprasad et al., 1996).

	Pepsine									
Pepsine	100	Chymosine								
Chymosine	59.5	100	bPAG1							
bPAG1	49.5	42.5	100	bPAG1v						
bPAG1v	50.8	42.9	86.1	100	bPAG2					
bPAG2	50.8	45.6	57.8	58.8	100	oPAG1				
oPAG1	49.4	42.3	70.6	71.6	58.5	100	oPAG2			
oPAG2	50.5	45.9	60.4	60.2	63.4	60.4	100	poPAG1		
poPAG1	48.6	43.5	48.8	50.5	48.5	47.4	52.5	100	poPAG2	
poPAG2	52.9	44.3	56.2	55.1	56.7	54.2	57.4	61.8	100	eqPAG
eqPAG	58.6	52.3	54.9	55.2	55.4	55.5	54.6	55.3	58.5	100

2.4.3. Funktion von PAG

Die PAG-Konzentration im Blutplasma erhöht sich während der Trächtigkeit und nimmt am Ende der Trächtigkeit drastisch zu. Der Grund für diese Erhöhung ist bisher noch ungeklärt (Zoli et al., 1992a).

Genaueres über die physiologische Funktion des PAG ist noch nicht bekannt. Die Trophoblastzellen produzieren neben verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren (Reimers et al., 1985), plazentales Laktogen (PL) (Duello et al., 1986) auch PAG (Zoli et al., 1991; Roberts et al., 1995; Green et al., 2000). Diese Hormone sind eng mit dem Wachstum und der Entwicklung des Fetus und der Aufrechterhaltung der Trächtigkeit verbunden. bPAG1 wurde zunächst als ein Protein ohne hormonale Aktivität, bPAG2 hingegen als ein luteotropes Hormon eingeschätzt (Beckers et al., 1988). Es gibt verschiedene Hypothesen über die PAG-Funktion. Die selektive Sekretion in den maternalen Blutkreislauf lässt vermuten, dass die hauptsächliche Aktivität des Glykoproteins auf maternaler Seite liegt. Der drastische Anstieg des PAGs 10 Tage vor der Geburt lässt auf eine Funktion bei der Geburtsinduktion schließen (Zoli et al., 1992a, b). PAG (bPAG1) wurde auch im Hoden und im Blutserum männlicher Tiere (Rind und Schaf) und im Blutserum von Färsen gemessen (Zoli et al., 1990), was die Vermutung zulässt, dass es eine extraplazentare Quelle für PAG gibt. Deshalb müssen niedrige PAG-Konzentrationen nicht unbedingt auf eine Trächtigkeit hindeuten (Zoli et al., 1992b). Möglicherweise agiert das PAG entweder als „Carrier“ für bioaktive Peptide oder ist selbst als Hormon an physiologischen Abläufen beteiligt und kann an spezifische Aminosäuresequenzen von Rezeptoren binden (Roberts et al., 1995; Guruprasad et al., 1996). Die Fähigkeit des PAG an Peptide zu binden wurde bereits nachgewiesen (Xie et al., 1997). Kürzlich wurde ein Einfluss von bPAG auf eine lokale Immunsuppression in der Gebärmutter vermutet und ein hemmender Effekt auf die Proliferation von Zellen des Knochenmarks festgestellt (Fernández-Arias et al., 1999; Dosogne et al., 2000). Dies bedeutet, dass PAG einen direkten Einfluss auf die polymorphkernige neutrophile Granulozytenfunktion ausüben kann. Diese Beeinflussung der neutrophilen Funktion kann bei Milchrindern nach der Kalbung (in der 1. bis 3. Woche) eine Erhöhung der Euterentzündungsempfänglichkeit bewirken, messbar durch eine hohe PAG-Konzentration im Blutplasma post partum (Zoli et al., 1992b; Dosogne et al., 1999; Hoeben et al., 1999; Dosogne et al., 2000; Hoeben et al., 2000), welche in Beziehung zur Plazenta-Retention stehen könnte (Zaiem et al., 1997).

2.4.4. PAG beim Wiederkäuer im Verlauf der Trächtigkeit und post partum

Nach einer Untersuchung von Gajewski et al. (1999) lag die PAG-Konzentration im Blutplasma bei Einlingsmutterchafen der Rasse Berrichon in den ersten 2 Wochen der Trächtigkeit auf Basalniveau (unter 2 ng/ml). In der 3. Trächtigkeitswoche stieg die durchschnittliche PAG-Konzentration von weniger als 2 auf 3 ng/ml und erhöhte sich ab der 4. Woche auf etwa 12 ng/ml. Zwischen der 5. und 17. Trächtigkeitswoche lag die Konzentration gegen 200 ng/ml und am Ende der Trächtigkeit stieg sie auf 600-700 ng/ml an. Die Ergebnisse von Gajewski et al. (1999) weichen im Hinblick auf Verlauf und Höhe der Konzentration von denen vergleichbarer Untersuchungen an Merino- und Churraschafen (Ranilla et al., 1994) sowie Assafschafen (Ranilla et al., 1997) ab. Ranilla et al. (1994) ermittelten bei Merino- und Churraschafen nur in den ersten 3 Trächtigkeitswochen vergleichbare Ergebnisse. Bis zur 9. Trächtigkeitswoche wiesen die genannten Autoren für beide Rassen eine Konzentrationserhöhung auf über 300 ng/ml nach. Anschließend sank die PAG-Konzentration drastisch auf ca. 20 ng/ml und nahm zwischen der 15. und 17. Woche wieder zu. Während die PAG-Konzentration im Blut der Merinoschafe dann bis zur Geburt auf gleichbleibendem Niveau lag (± 250 ng/ml), wurde bei den Churra- und Assafschafen (Ranilla et al., 1997) in der 21. Woche nochmals eine starke Konzentrationserhöhung (651 ± 195 ng/ml) nachgewiesen (Abb. 2). Gajewski et al. (1999) ermittelten bei Zwillingsmutterchafen (n=9) der Rasse Berrichon ab der 7. Woche der Trächtigkeit hohe Konzentrationen (>200 ng/ml), außer zwischen der 15. und 17. Trächtigkeitswoche, wo PAG-Konzentrationen von 0 ng/ml gemessen wurden (Abb. 3).

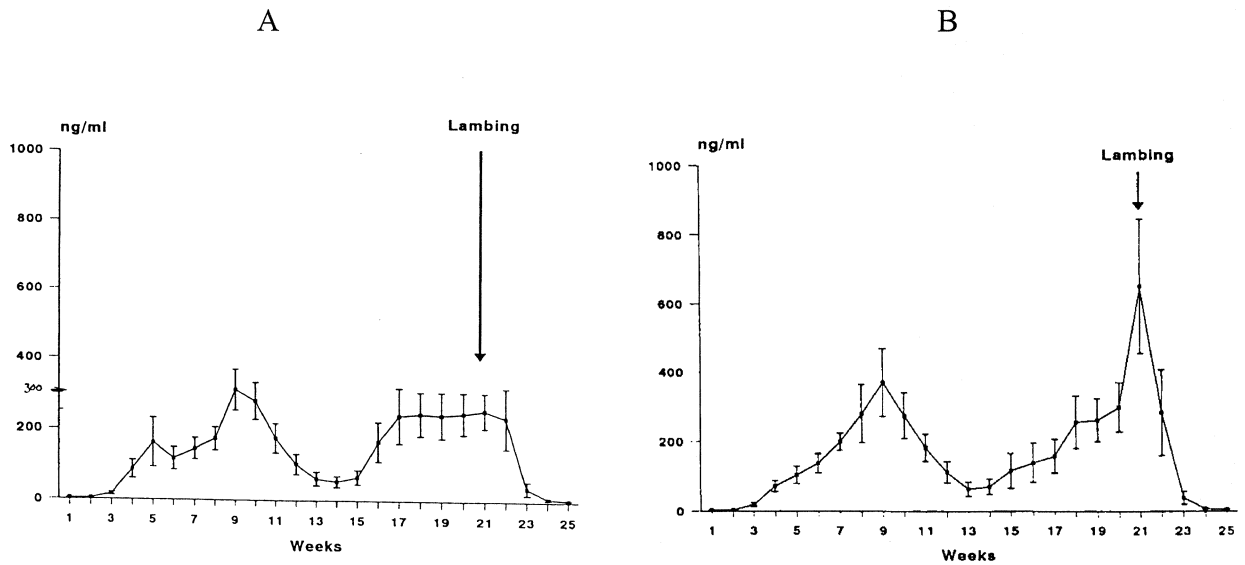


Abbildung 2: PAG-Konzentration im Verlauf der Trächtigkeit bei Merino- (A) und Churraschafen (B) (nach Ranilla et al., 1994).

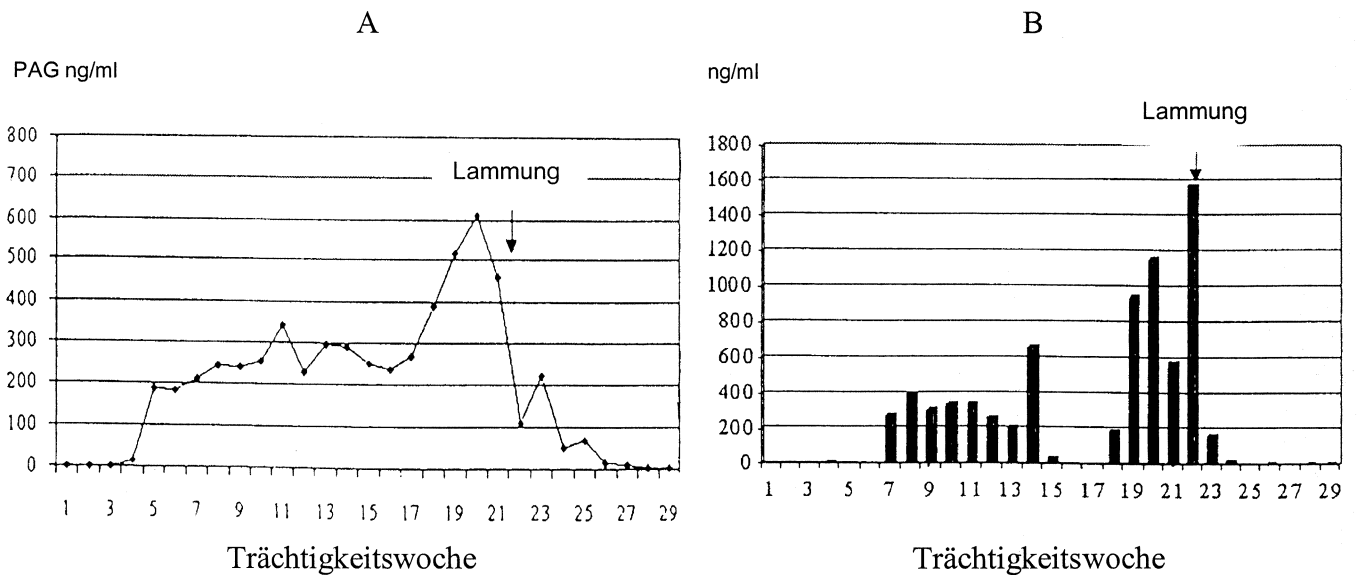


Abbildung 3: PAG-Konzentration im Verlauf der Trächtigkeit bei Einlingen (A) und Zwillingen (B) von Berrichonschafen (nach Gajewski et al., 1999).

Bei zwei brasilianischen Ziegenrassen wiesen Sousa et al. (1999) die maximale PAG-Konzentration in der 7. Trächtigswoche nach (124 ± 43 bei Caninde- bzw. 181 ± 40 ng/ml bei Moxotoziegen). Anschließend fielen die PAG-Werte im Blut bis zur Geburt auf Werte von unter 100 ng/ml ab (Abb. 4). Dieser Verlauf des PAG wurde auch bei Milchziegen (González et al., 2000) und gemischtrassigen Hausziegen (Mischrasse), die einen Hausziegen und einen spanischem Ibex-Fetus (*Capra pyrenaica hispanica*) trugen (Fernández-Arias et al., 1999) gefunden, allerdings lag die maximale PAG-Konzentration zwischen 550 und 1000 ng/ml in der 9. Trächtigswoche. Bei spanischen Ibex (Fernández-Arias et al., 1999) und bei Hausziegen in einer anderen Untersuchung (Zarrouk et al., 1999) wurden während der Trächtigkeit verschiedene Konzentrationen und Verläufe von PAG gefunden.

Für einen Einfluss der Anzahl getragener Lämmer sprechen die Angaben von Sousa et al. (1999). Bei Vorliegen einer Zwillingsträchtigkeit wurden im Blut der Ziegen ab der 6. Trächtigswoche höhere PAG-Konzentrationen gemessen als bei einer Einlingsträchtigkeit.

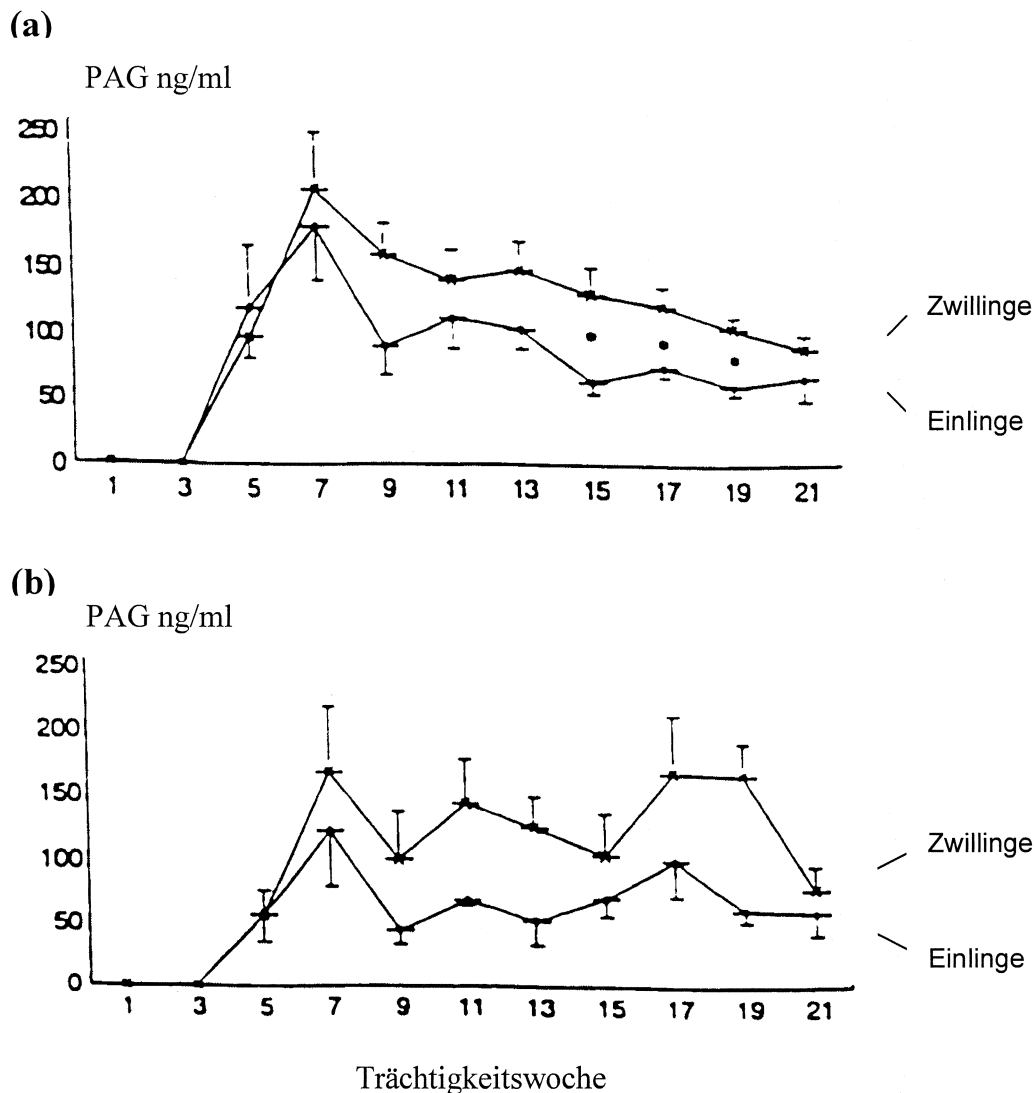


Abbildung 4: PAG-Konzentration im Verlauf der Trächtigkeit bei Moxoto- (a) und Canindeziegen (b) für Einlings- und Zwillingstragende Mutterziegen (nach Sousa et al., 1999).

Bei Rindern wurden während der Trächtigkeit stetig zunehmende PAG-Konzentrationen nachgewiesen (Abb. 5). Zwischen Tag 22 (0.38 ng/ml) und 150 (50.0 ng/ml) der Trächtigkeit wurde ein langsamer, und anschließend, bis Tag 240, ein steilerer Konzentrationsanstieg (158.9 ± 60.2 ng/ml) ermittelt. Die Konzentration erhöhte sich auf 1551.9 ± 589.7 ng/ml am Tag 270 der Trächtigkeit. Die maximale Konzentration von 2462.4 ± 1017.9 ng/ml wurde zwischen 1 und 5 Tage vor der Kalbung gemessen (Zoli et al., 1992b). Patel et al. (1997) stellten im Blut von Holstein-Friesian Kühen gegen Ende einer Einlingsträchtigkeit PAG-

Konzentrationen zwischen 400 und mehr als 1300 ng/ml, bei einer Zwillingsgeburt mehr als 2100 ng/ml fest. Sousa et al. (2002) ermittelten die PAG-Konzentration im Blutplasma von südamerikanischen Zeburindern (Azawak). Die PAG-Konzentrationen und Verläufe während der Trächtigkeit von *Bos indicus* und *Bos taurus* waren sehr ähnlich (Zoli et al., 1992b). Perényi et al. (2002) testeten bei Holstein-Friesian Färsen vier RIA-Systeme während der ersten Hälfte der Trächtigkeit und die Verläufe und Konzentrationen des PAGs waren bei allen Tieren (n=5) unterschiedlich.

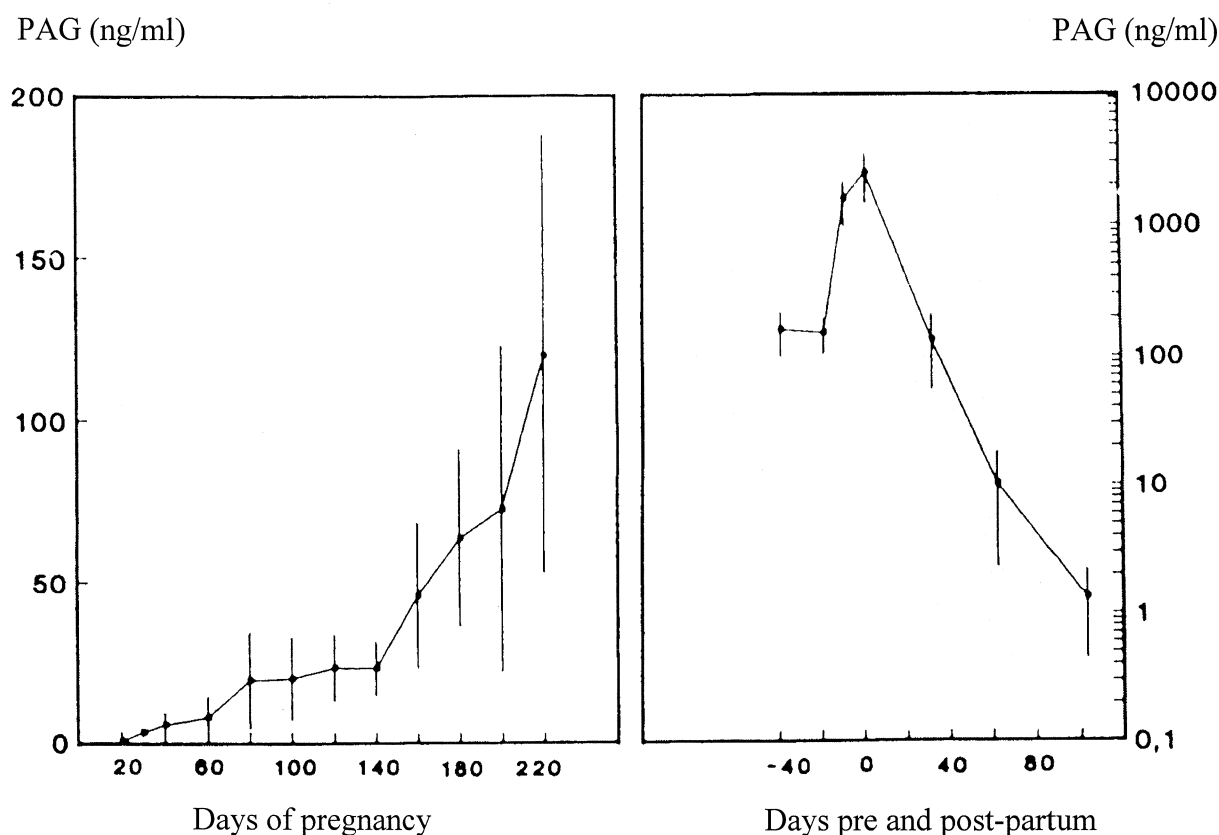


Abbildung 5: Plasma-PAG-Konzentration ($\bar{x} \pm SD$) im Verlauf der Trächtigkeit beim Rind (nach Zoli et al., 1992b).

Für den Verlauf der PAG-Konzentration nach der Geburt liegen für kleine Wiederkäuer übereinstimmende Ergebnisse vor. Innerhalb der 1. Woche nach der Geburt fallen die PAG-Werte stark und anschließend langsamer ab. Innerhalb von 4 Wochen werden wieder Basalwerte gemessen (Ranilla et al., 1994; Ranilla et al., 1997; Sousa et al., 1999; Gajewski et al., 1999; Zarrouk et al., 1999). Demgegenüber nahm die PAG-Konzentration bei Rindern bis

Tag 90 post partum zwar kontinuierlich aber nur langsam ab (Zoli et al., 1992b; Patel et al., 1997; Sousa et al., 2002). Erklärbar mag dies durch die besonders hohe PAG-Konzentration gegen Ende der Trächtigkeit (Zoli et al., 1992b) sowie die relativ hohe biologische Halbwertszeit des Glykoproteins von 9.2 bis 10.1 Tage bei Zebukühen (Sousa et al., 2002) und 7 bis 8.8 Tage bei Bos Tauruskühen (Sasser et al., 1986; Semambo et al., 1992; Kiracofe et al., 1993; Ali et al., 1999) sein.

2.4.5. Trächtigkeitsdiagnose anhand der Bestimmung der PAG-Konzentration bei Wiederkäuern

Die pregnancy-associated glycoprotein (PAG)-Konzentration im Blutplasma und in der Milch kann als ein Indikator der Trächtigkeit angesehen werden. Durch Untersuchung von PAG in der Ziegenmilch, liess sich eine Trächtigkeiten ab dem 32. Tag nach der Bedeckung feststellen (González et al., 2001). Im Blut der Ziege konnten Sousa et al. (1999) schon ab Tag 24 und González et al. (1999a, b) ab Tag 21 eine Trächtigkeit nachweisen, beim Schaf gelang dies Benítez-Ortiz (1992) ab Tag 25. Karen et al. (2002) stellten die Trächtigkeit beim Schaf (Awassi x Merino) am Tag 22 mit 100 prozentiger Genauigkeit fest.

Bei Milchrindern beträgt die Genauigkeit der Trächtigkeitsfeststellung am Tag 35 der Trächtigkeit 93 % (Zoli et al., 1992b). Da die biologische Halbwertszeit des Glykoproteins relativ hoch ist, kann man die PAG-Konzentration als Trächtigkeitsdiagnose bei Kühen erst ab dem 70. Tag nach der Kalbung nutzen (Szenci et al., 1998), da vor diesem Zeitpunkt noch die PAG Gehalte der vorangegangenen Trächtigkeit gemessen werden. Bei kleinen Wiederkäuern besteht dieses Problem nicht, da die PAG-Konzentration in der 4. Woche nach der Geburt bereits wieder Basalniveau hat und kleine Wiederkäuer zudem einer Zyklussaisonalität unterliegen. Perényi et al. (2002) testeten bei Rindern in der ersten Hälfte der Trächtigkeit verschiedene RIA-Systeme, woraus sich zwei (RIA2: PAG₅₅₊₆₂ und RIA3: PAG₅₅₊₅₉) als empfindliche Verfahren für eine Trächtigkeitsdiagnose erwiesen.

2.5. Immunoassays

Immunoassays sind immunologische Testverfahren, die auf der Bindung zwischen einem Antikörper und seinem spezifischen Antigen basieren, um entweder das Antigen oder den Antikörper zu bestimmen. Der Antikörper oder das Antigen kann mit radioaktiven Isotopen (Radioimmunoassay, RIA), mit Enzymen (Enzymimmunoassays, ELISA/EIA), fluoreszierenden Gruppen, chemielumineszenzerzeugenden Substanzen, elektroaktiven Stoffen, Kofaktoren u.v.a.m. markiert werden (Münster, 1989). Am häufigsten werden radioaktive Isotopen oder Enzyme verwendet (Parker, 1990). Als erste Alternative zum Radioimmunoassay wurde der Enzymimmunoassay entwickelt.

Immunoassays werden im Labor zur Messung z.B. von Hormonen und bestimmten Proteinen (Antigen, Hapten) in Körperflüssigkeiten, zur Bestimmung von Bakterien und ihrer Produkte, zur Bestimmung von Krebszell-Antigenen und der Konzentration von Antikörper gegen Makromoleküle von Viren und Bakterien genutzt (Wisdom, 1976).

2.5.1. Definition des Enzymimmunoassay

Der Enzymimmunoassay ist ein immunologisches Testverfahren, dessen Nachweissystem auf einer enzymatischen Aktivität beruht. Die gebräuchlichsten Abkürzungen sind ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und EIA (Enzyme Immuno Assay), die synonym verwendet werden (Wisdom, 1976).

2.5.2. Der kompetitive Enzymimmunoassay

Es gibt verschiedene Enzymimmunoassays-Verfahren zum Nachweis von Antigenen, wie z.B. kompetitiver EIA, Immunoenzymometric-Test oder sog. „Sandwich“ EIA, von Antikörpern und Haptenen, die bei Wisdom (1976), Meyer (1989) und Möller (1991) näher beschrieben werden.

Der kompetitive EIA beruht auf einer Signaländerung durch Bindungskonkurrenz des zu bestimmenden Hormons und markierten definierten Hormons für denselben Immunreaktanden. Die resultierende Farbintensität ist nach dem Massenwirkungsgesetz umgekehrt proportional zur Hormonkonzentration in der Probe (Engvall et al., 1971).

2.5.2.1. Prinzip des „kompetitive Doppelantikörpertechnik“-Tests

Der kompetitive Doppelantikörpertechnik-Test mit gleichzeitiger Inkubation des zweiten Antikörpers ist eine Variante des kompetitiven EIAs. Bei dieser Technik wird zuerst die Oberfläche der Mikrotitrationsplatten mit Schaf-anti-Kaninchen-IgG (ersten Antikörper) beschichtet und anschließend die Probe (unbekannte Menge Östrogene) und das markierte Hormon in die Vertiefungen einpipettiert. Danach erfolgt die rasche Zugabe des hormonspezifischen Antikörpers (zweiter Antikörper) der aus dem Kaninchen stammt. Der hormonspezifische Antikörper wird in weniger als 1 Minute in die 96 Vertiefungen dispensiert, um somit die Immunreaktionen bei allen Proben nahezu gleichzeitig zu starten. In der folgenden Inkubation (über Nacht) kommt es zur kompetitiven Antikörperbindung zwischen markiertem und freiem Hormon und gleichzeitig zur immunologischen Bindung des hormonspezifischen IgG an den Beschichtungsantikörper (Meyer, 1989). Ungebundene Antigenmoleküle und enzym-markiertes Hormon werden anschließend mit geeigneten Waschschrritten entfernt. Der Nachweis der gebundenen Enzymaktivität erfolgt mittels einer chromogenen Nachweisreaktion (Tetramethylbenzidine, TMB). Hier ist das Messsignal indirekt proportional zur Antigenkonzentration, d.h. Hormonkonzentration in der Probe (Abb. 6) (Meyer, 1992; Aigner und Neumann, 1997).

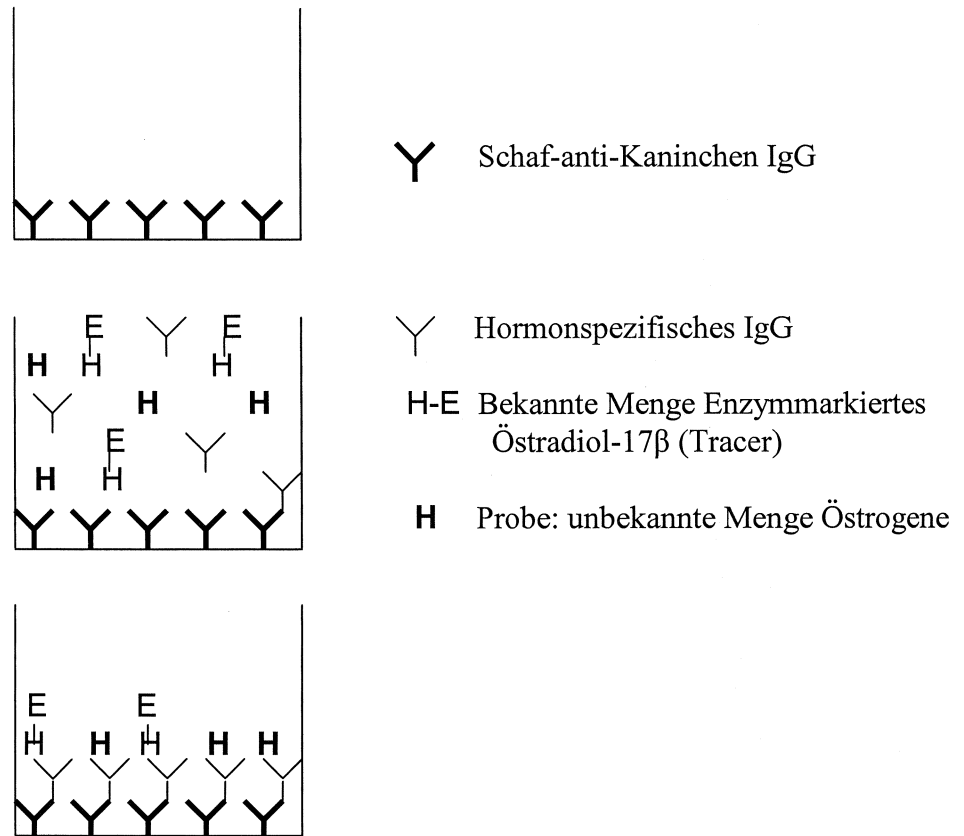
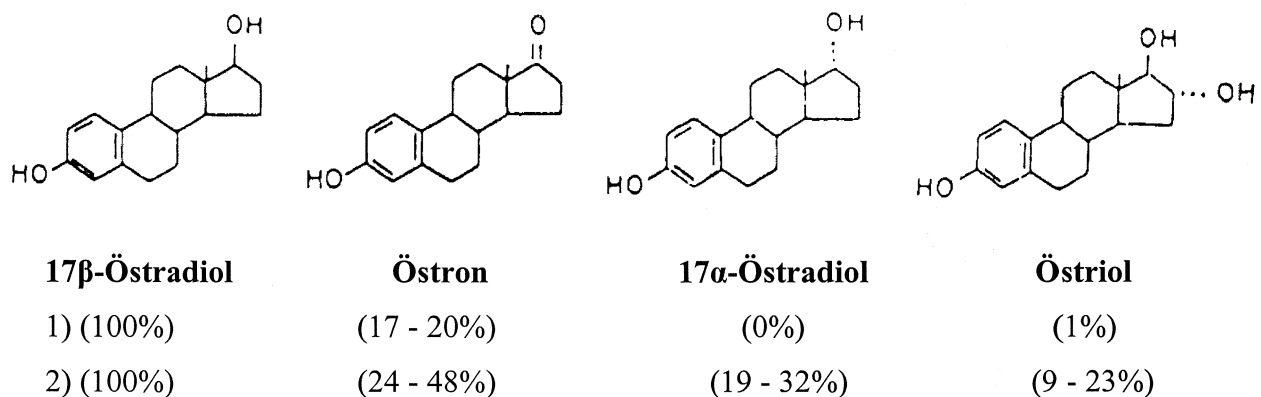


Abbildung 6: Prinzip des Doppelantikörpertechnik-Tests.

2.6. Biosynthese und intermediärer Stoffwechsel der Östrogene

Östrogene Wirkstoffe kommen nicht nur bei Mensch und Tier als Sexualhormone (endogene Östrogene) vor, sondern finden sich auch in der Umwelt als Rückstände natürlicher Inhaltsstoffe von Pflanzen und Pilzen (Phytoöstrogene wie Coumestrol und Genistein und Mykoöstrogene wie Zearalenon), sowie als Rückstände von Medikamenten (synthetische Östrogene wie z.B. Ethinylöstradiol, Tamoxifen und Diethylstilbestrol) und Industriechemikalien oder Xenoöstrogenen (Bisphenol-A, 4-Nonylphenol und o,p'-DDD). Letztere sind Chemikalien mit östrogener oder anti-östrogener Wirkung und haben Einfluss auf das endokrine System. Die Mehrzahl dieser Wirkstoffe weist keine Ähnlichkeiten zur Steroidstruktur der östrogenen Sexualhormone auf (Hock und Seifert, 1998).

Als Sexualhormone kommen im wesentlichen drei körpereigene Östrogene mit unterschiedlicher biologischer Aktivität vor: Östron, Östradiol und Östriol (Abb. 7) (Velle, 1963).



1) Biologische Wirksamkeit bei Auslösung eines vaginalen Östrus und Brunstverhaltens bei Schafen.

2) Bindung an uterine zytoplasmatische Östrogenrezeptoren vom Rind.

Abbildung 7: Chemische Struktur körpereigener Östrogene (nach Goes de Pinho, 1995).

2.6.1. Biosynthese der Östrogene im Eierstock

Die Eierstöcke der Säugetiere enthalten eine noch nicht aktive Gruppe von primordialen Follikeln. Jeder Follikel setzt sich aus einer Eizelle und einem einfachen Kumulus-Komplex zusammen. Bei erwachsenen Tieren werden zyklisch primordiale Follikel-Gruppen aktiviert, die Sekundärfollikel und einzelne davon Tertiärfollikel bilden. In den ausgereiften Tertiärfollikeln werden zunehmende Mengen an Östrogen gebildet (von 12 bis 25 pg/ml Plasma bei der Kuh) (Drion et al., 1997; Irving-Rodgers et al., 2002). Die Östrogene selbst sind wichtige Regulatoren der Funktion des Eierstockes, insbesondere des Follikelwachstums (Palter et al., 2001).

Bei nicht trächtigen Wiederkäuern sind die Eierstöcke die Hauptquelle der Östrogenproduktion. Durch Kaltenbach et al. (1976) wurden folgende Östrogenmetaboliten identifiziert: freies, gluk- und sulfokonjugiertes Östron, Östradiol-17 α und Östradiol-17 β , das von Velle (1958) und Short (1962a, b) beim Rind im Eierstock identifiziert wurde. Östradiol-17 β ist das hauptsächliche ovarielle östrogene Hormon in der Brunst bei allen Tieren (Velle, 1963; Schwartz, 1982; Klauke und Hoffmann, 1992).

Die Synthese der Östrogene erfolgt bei der Ziege über Androgene die in den Thekainterna-Zellen aus Cholesterol, das über das Blut dort hin gelangt, gebildet werden (Band et al., 1987). Die Thekainterna-Zellen haben Rezeptoren für das Hormon LH, das die Androgenese steuert. Die Androgene werden von den Granulosazellen aufgenommen und durch das Enzym Aromatase-P450 in den Mitochondrien unter dem Einfluss von FSH in verschiedene östrogene Hormone umgewandelt (Drion et al., 1997). Östrogene (Rosenfeld et al., 2001) und die Progesteronkonzentration haben einen direkten Effekt auf den Eierstock und bewirken bei der Ziege ein schnelles Heranwachsen der nächsten Follikel-Welle während der frühen Gelbkörperphase (Menchaca und Rubianes, 2002). Die Östrogene sind ebenso wie die anderen Steroidhormone wasserunlöslich und können nur durch Bindung an Proteine aus den Follikelepithelzellen bzw. der Plazenta in die Follikelflüssigkeit bzw. in das Blutplasma überführt und zu Gebärmutter, Hypothalamus, Milchdrüse, den verschiedenen Fortpflanzungsorganen und anderen Organen transportiert werden (Kolb, 1984; Rosenfeld et al., 2001).

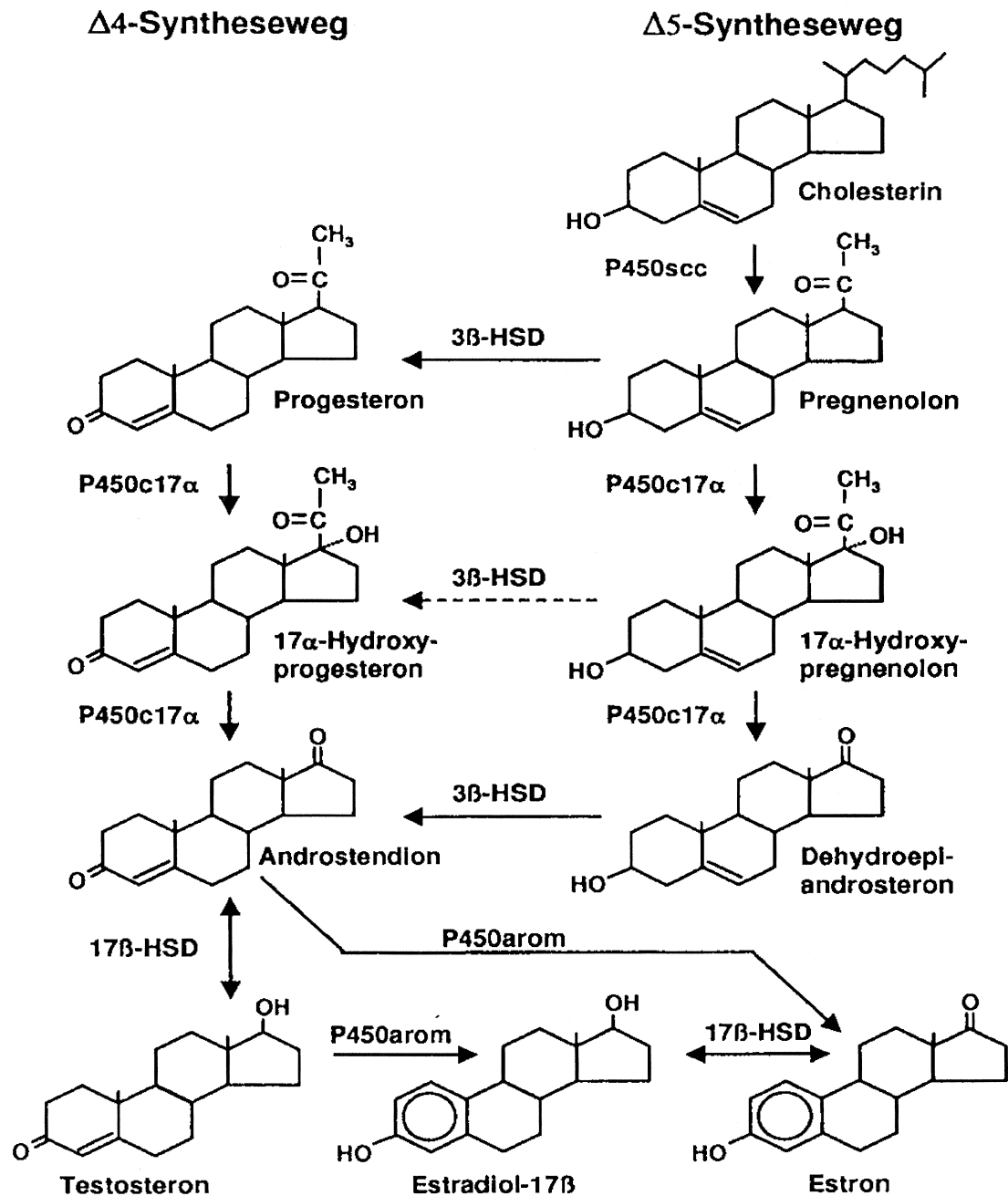
2.6.2. Biosynthese der Östrogene in der Plazenta

Während der Trächtigkeit werden bei Wiederkäuern große Mengen an Östrogenen in der Plazenta (Plazentome) synthetisiert (Challis und Linzell, 1973; Schlafer, 1993), wobei die Menge der insgesamt produzierten Östrogene die ovarielle Östrogenproduktion bei weitem (bis zu Faktor > 1000) übersteigen kann (Talamantes und Ogren, 1988). Beim Rind wurden Östron, Östradiol-17 β und bei Schaf und Ziege zusätzlich Östradiol-17 α identifiziert (Velle, 1958; Gorski und Erb, 1959). Früher wurde das Östradiol-17 α als hauptsächliches Östrogen angesehen (Velle, 1963), aber Klauke und Hoffmann (1992) stellten beim Schaf, und Hoffmann et al. (1997) beim Rind, das Östronsulfat als hauptsächliches Östrogenhormon fest, das in der Plazenta synthetisiert wird.

Cholesterol ist die Vorstufe aller Steroidhormone und wird mit der Nahrung aufgenommen oder aus Acetyl-CoA in fast allen Körperzellen synthetisiert. Der Transport des Cholesterols wird im Blut durch Lipoproteine niedriger oder hoher Dichte (low- or high-density lipoproteins) gewährleistet (Stryer, 1996; Niswender, 2002). Bei der Kuh wurde der fetale Trophoblast, d.h. die Cotyledonen als der eigentliche Ort der Synthese erkannt (Hoffmann et al., 1979). Die Aufnahme des Cholesterols wird durch einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche ermöglicht und so in die Mitochondrien transportiert. Pregnenolon ist das erste stabile Zwischenprodukt auf dem weiteren Weg der Steroidhormonsynthese. Ob daraus Corticoide, Gestagene, Androgene oder Östrogene gebildet werden, wird organabhängig durch spezifische Enzyme definiert. In Abb. 8 wird die Bildung der Östrogene dargestellt. Sie kann grundsätzlich entweder auf dem sogenannten Δ 4- oder Δ 5-Syntheseweg erfolgen. Die Bildung auf dem Δ 5-Syntheseweg erfolgt über 17 α -Hydroxypregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Androsteron, auf dem Δ 4-Weg über Progesteron, 17 α -Hydroxyprogesteron und Androstendion. Die Östrogene Östron und 17 β -Östradiol entstehen durch Aromatisierung von Androstendion bzw. Testosteron (Schuler, 2000). Das Östron kann zu Östradiol-17 β und Östradiol-17 α und bei Rind, Schaf und Ziege auch umgekehrt aromatisiert werden (Velle, 1963).

Während der Trächtigkeit werden bei Wiederkäuern freies Östron, Östradiol-17 β und Östradiol-17 α als aktive Form synthetisiert. Die Sulfokonjugation der Östrogene wird vom Enzym Sulfotransferase durch Übertragung einer Sulfatgruppe auf das C-3 Atom in den Cotyledonen katalysiert (Robertson und King, 1979; Mattioli et al., 1984; Möstl et al., 1988).

Im Karunkel wird wieder die freie Form über die Sulfataseaktivität zurückgebildet (Gadsby et al., 1976; Mattioli et al., 1984). Die Östrogene werden aus der Plazenta in Bindung an Proteinen in das Blutplasma übergeführt (Kolb, 1984). Sie werden in der Leber unwirksam gemacht durch eine Verbindung mit Glukuronat und Sulfat.



P450scc = Cytochrom P450 side-chain-cleavage
P450c17 α = Cytochrom P450c17 α (17 α -Hydroxylase-C17,20-Lyase)
3 β -HSD = 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase- $\Delta 5/4$ -Isomerase
17 β -HSD = 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
P450arom = Aromatase

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Progesteron- bzw. Östrogenbiosynthese (nach Schuler, 2000).

2.6.3. Funktion der Östrogene

Aus dem Blutplasma werden die Östrogene in die verschiedenen, in ihrer Funktion von diesen Hormonen abhängigen Zelltypen, überführt. Dabei werden sie an lipophile Bereiche der Zellmembranen gebunden und in das Zytoplasma transportiert. Dort findet eine Bindung an Rezeptormoleküle statt, mit deren Hilfe die Östrogene in die Zellkerne überführt werden. Hier werden sie an Rezeptoren des Chromatins gebunden und beeinflussen die Transkription. In den meisten Zelltypen fördern sie die Synthese bestimmter Formen von RNA, über die Proteine synthetisiert werden (Kolb, 1984; Clark et al., 1985). Die Funktionen der Östrogene werden mit verschiedenen biologischen Abläufen bei der Fortpflanzung in Verbindung gebracht, sowie als Wachstumsstimulanzen für normale Gewebe (z.B. Calcifizierung des Knochens) und neoplastische Gewebe (Tumoren) erkannt (Velle, 1963). Die Funktionen bei der Physiologie der Fortpflanzung sind: Entwicklung und Ausprägung der weiblichen Geschlechtsorgane und sekundären Geschlechtsmerkmale, Bewirkung der brunsttypischen Verhaltensmerkmale, Regulation des Sexualzyklus, Transport und Implantation der befruchteten Eizelle, Vorbereitung der Gebärmutter Schleimhaut und der Gebärmutterdrüsen für die Implantation des Embryos, Aufrechterhaltung der Trächtigkeit, Milchdrüsenentwicklung und Eintritt der Laktation (Sutherland und Lindsay, 1991; Kaplan und Katz, 1994; Billings und Katz, 1999). Zusätzlich spielen die Östrogene eine Rolle bei der Vorbereitung des weiblichen Genitaltrakts auf die Geburt sowie bei den Vorgängen, die zur Lösung der Plazenta führen (Grunert et al., 1989).

2.7. Wege der Hormon-Exkretion

Der Kot ist ein biologisches Ausscheidungsprodukt des Darms mit metabolisierten und unmetabolisierte Substanzen des Körpers und der Ernährung. Der Harn ist über die Nieren abgesonderte Flüssigkeit, mit der harnpflichtige und andere Substanzen ausgeschieden werden. Kot und Harn sind wichtige Wege der Exkretion von Proteinen, Hormonen oder Metaboliten und anderen Substanzen. In der Milch hingegen werden Östrogene nur in niedriger Konzentration ausgeschieden (Challis und Linzell, 1973). Ein großer Teil der Östrogenmoleküle wird in der Leber unwirksam gemacht: Dabei findet eine Verbindung mit Glukuronat bzw. Sulfat statt. Die Konjugate werden über die Galle in den Darm bzw. über den Harn ausgeschieden (Abb. 9). Durch Aktivität der Sulfatase und Glukuronidase der Bakterien werden die Östrogene im Darm dekonjugiert und teilweise rückresorbiert

Die Entnahme von Kotproben erfolgt nicht-invasiv. Kotproben zur Hormonanalyse können nach der Entnahme lyophilisiert, eingefroren (bei -20 oder -196°C) oder bei Raumtemperatur in 95% Ethanol konserviert werden (Whitten et al., 1998). Das Trocknen der Kotproben ist eine gute Methode für die Lagerung der Proben im Feld, wo es keine organischen Lösungsmittel und keine Elektrizität gibt. Die Stabilität der Hormone Östradiol und Testosteron betrug nach 3 Wochen Lagerung 100% (Brockman und Whitten, 1996). Ähnliche Angabe belegen, dass die Östrogenkonzentration im Kot des trächtigen Rindes durch Lagerungstemperaturen von 20 bis 30°C während 8 Tagen nicht wesentlich beeinflusst wurde (Limpach, 1985). Glatzel (1999) hingegen ermittelte eine ständige Verringerung der Progesteronkonzentration im Kot nicht trächtiger Kühe bei Lagerung von Kotproben bei 37°C und einer Lagerungsdauer von 2 Tagen. Bei Kotproben von nicht tragenden und tragenden Kühen, die für 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 bis 23°C) gelagert wurden, nahm die Gestagen- (Progesteron) und Östrogenkonzentration (Östron) ebenfalls graduell ab (Schlenker et al., 1998). Holtz (1992) fand einen Effekt der Lagerungsdauer und -temperatur auf die Östrogenkonzentration im Ziegenkot. In Plasmaproben wurde ebenfalls ein Einfluss der Lagerung auf die Hormonkonzentration festgestellt (Kaye et al., 2000).

2.9. Östrogenkonzentration während der Trächtigkeit bei Wiederkäuern

Östrogene wurden als freie Östrogene (Östron, Östradiol, Östriol und freies Gesamtöstrogen) und als mit Sulfat oder Glukuronat konjugierte Östrogene (Östronsulfat, Östronglukuronat, Östradiolsulfat- α,β , Östradiolglukuronat- α,β und konjugierte Gesamtöstrogene) während der Trächtigkeit bei Wiederkäuern nachgewiesen. In der Literatur wurden in den meisten Studien die Östrogene als unkonjugiertes Östron und/oder Östradiol- 17α oder -17β (freies Östrogen) mit spezifischen Antikörpern oder Antikörpern gegen unkonjugierte Gesamtöstrogene im Blutplasma, in der Milch, im Harn und im Kot bestimmt (Schwarzenberger et al., 1996a).

2.9.1. Östrogenkonzentration im Blut während der Trächtigkeit bei Wiederkäuern

Bei der Ziege wurde im Verlauf der Trächtigkeit eine Zunahme der Gesamtöstrogenkonzentration im Blutplasma gezeigt (Challis und Linzell, 1971; Sindermann, 1991).

Tamanini et al. (1986) bestimmten bei der Ziege konjugiertes Östron und Gesamtöstrone (konjugierte und unkonjugiert). Eine Plasma-Östronkonzentration war bis zum 60. Tag der Trächtigkeit nicht feststellbar, erhöhte sich aber dann stetig bis zum Ende der Trächtigkeit. Ähnliche Profile wurden für Gesamtöstron erhalten. Als Maximalwerte für konjugiertes Östron und Gesamtöstron wurden kurz vor der Ablammung ca. 1000 pg/ml bzw. 40 ng/ml beobachtet. Die Gesamtöstronkonzentrationen unterschieden sich nicht zwischen Einlingen und Zwillingen. Ähnliches wurde von Sindermann (1991) bei Bestimmung der Östronsulfatkonzentration bei der Ziege gefunden. Die Östronsulfatkonzentrationen lagen bei der Ziege von Trächtigkeitstag 0 bis 30 und von 10 bis 50 Tage nach der Geburt unter 50 pg/ml Serum. Die Konzentration von Östronsulfat stieg ab dem 37. Trächtigkeitstag auf 100 pg/ml. Bis zum 50. Trächtigkeitstag erreichte sie 0.8 ng/ml. Dieser Östronsulfatanstieg erstreckte sich bis zum 83. Trächtigkeitstag auf etwa 2.6 ng/ml (Abb. 10). Dann blieben die Werte bis zum 120. Trächtigkeitstag weitgehend auf einem Plateau und stiegen bis zur Geburt auf Maximalwerte von 5.8 bis 31.7 ng/ml. Nach dem Ablammen folgte binnen 2 bis 4 Tagen ein drastischer Abfall auf Konzentrationen von 0.2 ng/ml. Es zeigte sich eine positive Beziehung zwischen der Östronsulfatkonzentration und der Fetenzahl (Challis und Linzell, 1971; Tamanini et al., 1986). Im Vergleich zum Schaf waren bei der Ziege während der Trächtigkeit die Östrogenkonzentrationen höher und es gab beim Schaf keine deutliche Erhöhung der Östrogenkonzentration zum Zeitpunkt der Ablammung (Challis und Linzell, 1971; 1973).

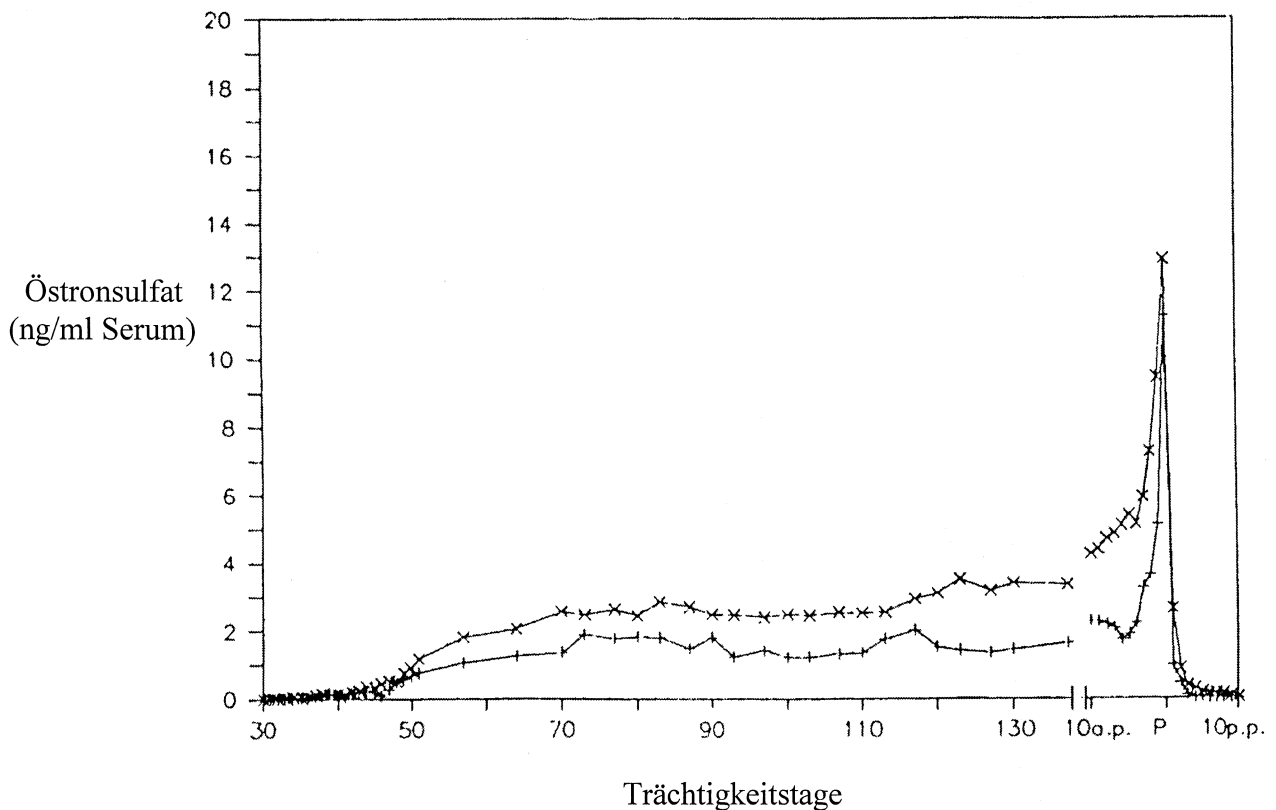


Abbildung 10: Mittelwerte der Östrogensulfatkonzentrationen im Serum während der Trächtigkeit von vier Ziegen mit einem Fetus (+) und 18 Ziegen mit zwei Feten (x) (nach Sindermann, 1991).

Bei Rindern wurden freie und konjugierte Östrogene im Blut während der Trächtigkeit bestimmt (Hoffmann et al., 1997; Zhang et al., 1999). Das dominierende Östrogen war mit 62% in überwiegend sulfatierter Form das Östron, gefolgt von Östradiol-17 α mit 37% und Östradiol-17 β mit 1%. Die freie Östronkonzentration lag bis zum 119. Tag der Trächtigkeit unter 0.4 nmol/l, zwei Tage vor der Geburt wurde ein Mittelwert von 7.85 nmol/l erreicht, der vier Tage nach der Geburt wieder auf 0.11 nmol/l abfiel. Der Verlauf der Östronsulfatkonzentration war dem des freien Östrons ähnlich, lag aber auf einem höheren Niveau. Vor der Geburt lagen die Östronsulfatkonzentrationen zwischen 16.4 und 21.5 nmol/l. Der Verlauf von freiem Östron korrelierte mit Östronglukuronat und Östronsulfat mit $r=0.89$ bzw. $r=0.95$. Östradiol-17 α -Sulfat konnte nicht nachgewiesen werden, da sich kein Unterschied zwischen Östradiol-17 α -Glukuronat und gesamt-konjugiertem Östradiol-17 α ergab. Östradiol-17 α -Glukuronat war ab dem 160. Tag a.p., das etwa dem 120. Tag der

Trächtigkeit entspricht, nachweisbar (448 pmol/l), freies Östradiol-17 α aber nur direkt vor der Geburt (ab Tag 5 a.p.) (198 pmol/l). Das Verhältnis von freiem Östradiol-17 α zu Östradiol-17 α -Glukuronat lag hier bei 1:50 (198:10463 pmol/l). Östradiol-17 β -Sulfat konnte ab der zweiten Hälfte der Trächtigkeit (34.3 pmol/l) und Östradiol-17 β -Glukuronat (125.8 pmol/l) und freies Östradiol-17 β (112.5 pmol/l) ab Tag 10 a.p. gemessen werden. Kurz vor der Geburt wurden die maximalen Konzentrationen von 112.5, 144.4 bzw. 297.3 pmol/l gemessen (Goes de Pinho, 1995). Beim Rind wurde das Östronsulfat als das hauptsächliche Östrogen nachgewiesen, welches in der Plazenta synthetisiert wird. Die Konzentrationen von freiem und konjugiertem Östradiol-17 β und Östradiol-17 α ergeben sich aus dem Östrogenstoffwechsel und dem enterohepatischen Kreislauf (Hoffmann et al., 1997). Abb. 11 stellt schematisch die Konzentrationen von verschiedenen Östrogenen zwischen mütterlichem und fetalem Kompartiment dar.

2.9.2. Östrogenkonzentration im Harn während der Trächtigkeit bei Wiederkäuern

Bei Ziege und Rind steigen die Östrogenmengen im Harn ca. 3 Monate nach der Bedeckung an und erhöhen sich bis zur Ablammung stetig weiter (Velle, 1963; Hoffmann et al., 1997). Beim Schaf hingegen ist im Harn keine signifikante trächtigkeitsbedingte Erhöhung der Östrogenmenge feststellbar, außer ganz am Ende. Östradiol-17 α wurde als der hauptsächlichste Metabolit angesehen, der bei Wiederkäuern im Harn nachgewiesen werden kann (Velle, 1963). Demgegenüber wurden von Challis und Linzell (1973) bei der Ziege und von Hoffmann et al. (1997) bei Rindern das Östronsulfat als hauptsächlichster Metabolit, gefolgt von Östradiol-17 α -Glukuronat und Östradiol-17 β -Glukuronat ermittelt. Östradiol-17 α -Sulfat und Östradiol-17 β -Sulfat konnten nicht nachgewiesen werden.

In den ersten 40 Tagen der Trächtigkeit sind die konjugierten Formen des Östrons beim Rind im Harn vorhanden, freies Östron ist nicht nachweisbar (Goes de Pinho, 1995). Am Ende der Trächtigkeit variiert das Verhältnis Östron-Glukuronat zu Östron-Sulfat nach dieser Untersuchung von 1:2 (0.4:0.8 pg/mosmol) bis 1:73 (48.5:2673 pg/mosmol). Die Korrelation zwischen den beiden betrug $r = 0.79$. Freies Östadiol-17 α wurde 5 Tage vor der Geburt mit 1.1 pg/mosmol gemessen. Östadiol-17 α -Glukuronat wurde bereits in den ersten Tagen der Trächtigkeit in einer mittleren Konzentration von 0.4 pg/mosmol festgestellt, und seine Konzentration erhöhte sich in Laufe der Trächtigkeit auf 241.4 pg/mosmol am Ende. Östadiol-17 α -Sulfat konnte ebenso wenig wie freies Östradiol-17 β im Harn nachgewiesen werden. Während der erste Hälfte der Trächtigkeit lagen niedrige Mengen (1.0 pg/mosmol) an Östradiol-17 β -Glukuronat und Östradiol-17 β -Sulfat vor, die kurz vor der Geburt die höchsten Werte mit 24.2 bzw. 11.9 pg/mosmol erreichten (Goes de Pinho, 1995; Hoffmann et al., 1997).

2.9.3. Östrogenkonzentration im Kot während der Trächtigkeit von Wiederkäuern

In den Plazentomen der Plazenta werden große Mengen Östrogene synthetisiert (Challis und Linzell, 1973), die bei Wiederkäuern über den Kot, als wichtigsten Hauptausscheidungsweg, und Harn als Östrogen- und Progesteronmetaboliten ausgeschieden werden (Velle, 1963; Bamberg et al., 1986; Adams et al., 1994; Palme et al., 1996). Sogar im Meconium der Neugeborenen wurden hohe Konzentrationen von freien und konjugierten Östrogenen, hauptsächlich als Östradiol-17 α festgestellt (Velle, 1963; Choi, 1987; Hoffmann et al., 1997). Im Kot der Müttern finden sich die meistens Östrogene in unkonjugierter Form. Bamberg et al. (1986) fanden im Kot der Ziege Östron (40%) als hauptsächlichen Metaboliten, gefolgt von Östradiol-17 β (35%) und Östradiol-17 α (25%). Beim Rind hingegen wies Östradiol-17 α (56.7%) die höchste Konzentration auf, gefolgt von Östradiol-17 β (32%) und Östron (11.3%), alle in unkonjugierter Form (Hoffmann et al., 1997).

Sindermann et al. (1992) bestimmten die Gesamtöstrogenkonzentration im Ziegenkot zwischen der 5. und 13. Woche der Trächtigkeit. Bei zyklischen Ziegen variierte sie zwischen 6.8 bis 68 ng/g Kot. Bei trächtigen Ziegen hingegen lagen die mittleren Östrogenkonzentrationen im Kot in der 5. Trächtigkeitswoche bei 18 ng/g, stiegen bis zur 10. Trächtigkeitswoche auf 478 ng/g, zeigten einen leichten Abfall in der 11. Trächtigkeitswoche (431 ng/g) und zeigten danach bis zur 13. Trächtigkeitswoche einen steilen Anstieg auf 653 ng/g. Der Anstieg der Östrogene im Kot der Rinder ist dem Verlauf der Östronsulfatkonzentration im Blut ähnlich (Möstl et al., 1984). Die Östronkonzentration im Kot stieg vom 40. bis 270. Trächtigkeitstag langsam von 1.1 auf 11.6 ng/g Kot. Östradiol-17 α wurde ab dem 160. Tag a.p. mit 3.3 ng/g gemessen und stieg weiter auf 60 ng/g am Ende der Trächtigkeit an. Ein ähnlicher Konzentrationsverlauf wurde für Östradiol-17 β aber mit niedrigeren Konzentrationen von 1.9 bzw. 32.8 ng/g Kot festgestellt (Goes de Pinho, 1995; Hoffmann et al., 1997).

3. Die Plasmakonzentration des pregnancy-associated glycoprotein (PAG) im Verlauf der Trächtigkeit beim Schaf

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere und ihre Haltung

Die vorliegende Untersuchung wurde in der Herde des Versuchsgutes Rellichausen der Universität Göttingen durchgeführt (9° 41` östlicher Länge, 51° 46` nördlicher Breite, 177 m über NN). Die Untersuchung umfasste 66 tragende Mutterschafe verschiedener Rassen, 18 schwarzköpfige Fleischschafe, 41 Rhönschafe und 7 Dorper-Kreuzungen im Alter zwischen 2 und 10 Jahren. Das Gewicht der drei Rassengruppen betrug 71.4 (SEM 1.7), 51.4 (SEM 1.1) bzw. 56.5 (SEM 3.4) kg.

Vier Böcke (1 Schwarzköpfiges Fleischschaf, 1 Wiltshire Horn und 2 Dorper) wurden zusammen mit den Schafen 54 Tage auf der Weide gehalten (Tab. 2). Zusätzlich wurden 25 geschlechtsreife nicht trächtige Kontrolltiere vergleichbarer Rassenzusammensetzung (5 Schwarzköpfiges Fleischschaf x Rhönschaf, 7 Rhönschaf x Schwarzköpfiges Fleischschaf, 7 Dorper x Schwarzköpfiges Fleischschaf und 6 Dorper x Rhönschaf) erfasst.

Die Untersuchung erfolgte in der Paarungssaison der Jahre 1999/2000. Die Schafe wurden während Deckperiode und Trächtigkeit auf der Weide, während der Ablammung und 4 Wochen danach im Stall gehalten, wo sie mit Heu mittlerer Qualität *ad libitum* und 1.0 kg Kraftfutter pro Tier und Tag gefüttert wurden. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Minerallecke (18% calcium, 5% Phosphor, 2% Magnesium, 9% Natrium, Zusatzstoffe je kg: 500000 IE Vitamin A, 62500 IE Vitamin D3, 600 mg Vitamin E, 4700 mg Zink, 60mg Selen; „HEMO Mohr GmbH & Co“) und Wasser.

Der genaue Deckzeitpunkt der einzelnen Müttern war unbekannt. Deshalb wurde er unter Annahme einer Trächtigkeitsdauer von 149 Tagen rückwirkend errechnet. Unmittelbar nach der Geburt wurden Anzahl, Gewicht und Geschlecht der Lämmer erfasst.

Tabelle 2: Kreuzung der Rassen.

Böcke		Mutterschafe		
Rasse	n	Rasse	n	
Schwarzköpfiges Fleischschaf (SK)	1	Rhönschaf	24	
Wiltshire Horn	1	SK	9	
		Rhönschaf	7	
Dorper	2	SK	9	
		Rhönschaf	10	
		Dorper x SK	7	
	4		66	Gesamt

3.1.2. Blutprobenentnahmen

Beginnend 15 Tage nachdem die Böcke in die Herde kamen bis 4 Wochen nach der Ablammung (vom 20. August 1999 bis zum 23. März 2000) wurde jedem Tier in wöchentlichen Abständen durch Punktion der Vena jugularis 5 ml Blut entnommen. Von den 25 nicht trächtigen geschlechtsreifen Kontrolltieren wurde zwischen dem 29. September 1999 und 20. Januar 2000 (114 Tage) ebenfalls einmal wöchentlich 5 ml Blut entnommen. Die Blutproben wurden in Glasröhrchen aufgefangen, die als Antikoagulans 5 Tropfen 38%iges Natrium-Citrat enthielten. Sie wurden innerhalb von 60 Minuten bei 4°C zum Labor transportiert, und dort für 15 Minuten bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Etwa 2 ml Plasma wurde auf drei Reaktionsgefäße (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH) verteilt, die bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert wurden.

3.1.3. Testprinzip des Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung der PAG-Konzentration im Blutplasma

3.1.3.1. Festphasen-RIA

Der kompetitive Radioimmunoassay (RIA) ist eine sensitive Methode, Antigenkonzentrationen zu messen. Dabei können Antigenkonzentrationen ab 0.5 pg/ml bestimmt werden. Der kompetitive Radioimmunoassay nutzt die Antigen-Antikörper-Reaktion in Lösungen nach Mischung von radiomarkiertem (meist ^{125}I , ^3H) löslichem Antigen („heisses“ Antigen) mit Mengen von nicht markiertem („kaltes“) Antigen. Dabei wird das heisse, über seine Radioaktivität messbare Antigen mit steigender Konzentration des kalten Antigens ersetzt. Diese Verdrängung kann durch kaltes Antigen, dessen Menge bekannt ist, kalibriert werden. An der resultierenden Standardkurve kann dann eine unbekannte Antigenmenge abgelesen werden, wie in Abb. 12 gezeigt.

Die exakte Messung der gebundenen Antigenmenge erfordert die Trennung von nicht gebundenem Antigen. Dies kann auf verschiedene Weise, wie z.B. durch Ausfällung des Antikörpers, geschehen. Dabei muss allerdings das nicht gebundene Antigen in Lösung bleiben. Eine weitere Methode ist, den Antikörper an einen unlöslichen Träger zu koppeln, um so das gebundene Antigen durch Waschen vom nicht-gebundenen trennen zu können. Ferner kann mit Hilfe eines immobilisierten Zusatzantikörpers der Antigen-Antikörper-Komplex vom nichtgebundenen Antigen getrennt werden. Varianten des RIAs, bei denen ein Partner immobilisiert ist, werden Festphasen-RIA genannt und unter den Bindungstests näher besprochen.

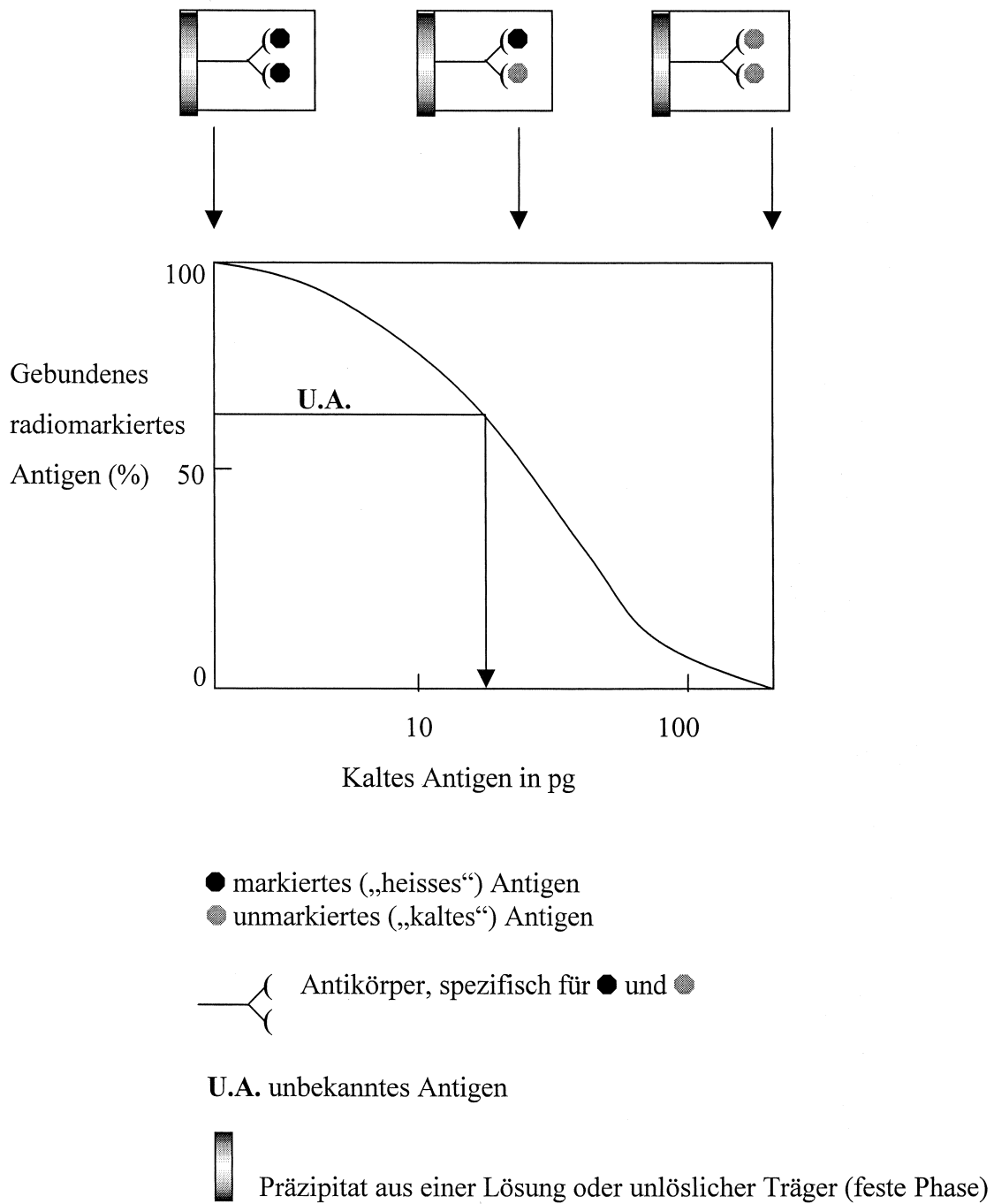


Abbildung 12: Prinzip des kompetitiven Radioimmunoassays (RIA) in Lösung oder an der festen Phase zur Quantifizierung von löslichen Antigenen (nach Lottspeich und Zorbas, 1998).

3.1.4. Erstellung der Eichkurve

Für die Erstellung der Eichkurve wurde gefriergetrocknetes PAG (von Prof. J.F. Beckers zur Verfügung gestellt) im Testpuffer in einer Konzentration von 400 ng/ml Standardlösung gelöst. Es wurden neun Verdünnungen in den Konzentrationen von 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 und 400 ng/ml hergestellt. Die Standardlösung wurde jeweils im Verhältnis 1:2 mit dem Testpuffer verdünnt, so dass eine Kalibrierkurve resultierte, auf der sich die Konzentrationen aufeinanderfolgender Punkte jeweils um den Faktor 0.5 unterschieden. Die Standardlösung von 400 ng/ml wurde zu 5 ml Portionen in Plastikröhrchen pipettiert und bis zum geweiligen Testeinsatz bei -20°C tiefgefroren.

3.1.5. Herstellung der Kontrollen

Zur Erfassung der Qualitätskriterien und zur Absicherung der Testresultate wurden 3 Kontrollösungen verwendet. Diese Kontrollösungen wurden durch Zusatz von 5, 15 und 50 ng bPAG in 1 ml PAG-freiem Rinderserum hergestellt.

3.1.6. Reagenzien für den radioimmunologischen Nachweis

Testpuffer:

0.025 M Tris, pH 7.5 enthält: 0.01 M MgCl₂, 0.1% BSA und 0.01% Neomycin-Sulfat (Zoli et al., 1992b)

Schaf-Anti-Kaninchen-IgG-Serum:

1 ml Serum enthält 2.5 mg/ml Schaf-Anti-Kaninchen-IgG-Serum (DASP-System: double antibody solid phase; Axen et al., 1967)

Bestimmung der Radioaktivität:

Die Bestimmung der Radioaktivität (¹²⁵I-PAG) erfolgte im Präzipitat (LKB Wallac 1261 Multi Gamma, 75% Effizienz).

3.1.7. Radioimmunologischer Nachweis

Die Bestimmung des Pregnancy-associated glycoprotein (PAG)-Gehalts der Blutplasmaproben erfolgte im Labor von Prof. J.F. Beckers im Institut für Physiologie der Fortpflanzung der Veterinärmedizinischen Universität Liegè, Belgien.

Die oPAG-Konzentration im Plasma wurde mittels eines heterologen Radioimmunoassays (RIA) bestimmt. Dabei wurde ^{125}I -bPAG (radioaktiv markiertes Protein) als Standard und Tracer mit dem Antiserum Anti-caPAG₅₅₊₅₉ (#708) (Verd. 1: 250 000) in Anlehnung an González et al. (1999) verwendet. Die Standardpunkte lagen zwischen 1.56 und 400 ng caPAG/ml. Jedem Standard wurde 0.1 ml PAG-freies Rinderserum hinzugefügt, um die erwartete Interferenz unspezifischer Plasmaproteine möglichst gering zu halten. Von den unbekanntenen Proben wurden jeweils 0.1 ml im Doppelansatz im Röhrchen gesetzt. Die zu analysierenden Proben und die Standards wurden nach Zusatz von 0.1 ml des Antiserums und 0.1 ml des jodhaltigen caPAG (23 000 cpm/Röhrchen) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Alle Reagenzien wurden in 0.2 ml Testpuffer gelöst und das gesamte Inkubationsvolumen betrug 0.5 ml je Röhrchen. Nach der Inkubation wurden freie und Bindungsbruchstücke durch Zusatz von 1 ml Schaf-Anti-Kaninchen-IgG-Serum abgesättigt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Probemedium mit 2 ml Testpuffer verdünnt, sofort bei 1500 g und 4°C für 20 min zentrifugiert und anschliessend der Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Radioaktivität (^{125}I -PAG) erfolgte im Präzipitat. Die gemessenen und bekannten PAG-Konzentrationen wurden als Variationskoeffizient (CV) von 10 Wiederholungen in dem gleichen Test durchgeführt (Rodbard, 1974).

3.1.8. Statistische Auswertung

Die Daten der Plasma-oPAG-Konzentration wurden mit einem split-plot Design ausgewertet, wobei die Rasse der weiblichen Tiere (Schwarzköpfiges Fleischschaf, Rhönschaf und Dorper Kreuzung) als main-plot-Behandlung und Woche der Trächtigkeit als subplot-Behandlung aufgenommen wurden. Die Behandlung (Rasse) wurde gegen Schaf innerhalb Behandlung als Fehler und die Interaktion der Woche der Trächtigkeit und Rasse bei Behandlung gegen Rest-Fehler mit dem Statistik-Programm-Paket SAS[®], Version 8.1 (Prozedur „GLM“) geprüft. Die Beziehungen zwischen Variablen wurden unter Anwendung der linearen Regression mit dem

Statistik-Programm-Paket SAS[®], Version 8.1 (Prozedur „GLM“) untersucht. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Behandlungen wurden mit dem multiplen t-Test und die Korrelationen zwischen der PAG-Konzentration und dem Gewicht bzw. Geschlecht der Lämmer wurden mit dem Pearson-Test auf Signifikanz geprüft (SAS[®], Version 8.1, Prozedur „GLM“).

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Qualitätskriterien für das Referenzverfahren

Die folgende laborspezifischen Qualitätskriterien für das Referenzverfahren werden in Tab. 3 wieder gegeben. Der Variationskoeffizient bestätigte die Genauigkeit des RIA-Tests. Untere und obere Nachweisgrenze betragen 1.56 bzw. 400 ng/ml.

Tabelle 3: Qualitätskriterien des PAG-RIAs.

Bekanntes Konzentration (ng/ml)	n	Gemessene PAG-Konzentration (ng/ml)			Geschätzte Konz. (ng/ml) für B/Bo ^a		
		Mittel	SEM	CV (%)	20%	50%	80%
5	10	5.10	0.07	6.27	-	-	-
15	10	15.24	0.13	3.94	52.7	11.2	2.4
50	10	48.82	0.53	4.81	-	-	-

^a B/Bo, prozentuale Tracerbindung im Verhältnis zum Nullstandard

3.2.2. PAG-Konzentration im Blut der Kontrolltiere

Die durchschnittliche pregnancy-associated glycoprotein (PAG)-Konzentration im Blutplasma der nicht trächtigen, geschlechtsreifen Kontrolltiere (n=25) lag während des gesamten Versuchszeitraums bei 1.46 (SEM 0.08) ng/ml (s. Anhang 8.1, Tab. A).

3.2.3. Verlauf der PAG-Konzentration im Blut während der Trächtigkeit und 4 Wochen nach der Geburt

Bei den 66 Mutterschafen der Rassen Schwarzköpfiges Fleischschaf (n=18), Rhönschaf (n=41) und Dorper-Kreuzungen (n=7) wurde im Verlauf der Trächtigkeit eine Erhöhung der PAG-Konzentration nachgewiesen. Die durchschnittliche PAG-Konzentration ist in Abb. 13 dargestellt. Die Mittelwerte und Standardfehler der PAG-Konzentrationen im Blutplasma der Mutterschafe während der Trächtigkeit werden in Tab. 4 gezeigt. Der Tag der Ablammung wurde als Ausgangswert genommen und eine für die Herde typische Trächtigkeitsdauer von 149 Tagen angenommen.

Die durchschnittliche PAG-Konzentration im Blutplasma der 63 Mutterschafe (Abb. 13) zeigt in der 3. Trächtigkeitswoche einen Anstieg von 1.1 (SEM 0.1) auf 3.0 (SEM 0.3) ng/ml und erhöht sich in der 4. Woche weiter auf 11.5 ng/ml (SEM 0.8). Diese Erhöhung der Konzentration ist für eine mögliche Trächtigkeitsdiagnose von Bedeutung. Ein weiterer allmählicher Anstieg wurde zwischen 5. (17.3, SEM 0.8 ng/ml) und 10. Trächtigkeitswoche (26.9, SEM 1.5 ng/ml) gemessen. Von der 11. (22.9, SEM 1.2 ng/ml) bis zur 14. Trächtigkeitswoche (20.6, SEM 1.0 ng/ml) sank die durchschnittliche PAG-Konzentration leicht ab und blieb auf diesem Niveau. Ein erneuter Anstieg auf 28.4 (SEM 1.3) ng/ml in der 16. Woche bzw. 36.6 (SEM 2.0) ng/ml in der 19. Woche folgte. Ein drastischer Anstieg der PAG-Konzentration zeigte sich dann während der 20. und 21. Trächtigkeitswoche wo sie auf 56.0 (SEM 4.8) bzw. 89.2 (SEM 7.4) ng/ml anstieg ($P < 0.05$).

Die PAG-Konzentration fiel in der ersten Woche nach der Geburt steil auf 25.0 ng/ml ab, um 4 Wochen nach der Geburt bei allen Tieren auf Basalniveau (2.6 ng/ml) zu sinken. Die Ausnahme bildeten 5 Tiere der Rasse Schwarzköpfiges Fleischschaf, 3 mit Einlingen und 2 mit Zwillingen, sowie 2 Tiere der Rasse Rhönschaf mit einem Einling, bzw. einem Zwilling, bei denen die PAG-Werte weiterhin zwischen 4.2 und 9.9 ng/ml lagen.

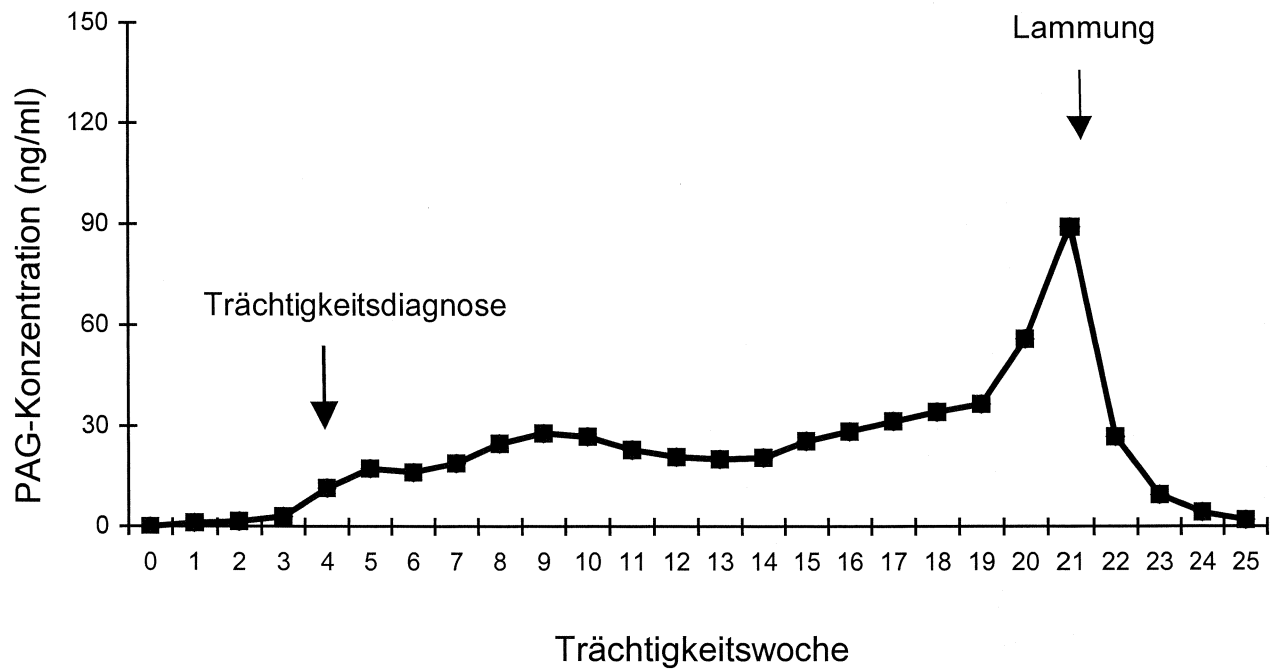


Abbildung 13: Durchschnittliche PAG-Konzentration im Blutplasma von 63 tragenden Mutterschafen im Verlauf der Trächtigkeit. Woche 0 ist die angenommene Woche der Bedeckung (149 Tage vor der Ablammung).

Tabelle 4: PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit und 4 Wochen nach der Geburt (pp).

Trächtigkeitswoche	PAG (ng/ml)		
	n	Mittel	SEM
1	50	1.1 ^{fgh}	0.1
2	62	1.6 ^{fgh}	0.2
3	63	3.0 ^{fgh}	0.3
4	63	11.5 ^{e fgh}	0.8
5	63	17.3 ^{defgh}	0.8
6	63	16.2 ^{defgh}	0.7
7	63	18.9 ^{defgh}	0.9
8	63	24.7 ^{defg}	1.2
9	63	27.9 ^{defg}	1.7
10	63	26.9 ^{defg}	1.5
11	63	22.9 ^{defg}	1.2
12	63	20.8 ^{defgh}	1.3
13	63	20.1 ^{defgh}	1.0
14	63	20.6 ^{defgh}	1.0
15	63	25.5 ^{defg}	1.3
16	63	28.4 ^{defg}	1.3
17	63	31.5 ^{cdef}	1.3
18	63	34.3 ^{cdef}	1.4
19	63	36.6 ^{cdef}	2.0
20	63	56.0 ^{cd}	4.8
21	63	89.2 ^b	7.4
1pp ^a	61	25.0 ^{defg}	2.1
2pp ^a	61	10.2 ^{e fgh}	0.5
3pp ^a	61	5.0 ^{fgh}	0.4
4pp ^a	61	2.6 ^{fgh}	0.2

^a Zwei Tiere sind nach der Geburt verendet.

^{b c d e f g h} Mittelwerte mit verschiedenen Indices sind voneinander verschieden (P<0.05, Scheffé-Test).

3.2.4. Abhängigkeit der PAG-Konzentration von der Wurfgröße

Von 66 Mutterschafen hatten 45 Einlinge, 18 Zwillinge und ein Tier Drillinge. Bei einem Mutterschaf mit Zwillingslämmern wurde eine abnorm hohe PAG-Konzentration während des gesamten Trächtigkeitsverlaufs nachgewiesen. Ein Schaf abortierte in der 15. Trächtigkeitswoche.

Die Anzahl der Lämmer hatte einen signifikanten Einfluss ($P < 0.05$) auf die PAG-Konzentration im Blutplasma der 45 einlings- (24.0, SEM 0.8) und der 18 zwillingstragenden Mütter (32.3, SEM 1.8) ng/ml.

Die PAG-Verläufe von einlings- und zwillingstragenden Müttern (Abb. 14, Tab. 5) unterschieden sich nicht grundsätzlich voneinander, doch war die Konzentration bei Zwillingsmüttern mit fortschreitender Trächtigkeit erhöht, ein Unterschied der vorübergehend in der 8. und 9., durchgehend dann ab der 12. Trächtigkeitswoche Signifikanzniveau erreichte ($P < 0.05$). Insbesondere am Ende der Trächtigkeit (20. und 21. Woche) war der PAG Anstieg bei zwillingstragenden Müttern deutlicher ausgeprägter als bei einlingstragenden (von 45.5 auf 98.9 bzw. von 82.2 auf 134.3 in der 20. bzw. 21. Woche) ($P < 0.01$).

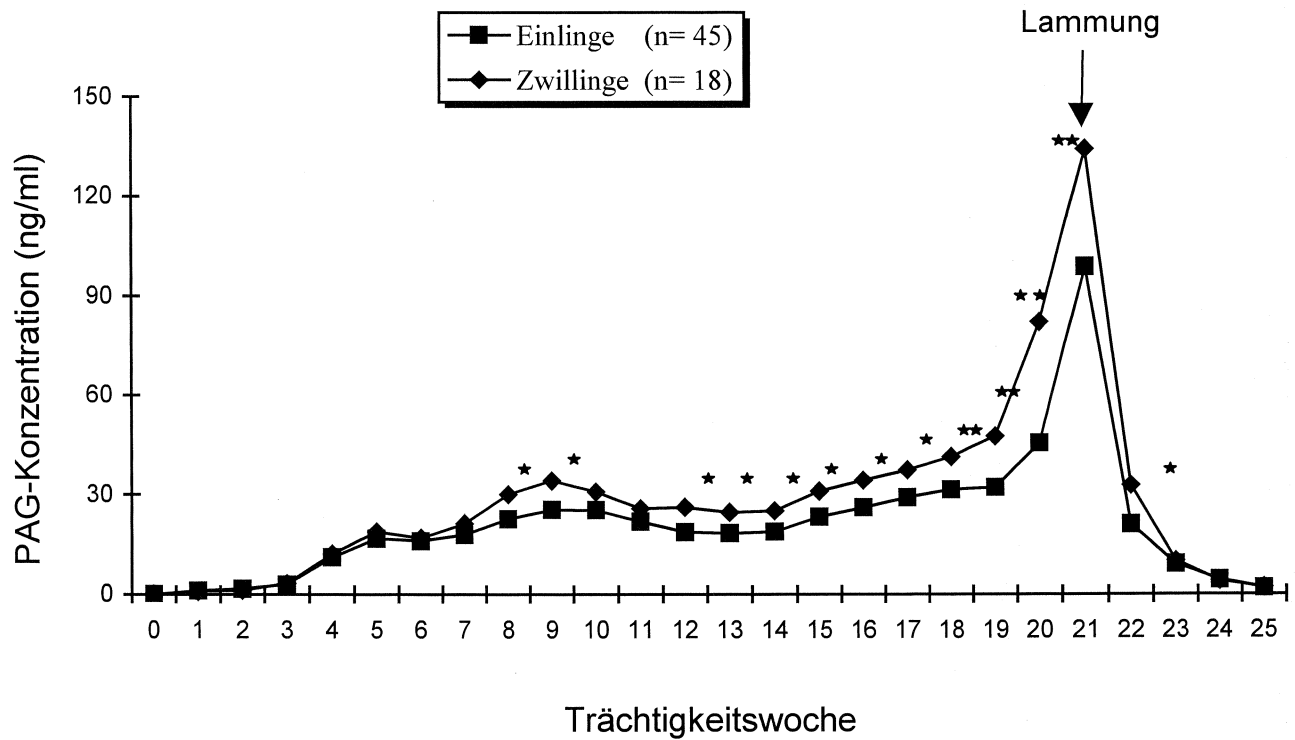


Abbildung 14: Durchschnittliche PAG-Konzentrationen im Blutplasma einlings- und zwillingstragender Müttern. Woche 0 stellt die angenommene Woche der Bedeckung dar (149 Tage vor der Ablammung). Sterne deuten auf signifikante Unterschiede zwischen Einlings- und Zwillingsmüttern (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Scheffé-Test).

Ein einziges Schaf (Schwarzköpfiges Fleischschaf) brachte drei (männliche) Lämmer mit Geburtsgewichten von 3.0, 3.0 und 2.0 kg zur Welt. Die PAG-Konzentration im Blutplasma erhöhte sich deutlich ab der 18. Trächtigkeitswoche (68.5 ng/ml) und kletterte in der 19., 20. und 21. Woche steil an bis auf 214.4 ng/ml. Vier Wochen nach der Geburt sank die PAG-Konzentration wieder auf 5.6 ng/ml ab (Abb. 15).

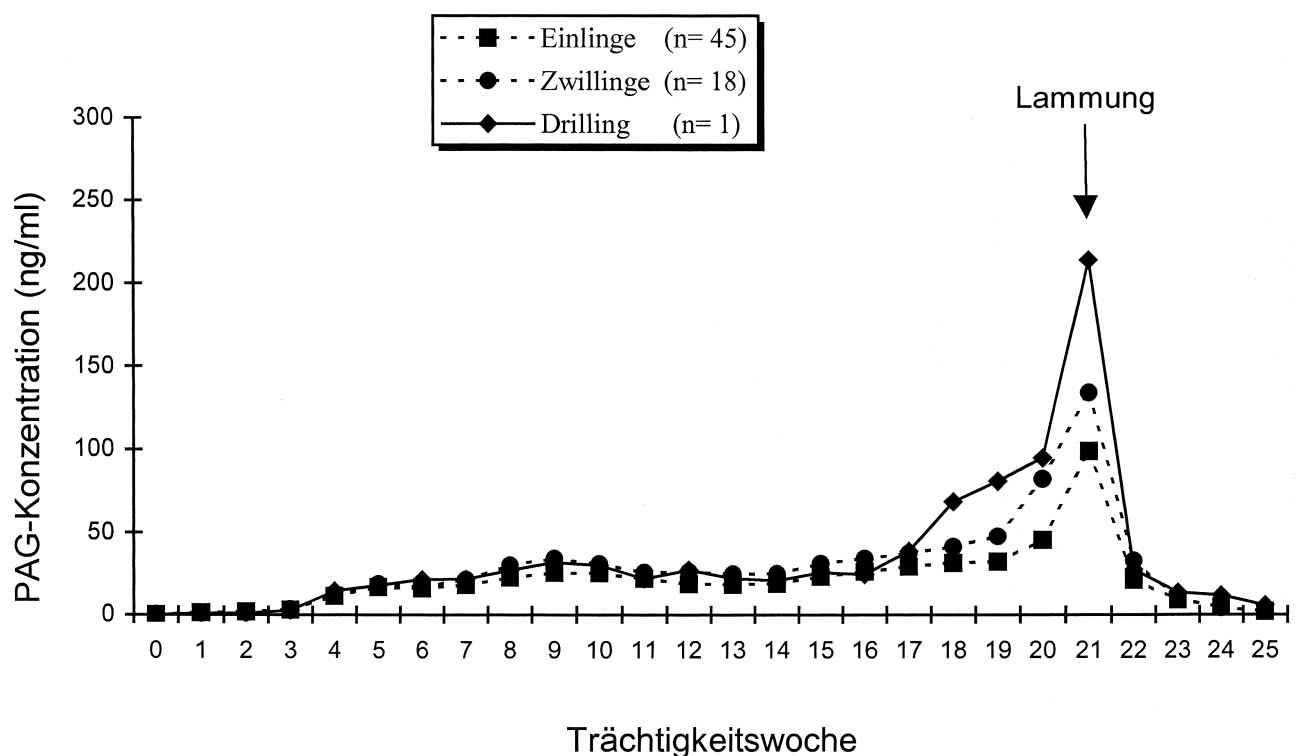


Abbildung 15: Durchschnittliche PAG-Konzentration im Blutplasma einlings-, zwillings- und einer drillingtragenden Mutter. Woche 0 stellt die angenommene Woche der Bedeckung dar (149 Tage vor der Ablammung).

Tabelle 5: Plasma-PAG-Konzentration während der Trächtigkeit und 4 Wochen nach der Geburt (pp) bei einlings- (n=45), zwillings- (n=18) und einem drillingstragenden (n=1) Mutterschafe.

Trächtigungswoche	Einlinge		Zwillinge		Drilling (n=1)
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	
1	1.2 ^{fgh}	0.1	1.0 ^{fg}	0.1	0.8
2	1.7 ^{fgh}	0.2	1.3 ^{fg}	0.1	0.8
3	2.9 ^{fgh}	0.3	3.3 ^{fg}	0.6	2.8
4	11.2 ^{efgh}	0.9	12.2 ^{defg}	1.6	14.5
5	16.7 ^{defgh}	0.9	18.7 ^{defg}	1.4	17.8
6	16.0 ^{defgh}	1.0	16.9 ^{defg}	0.8	21.4
7	17.9 ^{defgh}	1.2	21.3 ^{defg}	1.4	21.7
8	22.5 ^{A defg}	1.4	30.0 ^{defg}	2.2	26.9
9	25.4 ^{A defg}	1.9	34.2 ^{defg}	3.0	31.6
10	25.3 ^{defg}	1.8	30.8 ^{defg}	2.4	30.0
11	21.8 ^{defg}	1.5	25.7 ^{defg}	1.9	21.9
12	18.7 ^{A defgh}	1.4	26.2 ^{defg}	2.3	27.2
13	18.3 ^{A defgh}	1.1	24.6 ^{defg}	1.9	22.1
14	18.8 ^{A defgh}	1.0	25.0 ^{defg}	2.1	20.7
15	23.2 ^{A defg}	1.3	31.0 ^{defg}	2.7	25.7
16	26.1 ^{A defg}	1.4	34.2 ^{defg}	2.4	24.5
17	29.2 ^{A cdef}	1.4	37.4 ^{defg}	2.6	38.7
18	31.5 ^{B cdef}	1.7	41.4 ^{def}	2.1	68.5
19	32.2 ^{B cdef}	1.7	47.6 ^{cdef}	5.0	81.0
20	45.5 ^{B cd}	4.2	82.2 ^{cd}	11.2	94.9
21	98.9 ^{B b}	6.8	134.3 ^b	15.4	214.4
1pp ^a	22.0 ^{A defg}	1.6	31.4 ^{defg}	5.9	27.4
2pp ^a	9.9 ^{efgh}	0.7	11.0 ^{defg}	0.8	13.4
3pp ^a	5.1 ^{fgh}	0.5	4.8 ^{fg}	0.5	11.8
4pp ^a	2.5 ^{fgh}	0.3	2.7 ^{fg}	0.3	5.6

^a Zwei Tiere sind nach der Geburt gestorben.

^{bcdefgh} Werte mit verschiedenen Indices innerhalb Spalten unterscheiden sich ($P < 0.05$, Scheffé-Test).

^{AB} Signifikanter weniger als bei Zwillingen ($A = P < 0.05$; $B = P < 0.01$, Scheffé-Test).

Unter 66 tragenden Mutterschafen fiel eins durch extrem hohe PAG-Werte auf. Es handelte sich um ein Rhönschaf mit gemischtgeschlechtlichen Zwillingen. Die Lämmer waren vital mit einem Geburtsgewicht von 4.2 und 4.5 kg. In der 3. Trächtigungswoche stieg die PAG-Konzentration von 0 auf 10.6 ng/ml und erhöhte sich in der 4. Woche auf 35.6 ng/ml. Dieses Niveau hielt sich in der 5. und 6. Woche. Zwischen der 7. und 9. Trächtigungswoche stieg die PAG-Konzentration abermals über 76.8 und 110.6 ng/ml auf 161.0 ng/ml. Nach längerem Verharren auf diesem Niveau kletterte sie gegen Ende der Trächtigkeit, um die 21. Woche, steil auf 269.1 ng/ml. Innerhalb von 4 Wochen nach der Lammung sank die PAG-Konzentration wieder auf 7.6 ng/ml ab (Abb. 16).

Eine sehr geringe PAG-Konzentration wurde bei einem Schaf der Rasse Schwarzköpfiges Fleischschaf nachgewiesen, das in der 15. Trächtigungswoche einen weiblichen Fötus abortierte. Die Ursache des Aborts ist nicht bekannt. Bei diesem Tier stieg die PAG-Konzentration in der 3. Trächtigungswoche von 0.8 auf 8.0 ng/ml und erhöhte sich in der 4. Woche der Trächtigkeit auf 20.1 ng/ml. Zwischen der 5. und 14. Trächtigungswoche verharrte die PAG-Konzentration auf ca. 14.0 ng/ml. In der 15. Woche, dem Zeitpunkt des Aborts, wurden nur noch 5.0 ng/ml gemessen, was einer deutlichen Verringerung der PAG-Konzentration entsprach. Vier Wochen nach dem Abort fiel die PAG-Konzentration auf Basalniveau ab (0.8 ng/ml) (Abb. 16).

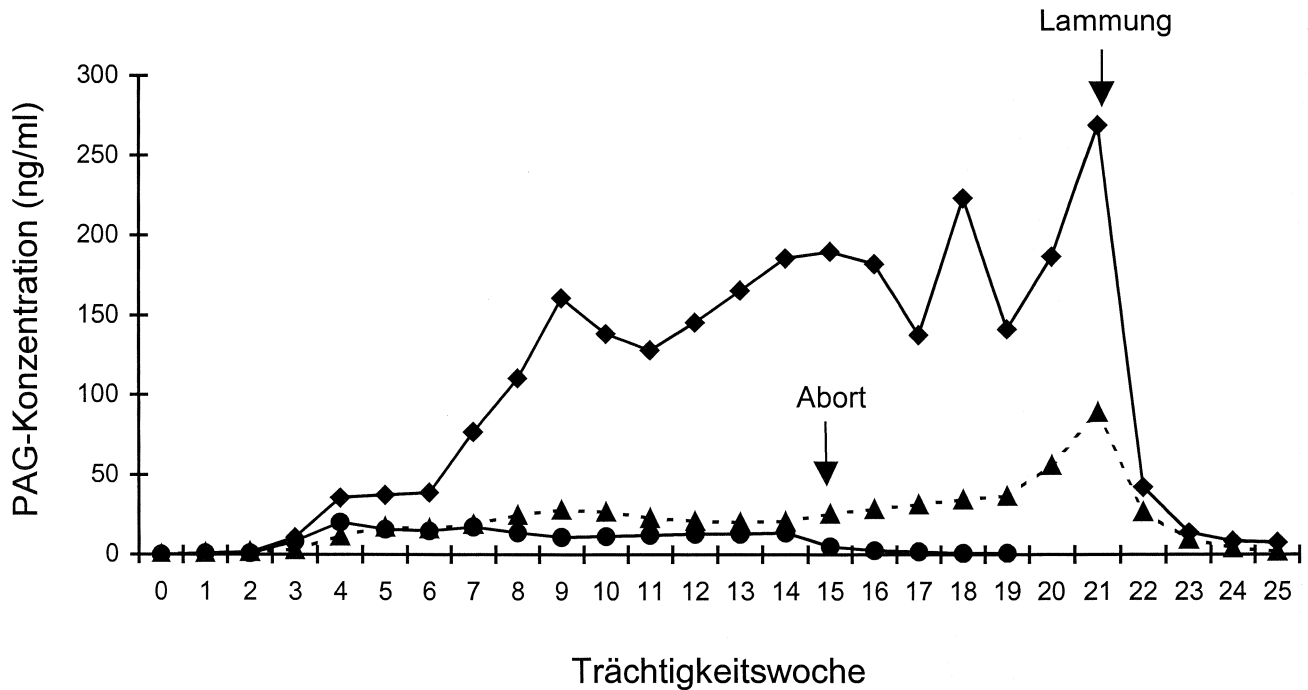


Abbildung 16: Durchschnittliche PAG-Konzentrationen im Blutplasma eines Mutterschafs, das in der 15. Woche der Trächtigkeit abortierte (●) sowie eines zwillingstragenden Mutterschafs mit ungewöhnlich hohen PAG-Konzentrationen (◆) im Vergleich zur durchschnittlichen PAG-Konzentration der restliche 63 tragenden Tiere (▲). Woche 0 stellt die angenommene Woche der Bedeckung dar (149 Tage vor der Ablammung).

3.2.5. Abhängigkeit der PAG-Konzentration von Geschlecht und Geburtsgewicht der Lämmer

Die Geschlechtsverteilung mit den durchschnittlichen Geburtsgewichten der Lämmer ist zusammen mit den PAG-Konzentrationen im Blutplasma der Mutterschafe über die gesamte Trächtigkeit in Tab. 6 und 7 dargestellt.

Tabelle 6: Geburtsgewicht und PAG-Konzentration während der Trächtigkeit bei einlingstragenden Müttern (n=45).

Geschlecht	n	Geburtsgewicht (kg)		PAG-Konzentration (ng/ml)	
		Mittel	SEM	Mittel	SEM
Weiblich	20	5.0 ^a	0.03	26.6 ^a	1.4
Männlich	25	4.9 ^a	0.02	22.7 ^a	0.9

^a Werte mit gleichen Indices in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant ($P > 0.05$; Scheffé-Test).

Tabelle 7: Geburtsgewicht, Geschlechterverteilung der Lämmer und PAG-Konzentration während der Trächtigkeit bei zwillingstragenden Müttern (n=36).

Geschlecht	n	Geburtsgewicht (kg)		PAG-Konzentration (ng/ml)	
		Mittel	SEM	Mittel	SEM
Weiblich+weiblich	8	4.1 ^a	0.3	32.1 ^a	2.9
Weiblich+männlich	20	4.3 ^a	0.1	33.6 ^a	2.5
Männlich+männlich	8	4.1 ^a	0.2	30.8 ^a	4.7

^a Werte mit gleichen Indices innerhalb einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant ($P > 0.05$; Scheffé-Test).

Das Geschlecht der Lämmer hatte bei den einlingstragenden Müttern keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittliche PAG-Konzentration (26.6 ng/ml bei weiblichen und 22.7 ng/ml bei männlichen Einlingen). Auch bei den zwillingstragenden Müttern spielte das Geschlecht der Lämmer keine Rolle (32.1 ng/ml, 30.8 ng/ml bzw. 33.6 ng/ml für weibliche, männliche bzw. heterosexuelle Zwillingswürfe).

Das Gewicht der Lämmer nach der Geburt betrug 4.9 (SEM 0.02) kg bei 25 männlichen und 5.0 (SEM 0.03) kg bei 20 weiblichen Tieren. Die Korrelation zwischen dem Gewicht der Lämmer und der PAG-Konzentration im Blutplasma während der Trächtigkeit betrug $r = 0.16$ bei Einlingen und $r = 0.05$ bei Zwillingen und war in keinen Fall signifikant ($P > 0.05$).

3.2.6. Abhängigkeit der PAG-Konzentrationen von der Rassezugehörigkeit der Muttertiere

Ein statistisch signifikanter Einfluss der genetischen Herkunft (Rasse) der Schafe auf den PAG-Gehalt im Blutplasma war nicht nachweisbar (27.1 (SEM 1.4), 27.3 (SEM 1.0) bzw. 22.2 (SEM 2.6) ng/ml bei Schwarzköpfigen Fleischschaf ($n=18$), Rhönschaf ($n=41$) bzw. Dorper-Kreuzungen ($n=7$)). Ebenso wenig wurde ein Einfluss des jeweiligen Deckbockes (27.7, 26.1 bzw. 25.3 ng/ml) nachgewiesen. Auch bei der Berechnung der PAG-Konzentrationen der mit den vier Böcken (1 Schwarzköpfiges Fleischschaf ($n=24$), 1 Wiltshire Horn ($n=7$), 2 Dorper ($n=9$)) gedeckten Rhönschafe war keine Differenz zu beobachten: 28.5 (SEM 1.3), 25.7 (SEM 2.0) und 26.6 (SEM 2.1) ng/ml. Das gleiche traf für einen Wiltshire Horn ($n=9$) und 2 Dorper Böcke ($n=9$) zu, die mit schwarzköpfigen Fleischschafen angepaart worden waren.

3.2.7. Abhängigkeit der PAG-Konzentration von der Wurfnummer

Unter den Mutterschafen waren sowohl Zutreter als auch Schafe, die bereits schon mehrmals abgelammt hatten. Bezogen auf die Anzahl der Ablammungen der einzelnen Mutterschafe konnten aber keine signifikante Unterschiede ermittelt werden. Die Mittelwerte der PAG-Konzentration für Zutreter und Schafe mit neun Ablammungen waren 26.5 (SEM 1.7) bzw. 28.5 (SEM 2.1) ng/ml (Tab. 8).

Tabelle 8: PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit in Abhängigkeit von der Anzahl der Ablammungen der Mütter (n=63).

Geburtsnummer	n	PAG-Konzentration (ng/ml)	
		Mittel	SEM
1	11	26.5	1.7
2	20	26.8	1.5
3	4	25.9	2.3
4	6	24.4	2.2
5	13	28.0	1.8
6	0	-	-
7	0	-	-
8	2	20.0	2.1
9	7	28.5	2.1

Die Unterschiede sind nicht signifikant ($P > 0.05$; Scheffé-Test).

3.3. Diskussion

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren, die Bestimmung der Plasmakonzentration des pregnancy-associated glycoproteins (PAG) bei verschiedenen Schafrassen während der Trächtigkeit und nach der Geburt und deren Nutzung zur Trächtigkeitsdiagnose.

Der im Rahmen dieser Untersuchung ermittelte PAG-Verlauf während der Trächtigkeit wich von den Ergebnissen vergleichbarer Untersuchungen an Schafen, Ziegen und Rindern ab. Die durchschnittliche PAG-Konzentration im Blutplasma stieg zwischen der 3. und 4. Woche der Trächtigkeit an, stieg erneut bis zur 9. Trächtigungswoche und erhöhte sich nach einem längeren Verharren auf diesem Niveau, bis zu ihrem Maximum gegen Ende der Trächtigkeit. Die maximale PAG-Konzentration im Blutplasma wurde sowohl bei einlings- als auch mehrlingstragenden Müttern in der letzten Woche vor der Ablammung erreicht. Ranilla et al. (1994, 1997) ermittelten bei tragenden Churra, Merino und Assaf Schafen eine weit höhere PAG-Konzentration und andersgeartete Verläufe. In den ersten Trächtigungswochen herrschte Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen. Danach gab es etwa in der Mitte der Trächtigkeit einen vorübergehenden drastischen Abfall der Konzentration nahezu auf Basalniveau, gefolgt von einem Anstieg bis zum Ende der Trächtigkeit. Gajewski et al. (1999) beobachteten bei einlingstragenden Berrichonschafen (n=42) einen ähnlichen Verlauf der PAG-Konzentration wie in der vorhandenen Untersuchung, jedoch glichen die Ergebnisse von 9 zwillingstragenden Müttern den bei Ranilla beschriebenen.

Da sich die Frage stellt, ob die unterschiedlichen Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungen durch die verschiedenen Rassen erklärt werden können, wurden in der vorliegenden Untersuchung mehrere Rassen einbezogen, sowohl mütterlicher- wie auch väterlicherseits. Das Schwarzköpfige Fleischschaf ist ein schweres, in Deutschland weit verbreitetes Fleischschaf mit genetischer Verwandtschaft zum britischen Oxford und Hampshire. Das Rhönschaf ist eine leichte (50 kg) regionale Landrasse aus der Rhön im nordöstlichen Hessen. Dorperschafe wurden vor wenigen Jahren aus Südafrika importiert und gehen auf ein Kreuzungszuchtprogramm zwischen Somalischaf („Blackhead Persian“), einen mit einem Fettsteiss ausgestatteten Haarschaf, welches ursprünglich aus Somalia stammt, und dem britischen Dorset Horn. Das Wiltshire Horn ist eine britische Rasse mit einem sehr kurzen haarähnlichem Vlies und ungeklärter genetischer Herkunft. Trotz dieser genetischen Verschiedenartigkeit verlief die Plasma-PAG-Konzentration einheitlich.

Es wurde kein Effekt der Wurfgrösse auf den allgemeinen PAG-Verlauf festgestellt, doch das ab 12. Trächtigkeitswoche erreichte Niveau war bei zwillingstragenden Müttern höher. Ein ähnlicher Effekt der Wurfgrösse wurde bei Schaf (Gajewski et al., 1999), Ziege (Sousa et al., 1999; Fernández-Arias et al., 1999; González et al., 2000) und Rind (Patel et al., 1997) beobachtet, wurde jedoch von Ranilla et al. (1997) nicht bestätigt. Das Vorhandensein einer Korrelation zwischen der Anzahl Feten und der Plasma-PAG-Konzentration erscheint plausibel, bedingen mehr Feten doch mehr plazentales Gewebe. In der Plazenta von Wiederkäuern besteht 15-20% des Trophoblasten-Epithels aus granulierten binukleären Zellen. Diese Zellen migrieren vom Trophektoderm zur maternalen Seite der Plazenta um feto-maternales Hybridgewebe zu bilden, das von der Implantation bis zum Ende der Trächtigkeit besteht (Wooding et al., 1986). Es wird angenommen, dass diese grossen binukleären Zellen für die Synthese von PAG verantwortlich sind (Zoli et al., 1992a).

Während in der vorliegenden Arbeit, das Geschlecht der Feten keinen signifikanten Effekt auf die Plasma-PAG-Konzentration ausübte, beobachteten Ranilla et al. (1994) ein etwas höheres PAG-Niveau bei 9 Schafen, die männliche Lämmer trugen gegenüber 6 Schafen, die weibliche Lämmer trugen. Bei Hereford Kühen wurden höhere PAG-Konzentrationen beobachtet, wenn sie weibliche Kälber trugen, während bei Holstein Kühen das Gegenteil der Fall war (Zoli et al., 1992b). Der in der vorliegenden Untersuchung fehlende Effekt des Gewichts der Neugeborenen auf die Plasma-PAG-Konzentration bestätigt Beobachtungen an Assafschafen von Ranilla et al. (1997).

Die Geschwindigkeit des postpartalen Abfalls der Plasma-PAG-Konzentration auf Basalniveau kann für die Anwendung des PAG-Tests zur Trächtigkeitsdiagnose relevant sein. Bei Kühen mit extrem langsamem Konzentrationsabfall, der sich bis über den 100. Tag nach der Geburt hinzieht (Zoli et al., 1992b), kann es nach frühzeitiger Belegung zu Fehldiagnosen kommen. Angesichts der Befunde von Ranilla et al. (1994, 1997) und Gajewski et al. (1999) beim Schaf sowie Sousa et al. (1999), Fernández-Arias et al. (1999), Zarrouk et al. (1999) und González et al. (2000) an der Ziege dürfte dies beim kleinen Wiederkäuer kein Problem darstellen. In der vorliegenden Untersuchung hatte die PAG-Konzentrationen bei nur 7 von 63 Mutterschafen 4 Wochen nach der Geburt noch nicht wieder basales Niveau erreicht. Hier lagen die Konzentrationen zwischen 4 und 9 ng/ml. Das stimmt mit Beobachtungen von Ranilla et al. (1994) an Merino- und Churramutterschafen überein. Da Mutterschafe normalerweise erst nach Absetzen der Lämmer dem Bock zugeführt werden, wirkt sich ein

verzögerter Rückgang der PAG-Konzentration nicht nachteilig auf die Trächtigkeitsdiagnose aus.

Bei einem Tier, das einen Abort hatte, waren die Plasma-PAG-Konzentrationen mit 12 bis 14 ng/ml etwas niedriger als normal. In der Probe, die am Tag nach dem Abort genommen wurde, war die Konzentration mit 5 ng/ml bereits gering und fiel in den folgenden Wochen über 2.4 und 1.6 auf 0.8 ng/ml ab. Die entsprechenden Progesteronkonzentrationen bewegten sich während der 4 Wochen vor dem Abort zwischen 11 und 19 ng/ml und waren einen Tag noch dem Abort auf 3.6 ng/ml gefallen. Es lässt sich daher nicht ableiten, ob die Ursache für den Trächtigkeitsabbruch in der Rückbildung des Corpus luteum oder um Absterben des Fetus bestand. Die übermässig hohen PAG-Konzentrationen die bei einem der Tiere gemessen wurden, waren nicht von klinischen Symptomen begleitet, so dass über eine mögliche Ursache nur gemutmasst werden kann.

Im Vergleich zu den Plasma-PAG-Konzentrationen, die in der vorliegenden Untersuchung gemessen wurden, lagen die von Ranilla et al. (1994, 1997) und Gajewski et al. (1999) bei Schafen und von Sousa et al. (1999), Fernández-Arias et al. (1999) und Zarrouk et al. (1999) bei Ziegen und von Zoli et al. (1992b) und Patel et al. (1997) bei Rindern beobachteten fast um das Zehnfache höher. Diese Autoren benutzten ein RIA-System, das auf homologen Antiseren basiert und durch Zoli et al. (1990) nach der Immunisierung von Kaninchen mit einer Mischung der möglichen Antigene mit Molekulargewichten von 43 bis 67 kDa erstellt worden waren (Zoli et al., 1995). In der vorliegenden Untersuchung wurde anti-caPAG mit Molekulargewichten von 55 und 59 kDa als Antiserum benutzt. Die Unterschiede der gemessenen PAG-Konzentrationen und Verläufe zwischen verschiedenen Untersuchungen dürften aus diesem Umstand herrühren. Trotz der relativ niedrigen Werte dürfte das in dieser Untersuchung verwendete System auf Grund seiner von Rasse, Wurfnummer, Gewicht der Mütter sowie Gewicht und Geschlecht der Lämmer unbeeinflussten Konstanz besondere Eignung haben, auch zu vergleichenden Studien unter verschiedenen Bedingungen herangezogen zu werden.

Ein homologes RIA-System für ein ovines PAG ist noch nicht verfügbar, daher ist nicht näher zu definieren, welches PAG-Molekül durch Antikörper eines bestimmten System erfasst wird. Molekularbiologische Studien zeigten, dass es eine Anzahl von Genen gibt, die für unterschiedliche ovine PAG-Moleküle kodieren. Es wurden 9 DNAs für PAG sequenziert (Xie et al., 1997). Die Expression dieser Gene kann entsprechend des jeweiligen Trächtigkeitsstadiums veränderlich sein (Green et al., 2000).

Die im Blutplasma gemessene PAG-Konzentration wird bereits bei Ziege (Sousa et al., 1999; González et al., 1999, 2001), Schaf (Benítez-Ortiz, 1992; Karen et al., 2002) und Rind zum Trächtigkeitsnachweis verwendet (Zoli et al., 1992b; Perényi et al., 2002). Durch die Bestimmung im Blut konnte ab dem 21. Tag, in der Milch ab dem 32. Tag nach der Bedeckung eine Trächtigkeit nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Progesteron gestattet das PAG den direkten Nachweis des Vorhandenseins lebender Feten. In der vorliegenden Untersuchung konnte ab der 12. Trächtigkeitswoche sogar zwischen Einlings- und Zwillingsträchtigkeiten unterschieden werden. Da gegenwärtig in Europa nur ein einziges Labor den PAG-Nachweis führen kann, wäre eine Etablierung des Tests in anderen Labors wünschenswert.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass das auf einem caprinen Antikörper basierende RIA-System, das in dieser Untersuchung zur Anwendung kam, ab der vierten Trächtigkeitswoche ein zuverlässiges Mittel zur Trächtigkeitsfeststellung bei Schafen darstellt. In 64 von 66 (97%) trächtigen Mutterschafen hatte die PAG-Konzentration zu diesem Zeitpunkt des Niveau nicht trächtigen Mutterschafe um fünf Standardabweichungen übertroffen. Neben der Trächtigkeitsdiagnose könnte der PAG-Test auch dem Studium physiologischer oder pathologischer Einflüsse, wie Ernährungsstatus oder ansteckende oder parasitäre Krankheiten, die sich anhand von Abweichungen in der Plasma PAG-Konzentration nachweisen lassen, dienen. Da ein wirklich praxisgerechtes Verfahren zur frühen Trächtigkeitsfeststellung beim Schaf noch nicht existiert, könnte der PAG-Test ab 4 Wochen nach Belegung einen wertvollen Beitrag zu einem effizienten Fruchtbarkeitsmanagement in der Schafhaltung leisten, vorausgesetzt Aufwand und Kosten der Untersuchung halten sich in Grenzen.

4. Bestimmung von Gesamtöstrogenen in Blut, Harn und Kot von Ziegen als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsfeststellung

4.1. Material und Methoden

4.1.1. Versuchstiere und ihre Haltung

Als Versuchstiere standen 22 trächtige Burenziegen im Alter von ein bis fünf Jahren, zwischen der ersten und sechste Lammung mit einem Gewicht von 40.5 bis 81.0 kg, der Herde des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung. Die Ziegen wurden in Gruppen von etwa 30 Tieren in einem 7.5 qm großen Offenstall mit Stroheinstreu und einem ca. 26 qm großen betonierten Auslauf gehalten und hatten täglich 1-2 Stunden Weidegang. Etwa 2 Wochen vor dem erwarteten Geburtstermin wurden die Tiere in stroheingestreute Ablammboxen in einem geschlossenes Gebäude umgestallt, wo sie bis ca. eine Woche nach der Geburt blieben. Gefüttert wurden pro Tier und Tag 500 g pelletiertes Kraftfutter für Schafe (17% Rohprotein, 3.2% Rohfett, 13.3% Rohfaser, 6.1% Rohasche, 0.7% Calcium, 0.4% Phosphor, 0.2% Natrium, 0.2% Magnesium, Zusatzstoffe je kg: 1000 IE Vitamin A, 1250 IE Vitamin D3, 200 mg Zink, 20 mg Vitamin E, 1 mg Jod und 0.4 mg Selen). Zusätzlich erhielten die Tiere Stroh (ca. 2 kg), Wasser und Lecksalz *ad libitum*.

Die Trächtigkeit wurde 30 Tage nach dem Decken durch eine Ultraschalluntersuchung mit Hilfe einer Rektalsonde (7.5 MHz Linear-Schallkopf, Echtzeit-Scanner, Aloka SSD-500) festgestellt. Zwischen 110. und 130. Tag nach der Besamung wurde den Tieren an einem Tag eine Kot-, eine Harn- und eine Blutprobe entnommen. Unmittelbar nach der Geburt wurden Anzahl, Gewicht und Geschlecht der Lämmer erfasst.

4.1.2. Kotentnahme

Die Gewinnung der Kotproben erfolgte zwischen 7⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr. Etwa 120 g Kot wurden, sofern nicht spontan abgesetzt, mit 2 Fingern einer plastikbehandschuhten, mit Wasser angefeuchteten Hand direkt aus dem Rektum entnommen. Der Kot wurde unmittelbar danach in Portionen von etwa 5 g (etwa 5 Kotbällchen) aufgeteilt. Die Proben wurden in offenen

Petrischalen für 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 oder 192 h bei -20°C (Gefrierschrank), 4°C (Kühlschrank), 20°C (Raumtemperatur) oder 40°C (Ofen mit Frischluftzufuhr) aufbewahrt. Anschliessend wurden sie bis zur Untersuchung in kleinen verschweißten Plastikbeutel bei -20°C tiefgefroren.

4.1.3. Harngewinnung

Nach Reinigung der Labien wurde Harn, sofern nicht spontan abgesetzt, mittels eines Plastikbeutels, der um das äussere Genitale mit Klebeband befestigt war, aufgefangen. Gelingt dies nicht, so wurde über einen sterilen Plastikkatheter (äusserer Durchmesser: 4 mm), der unter digitaler Kontrolle in die Harnröhre eingeführt wurde, Harn aus der Harnblase entnommen. Gewonnener Harn wurde in einer Menge von etwa 50 ml in Szintillationsfläschen aus Plastik bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

4.1.4. Blutentnahme

Die Entnahme von ca. 10 ml Blut erfolgte zwischen 7⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr am gleichen Tag wie die Kot- und Harnentnahme. Nach Reinigung und Desinfektion der Haut mit einem mit 70%igem Alkohol getränkten Wattebausch wurde die Vena jugularis mit einer auf einer Spritze aufgesetzten Kanüle (22 G) punktiert. Das Blut wurde in Glasröhrchen für 16 Stunden bei 4°C stehen gelassen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei $1050 \times g$ und 4°C wurde das Serum in drei verschliessbare 1.5 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) pipettiert und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert.

4.1.5. Gesamtöstrogenbestimmung: Enzymimmunoassay (EIA)

4.1.5.1. Prinzip der „kompetitiven Doppelantikörpertechnik“

Die quantitative Bestimmung unkonjugierter Gesamtöstrogene in Kot, Harn und Serum wurde mit Hilfe eines Enzymimmunoassays (EIA) mit kompetitiver Doppelantikörpertechnik bei gleichzeitiger Inkubation mit dem zweiten Antikörper analysiert. Das Prinzip des Gesamtöstrogen-Enzymimmunoassays ist in Abb. 17 schematisch dargestellt. Zuerst wird die Oberfläche der Mikrotiterplatten mit Schaf-anti-Kaninchen IgG (erster Antikörper)

beschichtet. Anschliessend wird die Probe (mit unbekannter Menge an Östrogenen) und das mit Meerrettichperoxidase markierte Hormon (Tracer) in die Vertiefungen pipettiert. Darauf erfolgt die rasche Zugabe des hormonspezifischen Antikörpers (zweiter Antikörper). Der hormonspezifische Antikörper wird innerhalb weniger als 1 Minute in die 96 Vertiefungen dispensiert, um somit die Immunreaktionen bei allen Proben nahezu gleichzeitig zu starten. Während der folgenden Inkubation (über Nacht) kommt es zur kompetitiven Antikörperbindung des markierten und freien Hormons und gleichzeitig zur immunologischen Bindung des hormonspezifischen IgG an den Beschichtungsantikörper. Ungebundene überschüssige Antigenmoleküle und enzym-markiertes Hormon werden anschließend mit geeigneten Waschschritten entfernt. Die Aktivität des gebundenen Tracers ist somit umgekehrt proportional zur Hormon-Konzentration in der Probe und kann quantitativ photometrisch am Umsatz eines chromogenen Substrates (Tetramethylbenzidine, TMB) gemessen werden (Meyer, 1989, 1992).

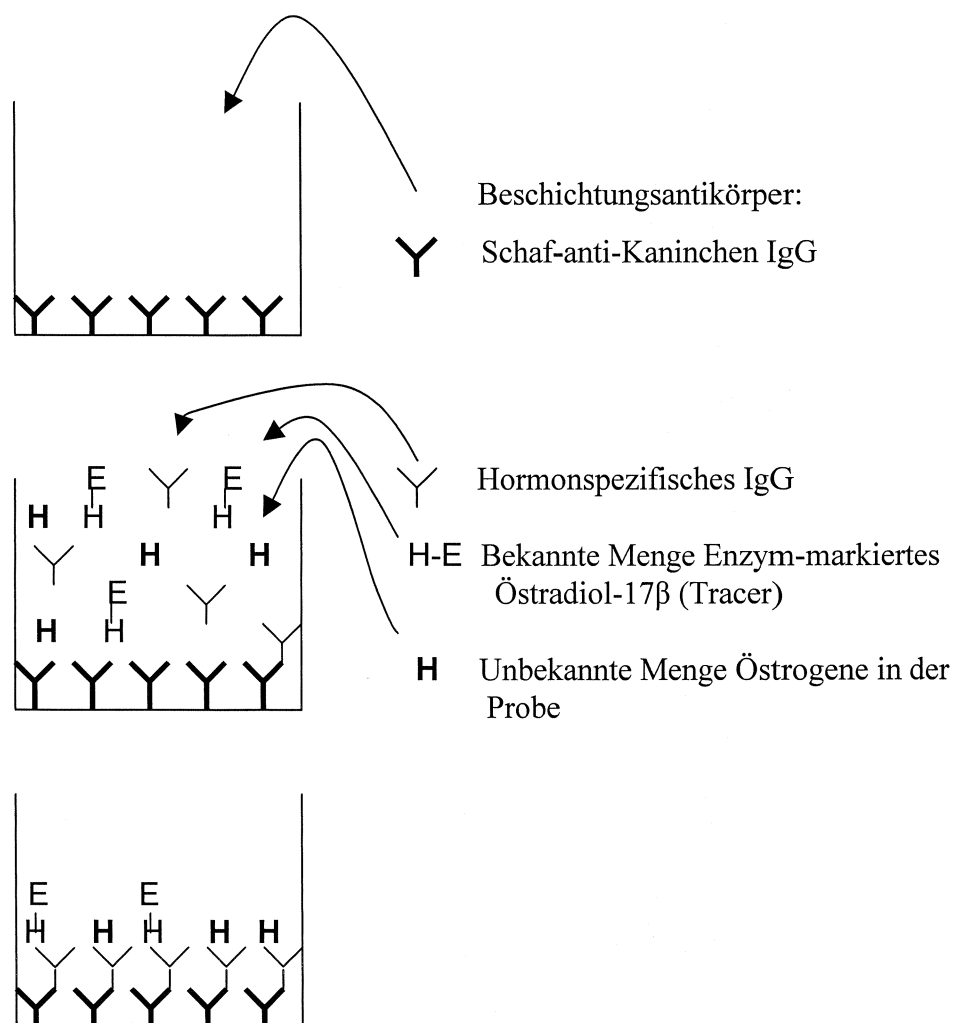


Abbildung 17: Prinzip des Doppelantikörpertechnik-EIAs.

4.1.6. Geräte und Chemikalien

Die Geräte und Materialien werden im Anhang (8.2, Tab. B) dargestellt.

4.1.6.1. Chemikalien und Lösungen

Vor der Verwendung wurden alle Glaswaren nach dem Spülen mit Neodisher NT (alkalischer Reiniger) und Neodisher Z (Neutralisator mit saurer Reinigung) in dem Laborspüler (Miele) und dreimaligem Nachspülen mit destilliertem Wasser, getrocknet und mindestens 1h bei 200°C sterilisiert.

Acetat-Puffer: (0.05 M; pH 4.8)

6.804 g Natriumacetat-Trihydrat (Merck 1.06267, Eurolab, Hannover) wurden in 1000 ml bi-distilliertem Wasser (NANOpure II, Krannich, Göttingen) gelöst. Der pH-Wert von 4.8 wurde mit Eisessig (Merck 1.00063) eingestellt.

Acetat-Puffer: (0.5 M; pH 4.8)

68.04 g Natriumacetat-Trihydrat (Merck 1.06267) wurden in 1000 ml bi-distilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert von 4.8 wurde mit Eisessig eingestellt.

Die Acetat-Puffer wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Schaf-anti-Kaninchen-IgG:

Die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG erfolgte durch Immunisierung von Schafen (Möller, 1991).

Assay-Puffer:

7.12 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 1.06580) und 8.5 g NaCl (S-9625 Sigma, Steinheim) wurden zu 1000 ml bi-distilliertes Wasser gegeben und gelöst. Der pH-Wert von 7.2 wurde mit 5 M HCl (Merck 1.00317) eingestellt. Danach wurde 1.0 g Rinderserumalbumin Fraktion V pH 7.0 (BSA; 11930 Serva, Heidelberg; entspricht 0.1% BSA) darin gelöst. Der Assay-Puffer sollte bei 8°C aufbewahrt werden.

Coating-Puffer:

4.29 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck 1.06391) und NaHCO_3 (Sigma S-8875) wurden in 1000 ml bi-distilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert von 9.6 mit 1 M HCl eingestellt. Der Puffer sollte sofort zum Beschichten der Platten benutzt werden.

Enzym-Hormon-Konjugat und Antiserum:

Das Enzym-Hormon-Konjugat und das Antiserum (Tab. 9) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. H. D. Meyer, Institut für Physiologie, Technische Universität München bereitgestellt.

Das Enzym-Hormon-Konjugat [Normal-Konzentration 1:120; 1,3,5,(10)-Östratrien-3,17 β diol-17HS-HRP] bzw. Antiserum [Normal-Konzentration 1:4000; 1,3,5,(10)-Östratrien-3,17 β -diol-17-BSA Code E2/3] gegen unkonjugierte Gesamtöstrogene wurde in 1 ml-Portionen in Kryoröhrchen im Kühlschrank bei 6 bis 8°C aufbewahrt. Das Hormon wurde mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) markiert.

Tabelle 9: Die Kreuzreaktionen des Gesamtöstrogen-EIA sind wie folgt (Meyer et al., 1997).

Hormon	Kreuzreaktion (%)
Östradiol-17 β	100.0
Östron	100.0
Östradiol-17 α	66.0
Ethinylöstradiol	14.0
Östriol	1.5
und für Östradiol-3-benzoate, 19-Nortestosteron, Progesteron, Testosteron, Zeranol und Diethylstilböstrol	<0.1

Extraktionslösung:

Zur Extraktion der Steroide wurden 30 ml Butylmethylether (Merck 1.01849) und 70 ml Petrolether (Baker 8115, Vertreiber Schütt) gemischt.

Helix pomatia: (β -Glucuronidase/Arylsulfatase; Merck 1.04114)

Hydrolyse-Lösung 1: (für Harnproben)

Hierzu wurden 4 μ l Helix pomatia in 1 ml **Acetat-Puffer 0.05 M** gegeben, leicht geschüttelt und gleich in die Szintillations-Flaschen (aus Glas, 20 ml) zu den Proben pipettiert.

Hydrolyse-Lösung 2: (für Serum-, Kot- und Kontrollproben)

Hierbei wurden 4 μ l Helix pomatia in 1 ml **Acetat-Puffer 0.5 M** gegeben, leicht geschüttelt und gleich in die Szintillations-Flaschen (aus Glas, 20 ml) zu den Proben pipettiert.

Meerrettichperoxidase: (Boehringer, Ingelheim)

Methanol reinst: (Fluka 65543 oder Baker 8045)

Methanol 80%:

800 ml reines Methanol und 200 ml bi-distilliertes Wasser wurden gemischt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Methanol 40%:

400 ml reines Methanol und 600 ml bi-distilliertes Wasser wurden gemischt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2 M H₂SO₄:

100 ml 95-98%ige H₂SO₄ (Merck 1.00713) wurden mit 800 ml bi-distilliertem Wasser verdünnt.

54 mM Fe(III)-NH₄(SO₄)₂-Lösung in 1 M Phosphorsäure:

26.04 g Fe(III)-NH₄(SO₄)₂ (Sigma F-3629) wurden in 1000 ml Phosphorsäure 1 M [19.41 ml H₃PO₄ (Sigma P-6560) in 980.59 ml bi-distilliertem Wasser] gelöst und bei 6 bis 8°C im Kühlschrank aufbewahrt.

20 mM Tris-Puffer mit 20% Methanol:

100 ml der 200 mM Stammlösung [24.2 g Tris; Sigma T-1503 in 1000 ml bi-distilliertem Wasser und mit 5 M HCl auf pH 8.5 eingestellt], 700 ml Reinstwasser und 200 ml reines Methanol (Fluka 65543) wurden gemischt und bei 6-8°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Natriumhydroxidlösung (NaOH, 1 M; Merck 1.09137)

Östradiol-17β: (Sigma E-8875)

Substratlösung A:

1.0 g Wasserstoffperoxid-Harnstoff (Merck 8.18356), 18.0 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Merck 1.06580) und 10.3 g Zitronensäure x 1 H₂O (Merck 1.00244) wurden in 1000 ml bi-distilliertem Wasser gelöst. Danach wurden 100 µl Kathon[®] CG (Rohm und Haas 62369, UK) zugegeben, das einen pH Wert von 5.0 ergibt (musste nicht eingestellt werden).

Substratlösung B:

Bereits bei der Herstellung muss diese Lösung vor Licht geschützt werden. 500 mg Tetramethylbenzidin (TMB; Serva 35926) als Chromogen und 40 ml Di-Methyl Sulfoxide (DMSO; Sigma D-5879) wurden zusammen in einer braunen Flasche mit einem Magnetrührkern ca. 5 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 960 ml bi-distilliertem Wasser und 10.3 g Zitronensäure · 1 H₂O wurde weiter gerührt bis alles gelöst war. Es ergab sich ein pH-Wert von 2.4 (musste nicht eingestellt werden). Die Substratlösungen konnten 2 Monate im Dunkeln bei 8°C aufbewahrt werden.

Waschlösung für Mikrotiterplatten: (0.05%iger Tween-80-Lösung)

0.5 g Tween-80 (Polyoxyethylenorbitanmonooleat; Merck 8.22187) wurden zu 1000 ml bi-distilliertem Wasser gegeben, gut gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

4.1.7. Testvorbereitung

Die Etablierung des Enzymimmunoassays zur Bestimmung von unkonjugierten Gesamtöstrogenen in Kot, Harn und Serum basiert auf Meyer und Hoffmann (1987), Meyer et al. (1997) und Schiffer et al. (2001) mit einigen laborspezifischen Abänderungen.

4.1.7.1. Beschichtung der Mikrotiterplatten mit IgG

Als erste Schritt des EIAs mit Doppelantikörpertechnik beinhaltet die Beschichtung der Mikrotiterplatten. Der erste Antikörper (Schaf-anti-Kaninchen IgG) wurde mit Coating-Puffer auf 1 µg IgG/100 µl (pro Platte 10 ml) verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden jeweils in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert (dabei Sprechen, Niesen etc. unbedingt vermeiden !) und 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 5°C auf einem Schüttler inkubiert.

4.1.7.2. Zweite Beschichtung mit bovinem Serumalbumin (BSA)

Nach der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch ausgeklopft, 250 ml Assay-Puffer in jede Vertiefung pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

4.1.7.3. Lagerung der Mikrotiterplatte

Die Platten wurden abermals ausgeklopft und bis zur Verwendung einzeln in Plastikhüllen verschweisst im Dunkeln bei -20°C (6 Monate lagerfähig) oder im Kühlschrank (für baldigen Gebrauch) aufbewahrt.

4.1.7.4. Qualitätssicherung

Jeweils eine Mikrotiterplatte jeder neu angesetzten Charge wurde in einem Enzymimmunoassay gegen Platten früherer Chargen getestet, um die Qualität der Testergebnisse sicher zustellen.

4.1.8. Durchführung des Tests

4.1.8.1. Herstellung der Standardkurve

Aus Östradiol-17 β und reinem Methanol wurde eine Stammlösung von 10 mg/10 ml Methanol (SL1) hergestellt. Durch weitere Verdünnung mit Methanol (1:1000 bzw. 10 μ l SL1 + 9990 μ l reines Methanol) wurde eine Arbeitslösung von 1 μ g/ml Methanol erhalten (SL2). Aus der SL2 wurde nochmals eine Verdünnung (1:400 bzw. 20 μ l SL2 + 7980 μ l 40% Methanol) hergestellt, um eine Arbeitslösung von 2500 pg/ml [50 pg/20 μ l (SL3)] zu erhalten. Aus SL3 wurden zwölf Standardproben (E0 bis E11) in den Konzentrationen 0.0 (E0), 0.049 (E1), 0.098 (E2), 0.20 (E3), 0.39 (E4), 0.78 (E5), 1.56 (E6), 3.13 (E7), 6.25 (E8), 12.5 (E9), 25 (E10) und 50 pg/20 μ l (E11) hergestellt. Die Standardlösungen wurden so in 40% Methanol verdünnt, dass eine Kalibrierkurve resultierte, auf der sich die Konzentrationen aufeinanderfolgender Punkte jeweils um den Faktor 0.5 unterschieden (Tab. 10). Die Lösungen für jeden weiteren Kalibrierpunkt wurden jeweils aus dem vorherigen durch Verdünnung 1:2 mit 40% Methanol erhalten. Das Gemisch wurde jeweils mindestens 3 Minuten geschüttelt, bevor der nächste Verdünnungsschritt daraus erfolgte. Die Standardproben wurden zu jeweils 1000 μ l in Eppendorfgefäße pipettiert und bis zum Testeinsatz bei -80°C tiefgefroren.

Die zwölf Standardproben (E0 bis E11) und die Kontrollproben (K1, K2 und K3 siehe 4.1.8.2) sollten zwischen den Immunassay-Tests im Kühlschrank bei 6 bis 8°C aufbewahrt werden.

Tabelle 10: Herstellung der Standardlösungen aus SL3 (50 pg/20 µl 40% Methanol).

Standard-Lösung	Konzentration (pg in 20 µl)	Herstellung	Verdünnung zu SL3
E 11	50	500 µl SL3	
E 10	25	500 µl Standard 11 + 500 µl 40% Methanol	1:2
E 9	12.5	500 µl Standard 10 + 500 µl 40% Methanol	1:4
E 8	6.25	500 µl Standard 9 + 500 µl 40% Methanol	1:8
E 7	3.13	500 µl Standard 8 + 500 µl 40% Methanol	1:16
E 6	1.56	500 µl Standard 7 + 500 µl 40% Methanol	1:32
E 5	0.78	500 µl Standard 6 + 500 µl 40% Methanol	1:64
E 4	0.39	500 µl Standard 5 + 500 µl 40% Methanol	1:128
E 3	0.20	500 µl Standard 4 + 500 µl 40% Methanol	1:256
E 2	0.098	500 µl Standard 3 + 500 µl 40% Methanol	1:512
E 1	0.049	500 µl Standard 2 + 500 µl 40% Methanol	1:1024
E 0	0.0	40% Methanol	0

4.1.8.2. Herstellung der Kontrollen

Zur Erfassung der Qualitätskriterien und zur Absicherung der Testresultate wurden jeweils 3 Kontrollproben verwendet. Die Kontrollen wurden durch Zusatz von 1.0 (K1), 2.0 (K2) und 4.0 pg Östradiol-17β/20 µl 40% Methanol (K3) hergestellt.

Aus der Stammlösung 2 (SL2 = 1 µg/ml oder 10 000 000 pg Östradiol-17β) wurden folgende Kontrolllösungen für die Qualitätssicherung der Testresultate angesetzt:

K1: 16 µl SL2 + 16 000 µl 40% Methanol = 100 pg/100 µl 40% Methanol

K2: 16 µl SL2 + 8 000 µl 40% Methanol = 200 pg/100 µl 40% Methanol

K3: 32 µl SL2 + 8 000 µl 40% Methanol = 400 pg/100 µl 40% Methanol

Jeweils 100 µl der Kontrollösungen wurden in Szintillations-Flaschen (aus Glas, 20 ml) pipettiert. Diese wurden ebenso wie Kot-, Harn- und Serumproben dekonjugiert und extrahiert. Nach der Reinigung der Steroidlösung der Kontrollen wurden mit 1 ml 80% Methanol eluiert und 1 ml Reinstwasser hinzugefügt, so dass am Ende der Reinigung 2 ml 40% Methanol pro Kontrolle vorlagen. Anschliessend wurden jeweils 20 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Bei der Auswertung der Proben im Photometer sollte 1.0 pg/20 µl (K1), 2.0 pg/20 µl (K2) und 4.0 pg Östradiol-17β/20 µl 40% Methanol (K3) gemessen werden.

4.1.9. Versuchsdurchführung

4.1.9.1. Aufbereitung der Proben

Hydrolyse mit *Helix pomatia*

Zur Bestimmung der unkonjugierten Gesamtöstrogenkonzentration in den Proben wurden die Kotproben 20 Minuten bei Raumtemperatur, die Harn- und Serumproben über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut.

Jeweils 100 µl der gevortexten Serum- und Harnproben und 0.5 g homogenisierte Kotprobe wurden durch enzymatische Hydrolyse aufbereitet. Dazu wurden in Szintillations-Fläschchen (aus Glas, 20 ml) zu 100 µl Harn 500 µl Hydrolyse-Lösung 1 pipettiert. 100 µl Serum bzw. 100 µl der Kontrollen wurden mit 500 µl Hydrolyse-Lösung 2 versetzt. 0.5 g Kot wurden in Szintillations-Flaschen mit 1.0 bis 4.0 ml Hydrolyse-Lösung 2 je nach Lagerungsdauer (Tab. 11) versetzt und für 2 h bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Um eine vollständige Hydrolyse der Kotproben zu gewährleisten, mußte zu den länger gelagerten Proben verhältnismäßig mehr Hydrolyselösung zugegeben werden.

Tabelle 11: Hydrolyse-Lösung 2 für bei -20, 4, 20 und 40°C gelagerte Kotproben.

Lagerungsdauer der Kotprobe (h)			Hydrolyse-Lösung 2 (ml)
0	bis	3	1
6	bis	12	2
24	bis	48	3
96	bis	192	4

Extraktion

Für die Extraktion der unkonjugierten Gesamtöstrogene aus den hydrolysierten Proben wurden 3.5 ml für Serum- und Harnproben und 5 ml für Kot- und Kontrollproben Butylmethylether/ Petrolether-Gemisch (30/70, v/v) in die Szintillations-Flaschen der hydrolysierten Proben pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei 850 x g bei 4°C zentrifugiert.

Ausfrieren der Lösung

Nach 15 Minuten Zentrifugation wurden die Proben zur Phasentrennung 20 Minuten bei -80°C oder 30 Minuten bei -60°C ausgefroren.

Phasentrennung

Der Überstand der Proben wurde in Reagenzgläser abgegossen und bei Raumtemperatur unter den Abzug gestellt. Die Harn- und Serumproben wurden einmal extrahiert. Bei den Kot- und Kontrollproben wurde eine zweite Extraktion über 2 Stunden mit 5 ml Butylmethylether/ Petrolether-Gemisch (30/70, v/v) durchgeführt und nach dem Abdampfen zur ersten Fraktion gemischt.

Abdampfen des Lösungsmittels

Das Gemisch von Butylmethylether/Petrolether wurde für ca. 15 Minuten bei 60°C im Wasserbad unter Schütteln unter dem Abzug abgedampft.

Aufnahme der Proben

Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde den Harn- bzw. Serumprobengläser 250 µl 40%iges Methanol zugesetzt und 13 Sekunden geschüttelt. Diese Extrakte der Harn- und Serumproben wurden bis zum Einsatz im EIA-Test bei 4°C im Kühlschrank gelagert. In den Reagenzgläsern der Kotproben wurde hingegen der Rückstand mit 500 µl 80%iges Methanol aufgelöst und 13 Sekunden geschüttelt. Danach wurden die Gläser der Kotproben für 6 Minuten in ein Wasserbad bei 60°C gestellt bis sich der Geruch des Methanols verlor.

Bis zum Einsatz im EIA-Test waren für die Kot- und Kontrollproben noch folgende Arbeitsschritte nötig:

Entfettung der Proben

Die Methanol-Lösung wurde zur Entfettung zweimal mit je 2 ml Petrolether gewaschen. Nach kurzem Schütteln wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Gläser mit der Methanolfraktion wurden in ein Wasserbad bei 60°C gestellt bis der restliche Petrolether verdampft war oder kein Geruch von Petrolether mehr feststellbar war.

Prezipitation der Gallensalze

Anschliessend wurde den Reagenzgläsern zum Ausfällen der Gallensalze 1 ml NaOH (1 M) und 0.7 ml einer 54 mM Fe(III)-NH₄(SO₄)₂-Lösung (in 1M Phosphorsäure) zugesetzt. Nach leichtem Schütteln wurden sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei 1900 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die Gallensalze zu entfernen. Der Überstand der Proben wurde mittels einer Pasteurpipette abpipettiert und direkt weiter zur Reinigung verwendet.

Reinigung des Überstands (Steroidlösung)

Die Reinigung der Steroidlösung erfolgte durch Kartuschensäulen (C₁₈; J.T. Baker) mit Hilfe einer Vakuumpumpe. Die Säulen wurden zuerst zweimal mit 1 ml 100% Methanol gewaschen und dann zweimal mit 1 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8.5) in 20% Methanol equilibriert. Danach wurde der Steroidextrakt der Probe aufpipettiert. Die Kartuschensäulen wurden sofort nach dem Auftragen des Steroidextraktes zweimal mit 1 ml 20mM Tris-HCl-Puffer (pH 8.5) in 20% Methanol und zweimal mit 1 ml 40%igem Methanol gewaschen. Die Steroide wurden mit 1 ml 80%igem Methanol eluiert, anschließend wurde 1 ml bi-distilliertes Wasser

hinzufügt und gut geschüttelt, so dass das Volumen der Steroidlösung am Ende der Kartuschensäulenreinigung pro Probe 2 ml 40%iges Methanol betrug. Die Kartuschenreinigung ist in Tab. 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Schema der Kartuschenreinigung der Kot- und Kontrollproben durch Octadecyl (C₁₈; J.T. Baker) Kartuschensäulen.

- Kartuschensäulen waschen 2 x mit 1 ml 100% Methanol
 - Equilibrieren 2 x mit 1 ml 20mM Tris-Puffer pH 8.5 in 20% Methanol
 - Auftragen der Probe (Überstand abpipettieren)
 - Waschen 2 x mit 1 ml 20mM Tris-Puffer pH 8.5 in 20% Methanol
 - Waschen 2 x mit 1 ml 40% Methanol
 - Eluieren mit 1 ml 80% Methanol
 - Nachspülen mit 1 ml bi-destilliertes Wasser
-

Verdünnung der Proben

Die Kot- und Kontrollproben (2 ml) und die Harn- und Serumproben (250 µl) wurden anschließend mit 40%igem Methanol verdünnt (Tab. 13), so dass eine prozentuale Bindung um ca. 50% entstand, um so eine genauere Messung der Östrogengehalte der Proben zu erreichen.

Tabelle 13: Vorverdünnung der Kontroll-, Serum-, Harn- und Kotproben zum EIA-Test.

Probe	Verdünnung	Vorbereitung		
		Probe (µl)		40% Methanol (µl)
Kontrolle	ohne			
Serum	1:10	40	+	360
	1:50	16	+	784
	1:100	10	+	990
Harn / Kot	1:10 000	10	+	990 (= 1:100)
		10 (1:100)	+	990

4.1.9.2. Immunreaktion

Die vorbereiteten beschichteten Mikrotiterplatten wurden im Kühlschrank bei 4°C über Nacht oder mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und die Auftauflüssigkeit ausgeklopft. Währenddessen wurden die Vorverdünnungen der Serum-, Harn- und Kotproben hergestellt und die vorbereiteten, aufgetauten Standardproben bei Raumtemperatur aufgewärmt. Vor Gebrauch wurde die Platte zweimal mit 0.05%iger Tween-80-Lösung gewaschen und gut ausgeklopft.

Enzym (1:120) und Antikörper (1:4000) wurden jeweils 1:100 mit Assay-Puffer verdünnt, um eine Konzentration von 1:12 000 für das Enzym bzw. 1:400 000 für den Antikörper zu erhalten. Von der verdünnten Enzymlösung wurden 100 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, wobei schnell gearbeitet werden sollte, um die Reaktionszeiten zwischen den zuerst und zuletzt einpipettierten Proben möglichst gleich zu halten. 20 µl der vorbereiteten Proben, Kontrollen und der Standardverdünnungen wurden im Doppelansatz in die Vertiefung pipettiert und 100 µl Antikörperlösung zugegeben. Zur Bestimmung der Nicht-Spezifischen-Bindung (NSB) wurden 20 µl 40% Methanol in die Vertiefungen vorgelegt und statt Antikörperlösung nur 100 µl Assay-Puffer zugegeben (Abb. 18). Die abgedeckten Platten wurden unter Schütteln im Kühlschrank bei 6-8°C über Nacht inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NSB	NSB	E6	E6	K3	K3	8	8	16	16	24	24
B	E0	E0	E7	E7	1	1	9	9	17	17	25	25
C	E0	E0	E8	E8	2	2	10	10	18	18	26	26
D	E1	E1	E9	E9	3	3	11	11	19	19	27	27
E	E2	E2	E10	E10	4	4	12	12	20	20	28	28
F	E3	E3	E11	E11	5	5	13	13	21	21	29	29
G	E4	E4	K1	K1	6	6	14	14	22	22	30	30
H	E5	E5	K2	K2	7	7	15	15	23	23	31	31

Abbildung 18: Pipettierschema für das Einfüllen der zu untersuchenden Proben (1 bis 31), Standardproben (E0 bis E11) und Kontrollproben (K1, K2 und K3) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. In die mit „Nicht-Spezifische-Bindung“ (NSB) bezeichneten Vertiefungen wurde Assay-Puffer gegeben.

Trennung der gebundenen und ungebundenen Fraktion

Die Trennung der gebundenen von den ungebundenen Antikörper erfolgte durch Dekantieren und viermaliges Auswaschen der Mikrotiterplatte mit 0.05%iger Tween-80-Lösung. Bevor die Platte ausgewaschen wurde, sollte sie dekantiert und während der Vorbereitung der Farbreaktion bei Raumtemperatur belassen werden.

Farbreaktion

Pro Platte wurden 8 ml Substratlösung A und 8 ml Substratlösung B miteinander vermischt und auf 25°C vorgewärmt (ca. 1 Minute). Das Substrat sollte vor Licht geschützt werden. In jede Vertiefung wurden 150 µl Substratgemisch gegeben und die Platten für 40 Minuten bei 25°C im Dunkeln unter leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert.

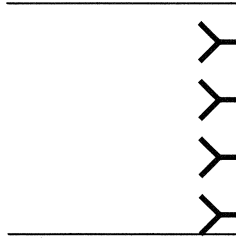
Abstoppen der Farbreaktion und Ablesen

Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 2 M H_2SO_4 abgestoppt, wodurch die blaue Färbung der umgesetzten Substratlösung ins Gelbe umschlug. Nach kurzem sanften Schütteln der Platte wurde die optische Dichte bei 450 nm am Photometer gemessen. Abb. 19 stellt schematisch den Enzymimmuntest für die Bestimmung der unkonjugierten Gesamtöstrogenkonzentration in Serum, Harn und Kot dar.

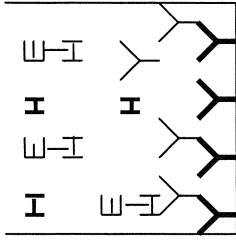
Gesamtöstrogen-EIA

1. Hydrolysierung der Kot-, Harn- und Serumproben mit Helix Pomatia über 2 h bei 37°C im Wasserbadschüttler; Reinigung der Steroidlösung mit Hilfe von Kartuschensäulen

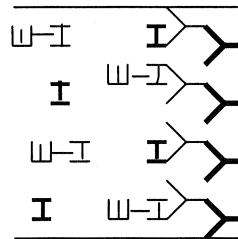
2. Beschichtung der Mikrotiterplatten mit erstem Antikörper (IgG)



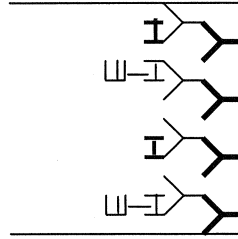
3. Zugabe von jeweils 100 µl Tracer und zweitem Antikörper und 20 µl Standard- bzw. Probenlösung



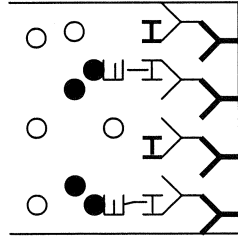
4. Über Nacht Inkubation bei 8°C im Dunkeln



5. Trennung von freier und gebundener Fraktion durch Waschen



6. Zugabe von 150 µl Substratlösung; 40min Inkubation bei 25°C im Wasserbad im Dunkeln



Legende:

Schaf-IgG-anti-Kaninchen IgG

Hormonspezifisches IgG

Unbekannte Menge Östrogene der Probe

Bekannte Menge Enzymmarkiertes Östradiol-17β (Tracer)

○ Substratlösung

● Umgesetzte Substratlösung

7. Das Enzym des Tracers reagiert mit dem Substrat zu einer Farbblösung

8. Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 2 M Schwefelsäure

9. Photometrische Bestimmung der Extinktionen und Auswertung anhand der Standardkurve

Abbildung 19: Schematische Darstellung des Enzymimmuntests für Gesamtöstrogene.

4.1.10. Auswertung der Messwerte

Die Extinktionsmittelwerte der Doppelbestimmungen der Standard-, Kontroll-, Kot-, Harn- und Serumproben wurden auf den Null-Wert (E0) bezogen und die relative Bindung in Prozent angegeben.

$$\text{Relative Bindung: } \frac{E - B_0}{E_0 - B_0} \times 100$$

Die Extinktion des E0 Wertes entspricht der maximalen Bindung des Antikörpers und die des „Blank“-Wertes (B₀) der unspezifischen Bindung an die unbeschichtete Mikrotiterplatte.

Die Konzentrationen der Kontroll-, Kot-, Harn- und Serumproben wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes (SLT-TECAN) durch lineare Regression in der logit-log-Transformation der Standardwerte errechnet. Die Ergebnisse der unkonjugierten Gesamtöstrogenkonzentration wurden in ng/ml für die Harn- und Serumproben und in ng/g Kot für die Kotproben errechnet.

Die Auswertung nach photometrischer Messung wurde wie folgt berechnet:

Für Kontrolle:

Wert nach photometrischer Messung (in 20 µl) * Faktor 100 = 100, 200 bzw. 400 pg in 2 ml (gesamtes Volumen nach Reinigung der Steroidlösung).

Für Serum:

1:10 - Wert nach photometrischer Messung (in 20 µl) * 12.5^a * 10^b / 1000^c * 10^d = ng/ml.

1:50 - Wert nach photometrischer Messung (in 20 µl) * 12.5^a * 50^b / 1000^c * 10^d = ng/ml.

1:100 - Wert nach photometrischer Messung (in 20 µl) * 12.5^a * 100^b / 1000^c * 10^d = ng/ml.

^a Faktor 12.5: um die Meßwerte aus den in die Vertiefung eingesetzten 20 µl auf 250 µl umzurechnen, die der Aufnahme der Serumproben in 250 µl 40% Methanol entsprechen (siehe 4.1.9.1. Versuchsdurchführung: Aufnahme der Proben).

^b Faktor 10, 50 oder 100: dieser entspricht der Verdünnung 1:10, 1:50 oder 1:100 der Probe nach der Aufnahme.

^c Faktor 1000: um die Ergebnisse von Picogramm in Nanogramm umzurechnen.

^d Faktor 10: um aus der 100 µl Probe, die hydrolysiert wurde, die Konzentration in ng/ml zu erlangen.

Für Harn:

Wert nach photometrischer Messung (in 20 µl) * 12.5 * 10 000 / 1000 * 10 = ng/ml.

Die Umrechnung der Harnproben entspricht den Serumproben außer dem Faktor 10 000, der sich durch eine Verdünnung der Harnproben von 1:10000 erklärt.

Für Kot:

Wert nach photometrischer Messung (in 20 µl) * 100^e * 10 000^f / 1000^g * 2^h = ng/g

^e Faktor 100: um die Meßwerte aus den in die Vertiefung eingesetzten 20 µl auf 2 ml umzurechnen, die dem Volumen nach Reinigung von 2 ml 40% Methanol entsprechen (siehe 4.1.9.1. Versuchsdurchführung: Reinigung der Steroidlösung).

^f Faktor 10 000: entspricht der Verdünnung 1:10 000 der Kotproben, die in die Vertiefungen pipettiert wurden.

^g Faktor 1000: um die Ergebnisse von Picogramm in Nanogramm umzurechnen.

^h Faktor 2: da 0.5 g Probe hydrolysiert wurden, kann mit Faktor 2 die Konzentration in ng/g angegeben werden.

4.1.11. Bestimmung des Feuchtigkeitsverlustes der Kotproben während der Lagerung

Zur Bestimmung des Feuchtigkeitsverlustes der Kotproben während der Lagerung wurden abgewogene Mengen (ca. 8 g) frischen Kots in 8 Wiederholungen bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen (4, 20 und 40°C) und Lagerungsdauern (3, 6, 12, 24, 48, 96 und 192 h) aufbewahrt und anschließend jeweils wieder gewogen.

Der Mittelwert des prozentualen Feuchtigkeitsverlustes wurde aus der Differenz der ersten und zweiten Wägung der 8 Wiederholungen berechnet.

4.1.12. Statistische Auswertung

Bei den statistischen Auswertungen wurde von den gemessenen Variablen der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung, der Standardfehler, Maximum und Minimum ermittelt. Die gemessenen unkonjugierten Östrogenkonzentrationen in gelagerten Kotproben wurden gegen die Kontrollen (Temperatur -20°C, Stunde 0) mit dem unten stehenden Modell getestet. Die varianzanalytische Auswertung der vorliegenden Daten erfolgte nach der Methode der kleinsten Quadrate mit dem Statistik-Programm-Paket SAS[®], Version 8.1 (Prozedur „GLM“). Die Signifikanz eines Effektes wurde mit dem F-Test und Bonferroni-t-Test untersucht. Die fixen Effekte waren Geschlecht, Anzahl und Gewicht der Lämmer, sowie Geburtsnummer und Gewicht der Ziege.

Statistisches Auswertungsmodell:

$$Y_{ijklm} = \mu + \text{Stunde}_i + \text{Temperatur}_j + \text{Sex}_k + \text{Ziege}(\text{Sex})_{kl} + (\text{Stunde} * \text{Temperatur})_{ij} + e_{ijklm}$$

Y_{ijklm}	=	Beobachtungswert des n-ten Tieres (vorkorrigiert auf Feuchtigkeitsverlust)
μ	=	Mittelwert aller Tiere
Stunde_i	=	fixer Effekt der j-ten Lagerungsdauer (0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 und 196 h)
Temperatur_j	=	fixer Effekt der i-ten Lagerungstemperatur (-20, 4, 20 und 40°C)
$\text{Ziege}(\text{Sex})_{kl}$	=	fixer Effekt des l-ten individuellen Tieren innerhalb des k-ten Geschlechts
Sex_k	=	fixer Effekt des l-ten Geschlechts
$\text{Temperatur} * \text{Stunde}_{ij}$	=	Interaktionseffekt zwischen der i-ten Lagerungstemperatur und der j-ten Lagerungsdauer
e_{ijklm}	=	Zufälliger Restfehler

4.2. Ergebnisse

Die 22 während der Trächtigkeit untersuchten Ziegen brachten 5 Einlinge, 11 Zwillinge, 4 Drillinge und 2 Vierlinge zur Welt.

4.2.1. Etablierung eines Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Gesamtöstrogenen im Kot, Harn und Serum von Ziegen

Der Enzymimmunoassay zur Bestimmung von unkonjugierten Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot, Harn und Serum basiert auf dem Verfahren von Meyer und Hoffmann (1987), Meyer et al. (1997) und Schiffer et al. (2001). Dieser Assay wurde mit einigen Modifikationen im eigenen Hormonlabor etabliert.

Die laborspezifischen Qualitätskriterien für das Referenzverfahren werden in Tab. 13 gezeigt. Der Variationskoeffizient bestätigt die Genauigkeit des EIA-Tests. Die untere und obere Nachweisgrenze betrug 0.049 und 50 pg Östradiol-17 β /Vertiefung. Die Nachweisgrenzen werden in der Eichkurve aus 10 aufeinander folgenden Assays gezeigt, wo die prozentuale Bindung gegen den Logarithmus der Östradiol-17 β -Konzentration aufgetragen wurde (Abb. 20). Östradiol-17 β konnte zur Qualitätskontrolle verwendet werden, da der Antikörper zu 100% an Östradiol-17 β bindet.

Tabelle 13: Qualitätskriterien des Gesamtöstrogen-EIAs.

Bekannt Konzentration (pg/20 μ l)	Gemessene Östrogen-Konzentration (pg/20 μ l)				Geschätzte Konzentration (pg/20 μ l) für B/Bo ^a		
	n	Mittel	SEM	CV (%)	20%	50%	80%
1	10	1.10	0.03	9.1	-	-	-
2	10	2.11	0.04	6.4	20.7	2.3	0.35
4	10	4.02	0.10	7.8	-	-	-

^a B/Bo, prozentuale Tracerbindung im Verhältnis zum Nullstandard

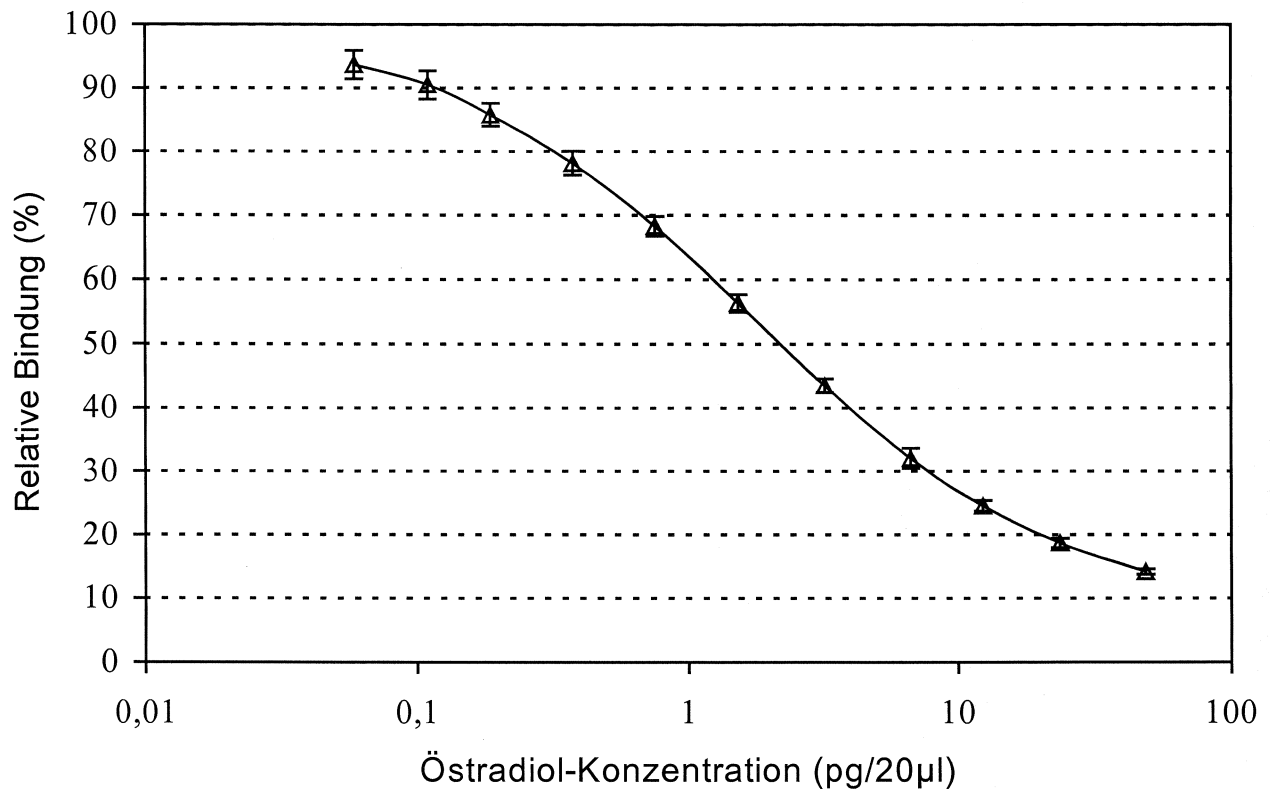


Abbildung 20: Eichkurve für den Gesamtöstrogen-Assay mit 10 Wiederholungen. Die prozentuale Bindung wurde gegen den Logarithmus der Östradiol-17 β -Konzentration aufgetragen.

4.2.2. Gesamtöstrogenkonzentrationen in Kot, Harn und Serum

Die unkonjugierten Gesamtöstrogenkonzentrationen in Kot, Harn und Serum wurde zu einem Zeitpunkt zwischen dem 110. und 130. Trächtigkeitstag bei 22 Burenziegen bestimmt. Die bei den einzelner Tieren gefundenen Werte sind in Tab. 14 aufgeführt.

Im Mittel betrug die Gesamtöstrogenkonzentration im Kot 2585.8 (SEM 307.9) ng/g, wobei die Einzelwerte zwischen 764.0 und 7840.0 ng/g lagen. Die Konzentrationen im Harn lagen zwischen 475.6 und 15687.5 ng/ml, im Mittel bei 3959.3 (SEM 775.2) ng/ml. Auffallend hohe Konzentrationen von 11950.0 und 15687.5 ng/ml wurden bei zwei Tieren, Ziege 1375

mit Zwillingen und Ziege 1339 mit Drillingen gemessen. Die entsprechenden Konzentrationen im Serum waren deutlich geringer. Sie betrug im Mittel 13.9 (SEM 1.3) ng/ml, der Minimalwert war 6.4, der Maximalwert 27.6 ng/ml. Im Mittel betrug die Östrogenkonzentration im Serum nur 0.54% der im Kot, und 0.35% der im Harn gemessenen. Das bedeutet eine ca. 180fach bzw. 280fach höhere Gesamtöstrogenkonzentration im Kot bzw. Harn.

Die Gesamtöstrogenkonzentrationen in Kot, Harn und Serum zeigten, wie aus Tab. 14 und Abb. 21 hervorgeht, eine große tierindividuelle Variation ($P < 0.01$). Die Korrelationen zwischen der Östrogenkonzentration im Serum mit der in Kot ($r = -0.19$) und Harn ($r = 0.07$) waren nicht signifikant ($P > 0.05$).

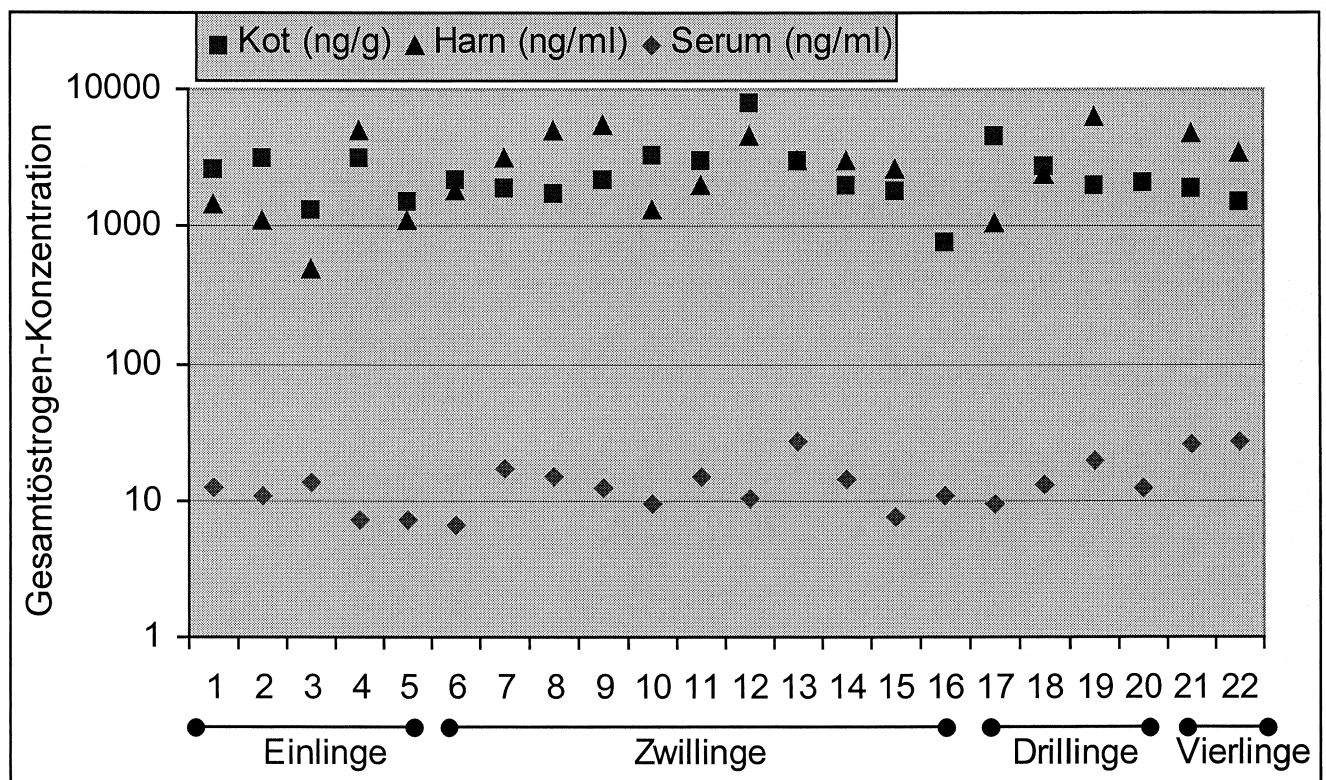


Abbildung 21: Gesamtöstrogenkonzentration in Kot, Harn und Serum von 22 Einzelziegen zwischen 110. und 130. Trächtigkeitstag.

Tabelle 14: Gesamtöstrogenkonzentration in Kot, Harn und Serum von 22 trächtigen Burenziegen zwischen dem 110. und 130. Trächtigkeitstag.

Ziege	Anzahl Lämmer	Kot (ng/g)	Harn (ng/ml)	Serum (ng/ml)
1016	1	2654.0	1462.5	12.5
1189	1	3250.0	1131.2	10.6
1317	1	1326.0	475.6	13.9
1325	1	3118.0	5023.7	7.2
1326	1	1562.0	1101.2	7.1
1067	2	2196.0	1842.5	6.4
1124	2	1898.0	3116.2	17.3
1145	2	1728.0	5126.2	15.0
1181	2	2172.0	5638.7	12.4
1196	2	3382.0	1326.2	9.5
1197	2	3078.0	1978.7	14.6
1250	2	7840.0	4528.7	10.2
1275	2	3072.0	3106.2	26.8
1343	2	2010.0	3028.7	14.0
1350	2	1818.0	2660.0	7.4
1375	2	764.0	11950.0	10.8
1171	3	4562.0	1053.7	9.5
1198	3	2794.0	2372.5	13.2
1280	3	2038.0	6202.5	19.6
1339	3	2140.0	15687.5	12.5
1378	4	1942.0	4728.7	26.1
1385	4	1544.0	3560.0	27.6
$\bar{x} \pm \text{SEM}$	47	2585.8 \pm 307.9	3959.3 \pm 775.2	13.9 \pm 1.3

4.2.3. Gesamtöstrogenkonzentration im Kot

In Tab. 14 sind die Gesamtöstrogenkonzentrationen im sofort nach der Gewinnung tiefgefrorenen Kot für die 22 Einzeltiere aufgeführt. Es zeigt sich eine große individuelle Variationen, wie bereits unter 4.2.2. dargestellt. Die Östrogenkonzentrationen in den Kotproben nach verschiedenen Lagerungstemperaturen (-20, 4, 20 und 40 °C) und Lagerungsdauern (0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 und 192 h) sind in Abb. 22 dargestellt. Mit 2585.8 (SEM 308.0) ng/g wurde die geringste Gesamtöstrogenkonzentration bei den unmittelbar nach der Gewinnung eingefrorenen Kontrollproben festgestellt. Je länger und wärmer die Kotproben gelagert wurden, desto höher stieg die gemessene Gesamtöstrogenkonzentration (Abb. 6). So betrug z.B. bei Proben, die für 3 h bei 4°C gelagert wurden, der Mittelwert 2847.7 (SEM 319.6) ng/g Kot. Bei für 3 h bei 20°C gelagerten Proben betrug der Wert 3001.9 (SEM 323.7), bei für 3 h bei 40°C gelagerten Proben 3424.2 (SEM 404.3) ng/g. Der Temperatureinfluß verstärkte sich bei längeren Lagerungszeiten (s. Anhang, 8.2, Tab. C). Wurden jeweils die Mittelwerte aller Proben einer Lagerungstemperatur (n=154) miteinander vergleichen, ergaben sich hochsignifikante Unterschied ($P < 0.01$) zwischen den vier Temperaturstufen (Tab. 15).

Die Lagerungsdauer selbst hatte ebenfalls einen Einfluss auf den gemessenen Gesamtöstrogengehalt. Bei Proben, die 3, 6, 12, bzw. 192 h bei 4°C gelagert wurden, waren die Mittelwerte für die Gesamtöstrogenkonzentration 2847.7 (SEM 319.6), 3095.5 (SEM 367.4), 3376.8 (SEM 321.6) bzw. 6932.3 (SEM 599.6) ng/g. Dieser Effekt war noch deutlicher bei Proben die bei höheren Temperaturen gelagert wurden. Die Mittelwerte der Gesamtöstrogenkonzentration betragen z.B. 3424.2 (SEM 404.3) ng/g Kot für 3 h bzw. 8677.7 (SEM 655.2) ng/g Kot für 192 h bei 40°C gelagerten Kotproben (s. Anhang, 8.2, Tab. C). Beim Vergleich der Mittelwerte aller Proben einer Lagerungsperiode (n=66) zeigten sich signifikante Unterschied ($P < 0.01$) zwischen Lagerungsperioden, wobei die für 192 h gelagerten Proben die höchsten Werte aufwiesen (Tab. 16).

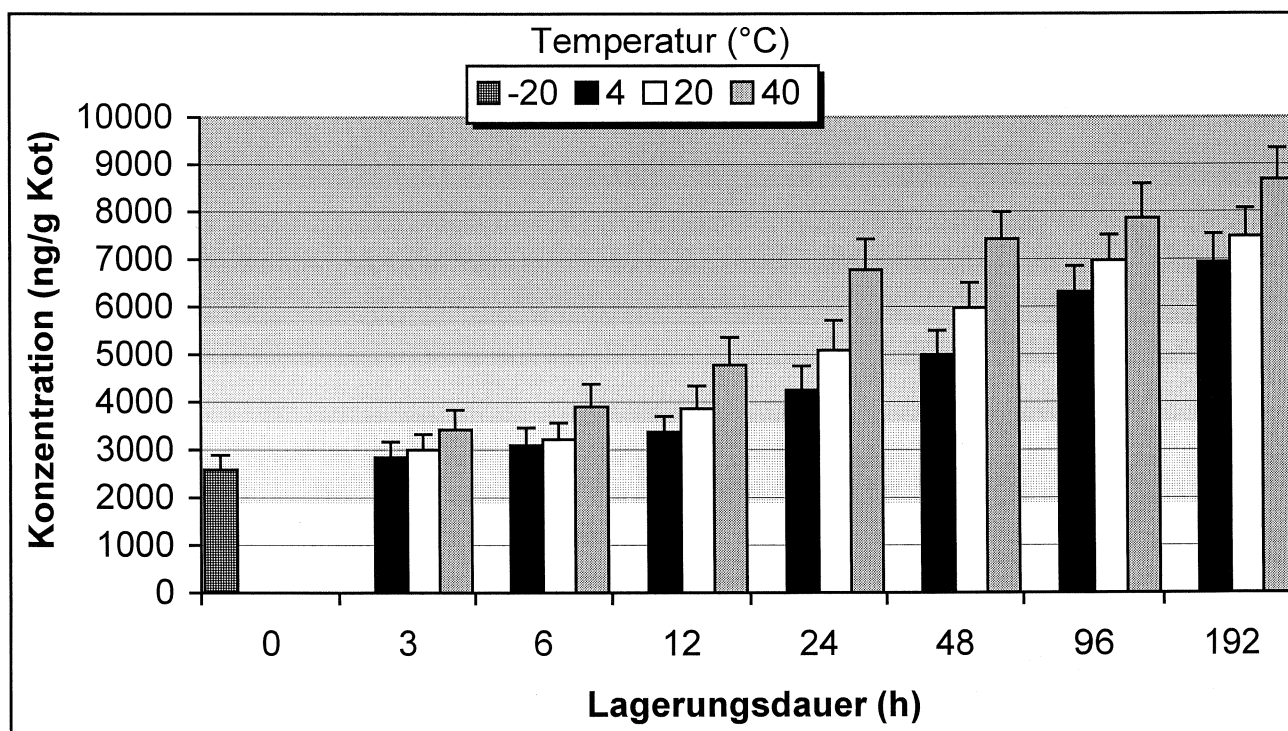


Abbildung 22: Gesamtöstrogenkonzentration im Kot (ng/g Kot) von 22 trächtigen Ziegen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und Dauern (Mittelwerte ± SEM).

Tabelle 15: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Kot) bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Standardfehler 90.0, F-Test (α) <0.01, LSD = 259.2).

Lagerungstemperatur (°C)	n	Mittelwert (ng/g)
-20	22	2585.8 ^a
4	154	4544.4 ^b
20	154	5084.8 ^c
40	154	6119.6 ^d

^{abcd} Werte mit verschiedenen Indices unterscheiden sich ($P < 0.05$, Bonferroni-t-Test).

Tabelle 16: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Kot) bei verschiedenen Lagerungsdauern (Standardfehler 125.9, F-Test (α) <0.01, LSD = 503.6).

Lagerungsdauer (h)	n	Mittelwert (ng/g)
0	22	2585.8 ^a
3	66	3091.5 ^b
6	66	3403.7 ^b
12	66	4004.6 ^c
24	66	5370.4 ^d
48	66	6130.9 ^e
96	66	7050.2 ^f
192	66	7695.9 ^g

^{abcdefg} Werte mit verschiedenen Indices unterscheiden sich ($P < 0.05$, Bonferroni-t-Test).

Nach der Berechnung des Feuchtigkeitsverlustes der Kotproben während der Lagerung (Tab. 17) zeigte sich ein Gewichtsverlust von bis zu 60% bei Proben, die für 192 h bei 40°C gelagert wurden. Dieser Gewichtsverlust wurde bei den gemessenen Gesamtöstrogenwerten mit berücksichtigt und es ergaben sich daraus die korrigierten Mittelwerte, die in Abb. 23 dargestellt sind. Es wurde aber dennoch ein Einfluss ($P < 0.01$) von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer und ihre Interaktion auf die Östrogenkonzentration festgestellt. Tab. 18 zeigt die Mittelwerte ($n=66$) der Östrogenkonzentrationen im Kot und ihre signifikanten Unterschiede ($P < 0.05$) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. Die Mittelwerte steigen mit zunehmender Lagerungsdauer signifikant an ($P < 0.01$). In Tab. 19 sind die korrigierten Mittelwerte der Gesamtöstrogenkonzentration gruppiert nach Lagerungstemperatur dargestellt. Auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungstemperaturen. Der Östrogengehalt bei -20°C ist mit 2585.8 ng/g am niedrigsten, der bei 4°C mit 3136.2 ng/g Kot am höchsten, während die Werte von 20 und 40°C mit 2760.9 bzw. 2914.2 ng/g Kot dazwischen liegen (s. Anhang, 8.2, Tab. D).

Tabelle 17: Mittelwerte des Feuchtigkeitsverlustes (%) von Kotproben während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (n=8).

Lagerungstemperatur (°C)	Lagerungsdauer (h)							
	0	3	6	12	24	48	96	192
-20 (Kontrolle)	0	0	0	0	0	0	0	0
4	-	3.8	6.3	10.3	18.7	32.4	48.8	53.5
20	-	7.9	15.4	29.1	50.1	57.8	58.1	58.1
40	-	15.5	29.5	50.9	59.4	59.7	59.8	59.9

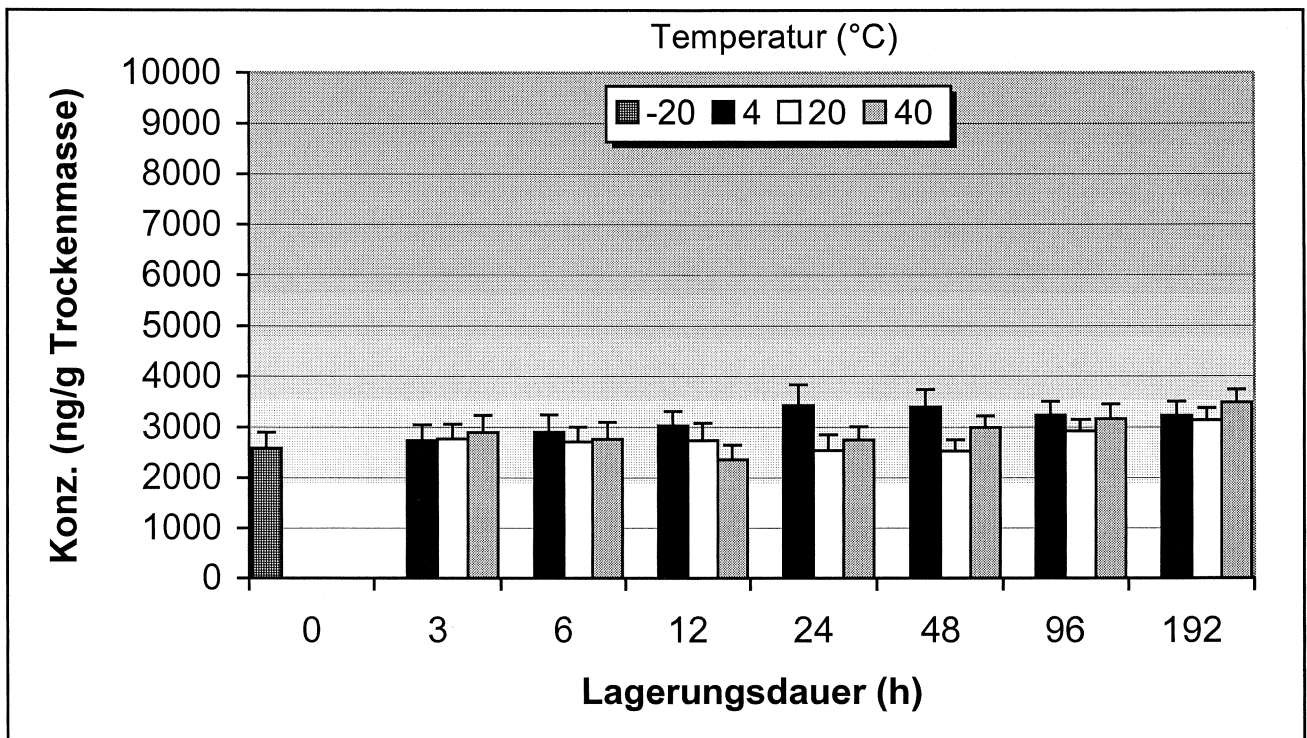


Abbildung 23: Für den Feuchtigkeitsverlust korrigierte Gesamtöstrogenkonzentration im Kot (ng/g Trockenmasse) von 22 trächtigen Ziegen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und Dauern (Mittelwerte \pm SEM).

Tabelle 18: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse Kot) bei verschiedenen Lagerungsdauern (Standardfehler 61.1, F-Test (α) <0.01, LSD = 256.9).

Lagerungsdauer (h)	n	Mittelwert (ng/g)
0	22	2585.8 ^a
3	66	2799.4 ^{bc}
6	66	2789.4 ^{bc}
12	66	2710.3 ^b
24	66	2905.6 ^{bcd}
48	66	2970.9 ^{cd}
96	66	3105.2 ^{de}
192	66	3278.9 ^e

^{abcde} Werte mit verschiedenen Indices unterscheiden sich ($P < 0.05$, Bonferroni-t-Test).

Tabelle 19: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse Kot) bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Standardfehler 41.4, F-Test (α) <0.01, LSD = 132.2).

Lagerungstemperatur (°C)	n	Mittelwert (ng/g)
-20	22	2585.8 ^a
4	154	3136.2 ^b
20	154	2760.9 ^c
40	154	2914.2 ^d

^{abcd} Werte mit verschiedenen Indices unterscheiden sich ($P < 0.05$, Bonferroni-t-Test).

4.2.4. Einflüsse auf die Gesamtöstrogenkonzentration im Kot von trächtigen Burenziegen

Zwischen den einzelnen Tieren wurde eine große individuelle Variation festgestellt ($P < 0.01$). Ähnlich hohe Variationen der Konzentration wurde auch innerhalb Wurfgröße ermittelt (Abb. 24), sodaß sich keine eindeutigen Zusammenhänge abzeichneten.

Außer dem Einfluss ($P < 0.01$) arbeitstechnischer Faktoren wie Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer und ihre Interaktion auf die unkonjugierte Gesamtöstrogenkonzentration des Kots hatte auch das Einzeltier einen Effekt ($P < 0.01$). Hingegen übten Anzahl, Geburtsgewicht und Geschlecht der Lämmer sowenig eben einen Einfluss aus wie die Anzahl der Ablammungen und das Gewicht der Mutterziegen ($P > 0.05$). Gesamtöstrogenkonzentrationen bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen und -dauern innerhalb Wurfgröße und Geschlecht der Lämmer werden im Anhang (8.2, Tab. E und F) dargestellt.

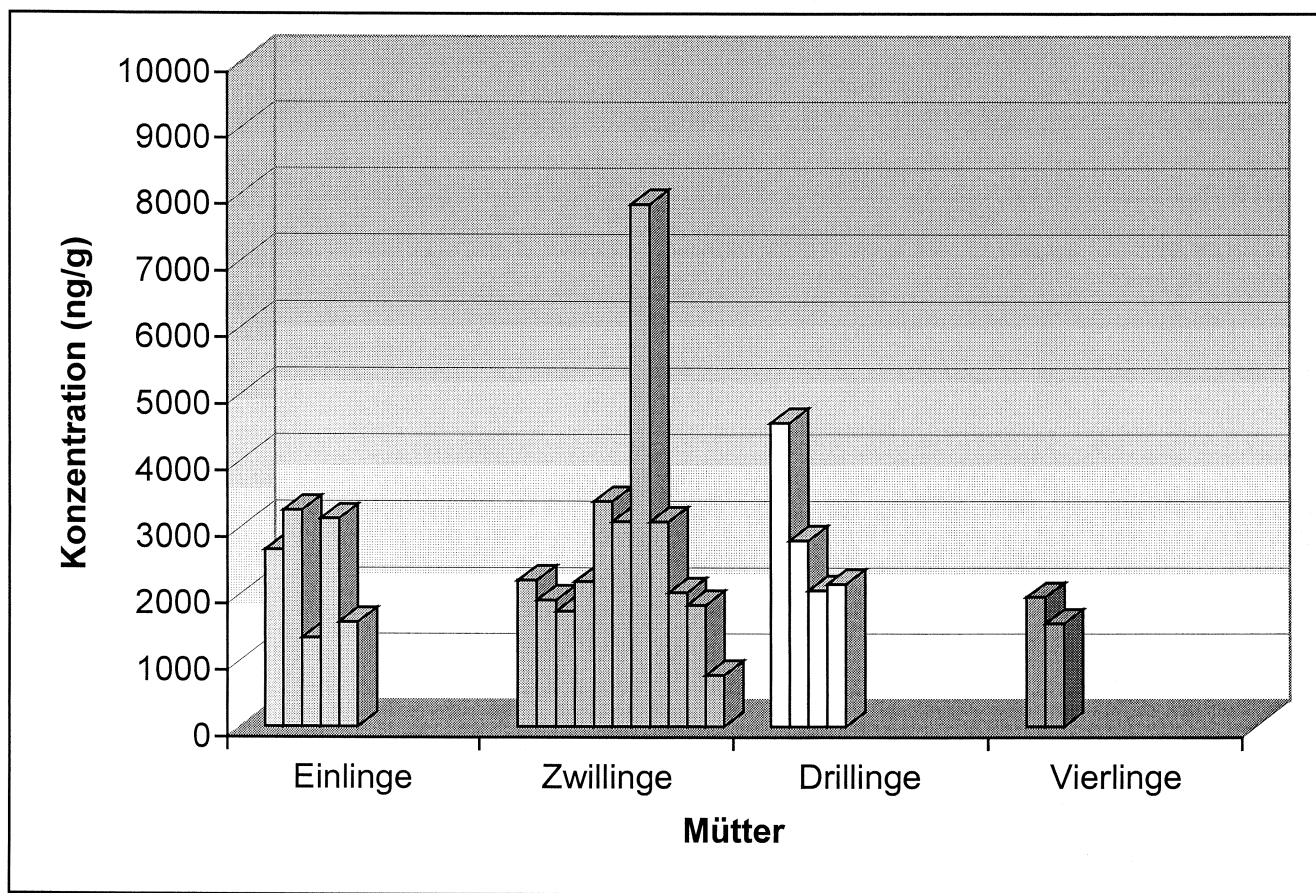


Abbildung 24: Gesamtöstrogenkonzentration im Kot (Kontrolle) bei 5 Einlings-, 11 Zwillings-, 4 Drillings- und 2 Vierlingsmüttern.

4.3. Diskussion

Die Ziele dieser Arbeit bestanden zum einen in einem Vergleich von Gesamtöstrogenkonzentrationen in Kot, Harn und Blut von trächtigen Ziegen und zum anderen in der Ermittlung des Einflusses von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die Gesamtöstrogenkonzentration im Kot.

Als Erstes wurde im Hormonlabor des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen der Doppelantikörper-Enzymimmunoassay zur Messung von unkonjugierten Gesamtöstrogenen in Blut, Harn und Kot in geringfügiger Abwandlung des bei Meyer und Hoffmann (1987), Meyer et al. (1997) und Schiffer et al. (2001) beschriebenen Verfahrens etabliert.

Die Variabilität der Direktbeschichtung und der Doppelantikörpertechnik wurde von Meyer (1989) verglichen. Bei der Doppelantikörpertechnik wurden gleiche Extinktionen auf der ganzen Platte gemessen (VK = 3.2%). Bei der direkten Beschichtung hingegen wurde eine deutlich höhere Variabilität festgestellt (VK = 11.4%). Außerdem war auch ein sog. Randeffect zu beobachten, bei dem die Reaktion am Rand der Vertiefung deutlich schwächer ausfiel. Die Ursache für diese Unterschiede liegen darin, dass bei der Doppelantikörpertechnik das Schaf-IgG zuerst im Überschuss adsorbiert werden kann und folglich der hormonspezifische Antikörper jeweils vollständig gebunden wird. Unterschiede in der Beschichtbarkeit der einzelnen Vertiefungen werden somit weitestgehend nivelliert. Als weiterer Vorteil ergab sich, dass bei der Doppelantikörpertechnik nur ca. ein Fünftel bis ein Zehntel des hormonspezifischen Antikörpers benötigt wird, und somit wertvoller hormonspezifischer Antikörper eingespart werden kann.

Östradiol-17 β ist bei allen Tierarten das wichtigste ovarielle Brunsthormon (Velle, 1963; Schwartz, 1982; Klauke und Hoffmann, 1992). Klauke und Hoffmann (1992) zeigten beim Schaf und Hoffmann et al. (1997) beim Rind, dass in der Plazenta gebildetes Östronsulfat das dominierende Östrogen der Trächtigkeit ist. In den meisten Untersuchungen wurden Östrogene als unkonjugiertes freies Östron und/oder Östradiol-17 α oder Östradiol-17 β mit Hilfe spezifischer Antikörper oder mit gegen unkonjugierte Gesamtöstrogene gerichtete Antikörper bestimmt (Schwarzenberger et al., 1996). Bei Spezies, bei denen die Feto-Plazentale-Einheit große Menge an Östrogenen synthetisieren kann der Östrogengehalt im

Blut als wichtiger Indikator für das Vorliegen einer Trächtigkeit dienen. Er gibt auch einen direkten Hinweis auf das Vorhandensein lebender Feten. Hingegen wird durch das Progesteron, das häufig zur Trächtigkeitsfeststellung verwendet wird, lediglich das Vorhandensein funktioneller Gelbkörper nachgewiesen.

Bei Wiederkäuern ist der Harn nach dem Kot der wichtigste Hauptausscheidungsweg der Östrogen- und Progesteronmetaboliten (Velle, 1963; Bamberg et al., 1986; Adams et al., 1994; Palme et al., 1996). Im Kot finden sich die meisten Östrogene in unkonjugierter Form. Bamberg et al. (1986) fanden im Kot der Ziege das Östron (40%) als hauptsächlichen Metaboliten, gefolgt von Östradiol-17 β (35%) und Östradiol-17 α (25%). Beim Rind wies Östradiol-17 α die höchste Konzentration auf, gefolgt von Östradiol-17 β und Östron, alle in unkonjugierter Form (Hoffmann et al., 1997). Zur Feststellung der Trächtigkeit kann daher bei Klautieren die Östrogenkonzentrationen in Kotproben bestimmt werden (Möstl et al., 1983; Möstl et al., 1984; Bamberg et al., 1984; Bamberg et al., 1986; Choi, 1987; Choi et al., 1985; Choi et al., 1987; Sist et al., 1987; Palme et al., 1989; Desaulniers et al., 1989; Bamberg und Schwarzenberger, 1990; Schwarzenberger et al., 1991; Holtz, 1992). Sindermann et al. (1992) ermittelte bei 13 zyklischen Burenziegen Gesamtöstrogenkonzentrationen zwischen 6.8 und 68.0 ng/g Kot und bei 4 einlings- und 18 zwillingstragenden Müttern am 91. Trächtigkeitstag mittlere Gesamtöstrogengehalte von 657.5 bzw. 648.7 ng/g Kot.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 22 Burenziegen zwischen dem 110. und dem 130. Tag der Trächtigkeit zeitgleich eine Kot-, eine Harn- und eine Blutprobe entnommen, um die jeweilige Gesamtöstrogenkonzentration zu ermitteln. Zwischen den dekonjugierten Gesamtöstrogenkonzentrationen in den drei Körperflüssigkeiten waren keine Korrelationen festzustellen. In Gegensatz dazu gab es bei dem trächtigkeitsbedingten Anstieg der Östrogene im Kot der Ziege (Sindermann et al., 1992) und des Rindes (Möstl et al., 1994) Übereinstimmung mit dem Verlauf der Östronsulfatkonzentration im Blut.

Die ermittelte individuell bedingte Variation der Östrogenkonzentration bestätigt frühere Beobachtungen am Kot von Burenziegen (Holtz, 1992). Da nur eine einzige Probe pro Tier entnommen wurde, lässt sich die Variation zwischen Tieren statistisch nicht erfassen. Es konnten lediglich unterschiedliche Konzentrationsstufen zwischen Serum (13.9, SEM 1.3), Harn (3959.3, SEM 775.2) und Kot (2585.8, SEM 307.9) festgestellt werden.

Auffällig war der beobachtete Anstieg der Östrogenkonzentration in den Kotproben während der Lagerung. In der Untersuchung von Holtz (1992) wurde dieser mit einer fortlaufenden Dekonjugierung der mit dem Kot ausgeschiedenen Östrogene interpretiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich nach Berücksichtigung des Feuchtigkeitsverlustes während der Lagerung dieser Anstieg auf ein unbedeutendes Maß verringerte.

In der vorliegenden Studie wurde neben Kühlschrank- (4°C) und Zimmertemperatur (20°C) auch eine Lagerungstemperatur von 40°C als Imitation einer tropischen oder subtropischen Umwelt erprobt. In der Literatur gibt es verschiedene Methoden für die Konservierung der Kotproben. Das Trocknen der Kotproben ist eine gute Methode für die Lagerung im Feld wo weder Konservierungszusätze noch Elektrizität zur Kühlung zur Verfügung stehen. Östradiol und Testosteron zeigten nach 3 Lagerungswochen eine Stabilität von 100% (Brockman und Whitten, 1996). Ähnliche Beobachtungen am Kot trächtiger Rinder bestätigen, dass die Östrogenkonzentration durch Lagerungstemperaturen von 20 bis 30°C während einer Zeitdauer von 8 Tagen nicht wesentlich beeinflusst wurde (Limpach, 1985). Im Gegensatz dazu ermittelte Glatzel (1999) eine beständige Verringerung der Progesteronkonzentration im Kot nicht trächtiger Kühe, als die Kotproben bei einer Temperatur von 37°C bis zu 2 Tage gelagert wurden. Gleichmaßen nahmen in Kotproben von nicht tragenden und tragenden Kühen, die bei Raumtemperatur (20 - 23°C) während eines Zeitraumes von 12 Wochen konserviert wurden, die Gestagen- (Progesteron) und Östrogenkonzentrationen (Östron) graduell ab (Schlenker et al., 1998). Holtz (1992) stellte neben einen Effekt der Lagerungsdauer und -temperatur im Ziegenkot auch innerhalb einer Kotprobe verschiedene Östrogenkonzentrationen fest. Hieraus könnte eine gewisse Fehlerquelle bei einer praktischen Anwendung der Kotöstrogenkonzentration zur Trächtigkeitsdiagnostik herrühren. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen aber, dass im Hinblick auf eine Trächtigkeitsfeststellung eine Lagerung von Ziegenkot auch bei hohen Umgebungstemperaturen bis zu einer Woche unproblematisch ist. Der lagerungsbedingte Feuchtigkeitsverlust der Kotproben muss bei der Analyse allerdings berücksichtigt werden. Wahrscheinlich bietet es sich an, die Hormon-Konzentration grundsätzlich auf Gramm Trockenmasse zu beziehen.

Einer frühen und effektiven Diagnose der Trächtigkeit kommt in Bezug auf die Wirtschaftlichkeit der Haltung eine bedeutende Rolle zu, da die Entscheidung ob und wie die Tiere weiter gehalten oder gegebenenfalls behandelt werden sollen, so früh wie möglich nach der Bedeckung oder künstlichen Besamung erfolgen sollte. Gegenwärtig gibt es verschiedene Trächtigkeitsdiagnoseverfahren, welche u.a. Hormone oder spezielle Proteine verwenden.

Die Bestimmung von Progesteron und Progesteron-Metaboliten weist lediglich das Vorhandensein funktioneller Gelbkörper nach. Deshalb sind sie ein indirekter Indikator der Trächtigkeit. Progesteronbestimmung zur Trächtigkeitsdiagnose wird bei der Ziege im Blut und in der Milch mit einer ca. 90%igen Erfolgsrate um den 21. Trächtigkeitstag angewendet (Memon und Ott, 1980; Agwu und Holtz, 1986; Pennington et al., 1982; Dionysius, 1991; Engeland et al., 1997). Dies wurde auch durch Untersuchungen an Schafen mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt (Shemesh et al., 1979; Dickie und Holzmann, 1992).

Ein praktisches Trächtigkeitsdiagnoseverfahren ist die Ultrasonographie (Echtzeit-Ultraschallgerät, B-Mode). Mit der Ultrasonographie lässt sich transabdominal Fruchtwasser ab Tag 25 nach Belegung, und mit Hilfe einer transrektalen Sonde fetaler Herzschlag ab Anfang der 4. Trächtigungswoche (Kahn et al., 1990; Martinez et al., 1998; Padilla und Holtz, 1999) nachweisen. Trotz der guten Ergebnisse die mit diesem Gerät erzielt werden, ist dessen Anschaffung aufwendig, und die Anwendung benötigt einen qualifizierten Operateur. Deshalb dürfte das Verfahren für die meist in den Tropen und Subtropen herrschenden Voraussetzungen weniger geeignet sein.

Das Pregnancy-associated glycoprotein (PAG), eine in binukleären Trophoblastzellen, später in der Plazenta gebildete und im Blutplasma messbare Substanz, eignet sich zur direkten Trächtigkeitsdiagnose bei der Ziege (Sousa et al., 1999; González et al., 1999, 2001), beim Schaf (Benítez-Ortiz, 1992; Karen et al., 2002) und bei der Kuh (Zoli et al., 1992b; Perényi et al., 2002) und zeigt die Anwesenheit einer lebensfähigen Frucht an. Über die PAG-Messung im Blut lässt sich die Trächtigkeit beim Schaf ab dem 21. Tag und in der Milch ab dem 32. Tag nach der Bedeckung feststellen. Jedoch gibt es gegenwärtig nur ein einziges Labor in Europa, das für die Bestimmung einer PAG-Konzentration ausgestattet ist.

In Anbetracht der bestehenden Alternativen bietet die Bestimmung der Östrogenkonzentration im Kot als Hinweis auf eine Trächtigkeit, bzw. das Vorhandensein lebender Feten und einer funktionierenden Feto-Plazentalen-Einheit, für die Ziegenhaltung (Sindermann, 1991; Holtz, 1992) sowie für andere landwirtschaftliche Nutztierarten (Möstl et al., 1983; Möstl et al., 1984; Bamberg et al., 1984; Bamberg et al., 1986; Choi, 1987; Choi et al., 1985; Choi et al., 1987; Sist et al., 1987; Palme et al., 1989; Desaulniers et al., 1989; Bamberg und Schwarzenberger, 1990; Schwarzenberger et al., 1991) eine erwägenswerte Möglichkeit. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Östrogenen zeigten, dass eine Ausscheidung über den Kot nach 12 bis 24 Stunden zu erwarten ist (Adams et al., 1994; Palme et al., 1996). Ab dem 49. Trächtigkeitstag können mittels Östronsulfatbestimmung im Serum und in der Milch Trächtigkeiten mit einer Sicherheit von 100% festgestellt werden. Die Gesamtöstrogenbestimmung im Ziegenkot zur Trächtigkeitsfeststellung kann ab dem 56. Tag mit einer Genauigkeit von 96% angewendet werden (Murray und Newstead, 1988; Sindermann et al., 1992).

Die Bestimmung unkonjugierter Gesamtöstrogene in Blut, Milch, Harn und Kot könnte als ein relativ früheres Trächtigkeitsdiagnoseverfahren im Vergleich zum Nachweis einzelner Östrogene von Nutzen sein. Die Östrogenbestimmung im Kot und Harn ist ein zuverlässiges, nicht invasives Verfahren. Die Kotproben sind einfach zu entnehmen und müssen nicht besonders gelagert werden. Deshalb ist die Östrogenbestimmung im Kot dort eine gute Alternative, wo man keine Blutproben entnehmen oder konservieren kann. Aussagen über Anzahl, Geschlecht oder Gewicht der Lämmer können aber nicht getroffen werden.

5. Zusammenfassung

Pregnancy-associated Glycoprotein (PAG) und Östrogene werden in der Plazenta synthetisiert und bieten, eingesetzt zur Trächtigkeitsdiagnose, einen direkten Hinweis auf das Vorhandensein lebender Feten.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Bestimmung der Plasmakonzentration des „pregnancy-associated glycoprotein“ (PAG) im Verlauf der Trächtigkeit beim Schaf und deren Eignung zur Trächtigkeitsdiagnose. Diese wurde während der Trächtigkeit und 4 Wochen nach der Geburt bei verschiedenen Schafrassen untersucht. Die Untersuchung umfasste 66 tragende Mutterschafe, 18 der Rasse Schwarzköpfiges Fleischschaf, 41 Rhönschafe und 7 Dorper-Kreuzungen sowie 25 vergleichbare nicht trächtige Kontrolltiere. Die PAG-Bestimmung im Blutplasma erfolgte mittels Radioimmunassay (RIA) mit dem Antikörper caPAG₅₅₊₅₉.

Beginnend 2 Wochen nach Einführung der Böcke in die Herde bis 4 Wochen nach der Ablammung wurde den Tieren durch Punktion der Vena jugularis in wöchentlichen Abständen jeweils 5 ml Blut abgenommen. Im entsprechenden Zeitraum wurde den Kontrolltieren einmal wöchentlich Blut entnommen.

Die PAG-Konzentration der nicht trächtigen Kontrolltiere lag während des gesamten Versuchszeitraums bei 1.46 (SEM 0.08) ng/ml. Der Verlauf der PAG-Konzentration im Blutplasma der Mutterschafe zeigte einen Anstieg von ursprünglich 1.1 (SEM 0.1) auf 3.0 (SEM 0.3) ng/ml in der 3. Trächtigkeitswoche, und erhöhte sich in der 4. Woche weiter auf 11.5 (SEM 0.8) ng/ml. Letzterer Konzentrationsanstieg ist für eine mögliche Nutzung zur Trächtigkeitsdiagnose von Bedeutung. Bei 64 von 66 (97%) trächtigen Mutterschafen waren die PAG-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt fünf Standardabweichungen über dem Mittelwert nicht trächtiger Tiere. Ein weiterer gradueller Anstieg erfolgte zwischen der 5. (17.3, SEM 0.8 ng/ml) und 10. Trächtigkeitswoche (26.9, SEM 1.5 ng/ml). Von der 11. (22.9, SEM 1.2 ng/ml) bis zur 14. Trächtigkeitswoche (20.6, SEM 1.0 ng/ml) fiel die durchschnittliche PAG-Konzentration geringfügig ab und blieb auf diesem Niveau bis zu einen erneuten Anstieg auf 28.4 (SEM 1.3) ng/ml in der 16. Woche bzw. 36.6 (SEM 2.0) ng/ml in der 19. Woche.

Ein weiterer drastischer Anstieg der PAG-Konzentration auf 56.0 (SEM 4.8) bzw. 89.2 (SEM 7.4) ng/ml erfolgte während der 20. und 21. Trächtigswoche. Nach erfolgter Geburt fiel die PAG-Konzentration in der ersten Woche steil ab auf 25.0 (SEM 2.1) ng/ml, um 4 Wochen nach der Geburt bei allen Tieren Basalniveau (2.6, SEM 0.2) ng/ml zu erreichen.

Generell unterschied sich der PAG-Verlauf bei zwillings- (n=18) und drillingtragenden Müttern (n=1) nicht von dem einlingstragender Müttern (n=45), doch war die durchschnittliche PAG-Konzentration bei den Mehrlingen ab der 8. Trächtigswoche erhöht. Der Unterschied von zwillings- zu einlingstragenden Müttern war ab der 12. Trächtigswoche statistisch signifikant ($P < 0.05$). Insbesondere der Konzentrationsanstieg zum Ende der Trächtigkeit, in der 20. und 21. Woche, war bei zwillings- und drillingtragenden Müttern deutlicher ausgeprägt (82.2 und 134.3 bzw. 94.9 und 214.4 in der 20. bzw. 21. Woche, $P < 0.01$).

Ein statistisch signifikanter Einfluss der genetisch sehr unterschiedlichen Schafrassen auf den PAG-Gehalt im Blutplasma liess sich nicht erkennen (27.1 (SEM 1.4), 27.3 (SEM 1.0) bzw. 22.2 (SEM 2.6) ng/ml bei 18 Schwarzköpfigen Fleischschafen, 41 Rhönschafen bzw. 7 Dorper-Kreuzungen).

Ebenso wenig eben bestand bei einlingstragenden Müttern ein signifikanter Einfluss des Geschlechts und Gewichts der Lämmer. Unter den Mutterschafen befanden sich sowohl Zutreter als auch Tiere, die bereits mehrmals gelammt hatten. Zwischen Gruppen unterschiedlicher Anzahl Ablammungen bestanden keine signifikante Unterschiede. Ein signifikanter Einfluss ($P < 0.05$) ging jedoch von der Anzahl getragener Lämmer aus. Insgesamt betrug die PAG-Konzentration im Blutplasma von Einlingen (n=45) 24.0 (SEM 0.8) ng/ml, während sie bei Zwillingen (n=18) 32.3 (SEM 1.8) ng/ml betrug ($P < 0.05$).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Gesamtöstrogen-Gehalt in Kot, Harn und Blut von zwischen 110 und 130 Tage tragenden Ziegen bestimmt. Unter dem Gesichtspunkt einer Nutzung der Gesamtöstrogenkonzentration im Kot zur Trächtigkeitsfeststellung wurde der Einfluss von Lagerungsdauer und -temperatur auf die Östrogenkonzentration im Kot untersucht.

Bei 22 zwischen dem 110. und 130. Tag trächtige Ziegen der Rasse Buren wurde die Konzentration unkonjugierter Gesamtöstrogene in Kot, Harn und Blut mittels Enzymimmunoassay (EIA) mit kompetitiver Doppelantikörpertechnik untersucht.

Die Kotproben wurden aus dem Rektum entnommen und sofort in Portionen von ca. 5 g aufgeteilt. Die Proben wurden zufallsmässig den jeweiligen Lagerungsdauern (0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 und 192 h) bzw. Lagerungstemperaturen (-20, 4, 20 und 40°C) zugeordnet.

Die gemessenen Konzentrationen in ungetrocknetem Kot bewegten sich zwischen 764.0 und 7840.0 ng/g, im Mittel lagen sie bei 2585.8 (SEM 308.0) ng/g. Im zeitgleich gewonnenen Harn bewegte sie sich zwischen 475.6 und 15687.5 ng/ml, im Mittel bei 3959.3 (SEM 775.2) ng/ml. Im Blutserum lagen sie zwischen 6.4 und 27.6 ng/ml, mit einem Mittel von 13.9 (SEM 1.3) ng/ml. Die Östrogenkonzentration im Serum betrug im Mittel nur 0.54% dessen was im Kot, und 0.35% dessen was im Harn gemessenen wurde. Das bedeutet gegenüber Blutserum eine ca. 180fach bzw. 280fach höhere Gesamtöstrogenkonzentration im Kot bzw. Harn. Die Korrelationen zwischen der Östrogenkonzentration in Serum mit der in Kot ($r = -0.19$) und in Harn ($r = 0.07$) waren nicht signifikant.

Kotproben, die sofort nach der Gewinnung tiefgefroren wurden, wiesen die geringste Gesamtöstrogenkonzentration auf (2585.8, SEM 308.0 ng/g). Bei Proben, die 3, 6, 12, bzw. 192 h bei 4°C gelagert wurden, waren die Mittelwerte für die Gesamtöstrogenkonzentration 2847.7 (SEM 319.6), 3095.5 (SEM 367.4), 3376.8 (SEM 321.6) bzw. 6932.3 (SEM 599.6) ng/g Kot. Dieser Anstieg der Messwerte war noch deutlicher bei Proben die bei höheren Temperaturen gelagert wurden. Beispielsweise betrug der Mittelwert der Gesamtöstrogenkonzentration in Kot, der für 3 Stunden bei 40°C gelagert wurde, 3424.2 (SEM 404.3) ng/g, und in Kot der 192 Stunden bei 40°C gelagert wurde, 8677.7 (SEM 655.2) ng/g.

Nach Korrektur für lagerungsbedingte Feuchtigkeitsverluste der Kotproben (für 192 h bei 40°C beispielsweise ein Gewichtsverlust von 60%), waren die Differenzen zwar trotz erheblicher tierindividueller Varianz noch signifikant ($P < 0.01$), doch gering. Anzahl, Geburtsgewicht und Geschlecht der Lämmer übten ebensowenig einen Einfluss aus wie die Anzahl Lammungen und das Gewicht der Mutterziegen ($P > 0.05$).

Abschließend, kann festgestellt werden, dass der Einfluss der Lagerungsdauer und –temperatur von Ziegenkot auf den Gesamtgehalt dekonjugierter Östrogene im Hinblick auf eine Anwendung zur Trächtigkeitsdiagnose unerheblich ist, sofern der lagerungsbedingte Feuchtigkeitsverlust berücksichtigt wird. Folglich kann von einer Eignung der Plasma-PAG-Konzentration beim Schaf ab 4 Wochen nach der Belegung und der Konzentration unkonjugierter Gesamtöstrogene im Kot der Ziege, selbst bei Lagerung im unkonservierten Zustand, zu einer zuverlässigen Trächtigkeitsfeststellung ausgegangen werden.

6. Summary

Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and estrogens are synthesized in the placenta and may serve as a means of diagnosing pregnancy and the presence of live fetuses.

Part 1 of this thesis deals with the assessment of the plasma concentration of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in the course of pregnancy in sheep. PAG profiles throughout pregnancy and 4 weeks after parturition were established for various breeds of sheep using a radioimmunoassay (RIA) with the heterologous antibody caPAG₅₅₊₅₉. The 66 parous pregnant ewes monitored belonged to the breeds Blackheaded German Mutton (BGM) (n=18), Rhoeun (n=41) and Dorper x BGM crosses (n=7); 25 non-mated ewes of comparable genetic stock served as controls.

Weekly blood samples (5 ml) were collected from the jugular vein into test tubes containing 4 drops of sodium citrate (38%) beginning two weeks after introduction of the rams into the herd and extending until four weeks after parturition. The time of conception was deduced from the time of parturition, assuming a pregnancy period of 149 days, typical for the herd. Litter size, birth weight and sex of lambs were recorded.

The PAG concentration of non-pregnant ewes was consistently 1.46 (SEM 0.08) ng/ml. The general pattern displayed consists of a distinct rise in PAG concentration from 1.1 (SEM 0.1) to 3.0 (SEM 0.3) ng/ml during the 3rd week of gestation and increased to 11.5 (SEM 0.8) ng/ml during the 4th week. This increase is of relevance for conducting a pregnancy diagnosis. At the 9th week there was further gradual increase to almost 25 ng/ml. This level was maintained until the 17th week, followed by a progressive increase culminating in a rapid surge during the last two weeks preceding parturition (45.5 and 98.9 ng/ml, respectively). Immediately after parturition, the concentration dropped sharply to mid-pregnancy-levels (25 ng/ml), followed by a gradual decline to near 2 ng/ml 4 weeks after lambing in the majority of the animals. Only 7 of 64 ewes still had levels between 4.2 and 9.0 ng/ml at that stage.

Ewes were diagnosed as pregnant when PAG concentrations exceeded that of non pregnant ewes by 5 standard deviations. This was possible in 64 of 66 (97%) pregnant ewes at week 4 of gestation.

The general PAG course did not differ between single-bearing (n=45), twin-bearing (n=18) and triplet-bearing (n=1) ewes. However, from the 8th gestation week onwards, PAG levels differed. At 12 weeks the difference between single-bearing and twin-bearing ewes was statistically significant ($P < 0.05$). At 20 and 21 weeks of gestation, the increase in PAG concentrations of twin-bearing and triplet-bearing ewes over ewes bearing a single lamb was more pronounced (82.2 to 134.3 and 94.9 to 214.4, respectively, $P < 0.01$).

The effect of breed of ewe was not significant: 27.1 (SEM 1.4), 27.3 (SEM 1.0) and 22.2 (SEM 2.6) ng/ml for BGM, Rhoen and Dorper x BGM, respectively. Nor was the effect of breed of male (BGM, Wiltshire Horn, Dorper): 28.0 (SEM 1.3), 25.6 (SEM 1.4) and 26.2 (SEM 1.3) ng/ml, respectively.

There was no significant effect of parity of the ewes: for 11 first, 20 second, 4 third, 6 fourth, 13 fifth, 2 eighth and 7 ninth litter ewes, respectively, plasma PAG levels were 26.5 (SEM 1.7), 26.8 (SEM 1.5), 25.9 (SEM 2.3), 24.4 (SEM 2.2), 28.0 (SEM 1.8), 20.0 (SEM 2.1) and 28.5 (SEM 2.1) ng/ml. There was also no significant effect of sex of lamb or birth weight: 4.9 (SEM 0.02) kg for 25 males and 5.0 (SEM 0.03) kg for 20 females. The correlations between birth weight and plasma PAG level were $r = 0.16$ for single lamb-bearing and $r = 0.05$ for twin-bearing ewes, respectively, neither of which was significant ($P > 0.05$).

There was, however, a significant ($P < 0.05$) difference in mean plasma PAG concentration between the 45 single- and 18 twin-bearing ewes: 24.0 (SEM 0.8) and 32.3 (SEM 1.8) ng/ml, respectively.

In Part 2 of this thesis, unconjugated total estrogens were measured in feces, urine and blood of 22 does pregnant 110 to 130 days. The effect of storage time and storage temperature of feces was examined to assess the practicability of fecal estrogen concentration as a means of pregnancy detection.

In 22 Boer goat does, pregnant 110th to 130th days, the concentrations of total unconjugated estrogens in feces, urine and blood were analysed by means of enzyme immunoassay (EIA) with competitive double antibody technique.

Feces was collected from the rectum. Samples of 5 g were stored for 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 or 192 h at temperatures of -20, 4, 20 and 40°C. Concentrations in moist feces were 764.0 to 7840.0 ng/g, the mean being 2585.8 (SEM 308.0) ng/g. Urine, collected on the same day, had a content of 475.6 to 15687.5 ng/ml with a mean of 3959.3 (SEM 775.2) ng/ml. In corresponding blood samples, serum concentrations were between 6.4 and 27.6 ng/ml, with a mean of 13.9 (SEM 1.3) ng/ml. The estrogen concentration in serum amounted to 0.54% of that in feces, and 0.35% of that in urine. This means a 180fold concentration in feces and a 280fold concentration in urine, compared to blood levels. The correlations between estrogen concentration in serum and feces was $r = -0.19$, between estrogen concentration in serum and urine $r = 0.07$ ($P > 0.05$).

Feces samples frozen immediately after collection showed the slightest estrogen concentrations (2585.8, SEM 308.0 ng/g). In samples stored at 4°C for 3, 6, 12 or 192 h, total estrogen concentrations were 2847.7 (SEM 319.6), 3095.5 (SEM 367.4), 3376.8 (SEM 321.6) and 6932.3 (SEM 599.6) ng/g feces, respectively. The increases were even more evident in samples stored at higher temperatures. The total estrogen concentration in feces stored for 3 hours at 40°C was 3424.2 (SEM 404.3) ng/g, whereas in feces stored for 192 hours at 40°C it amounted to 8677.7 (SEM 655.2) ng/g.

When correcting for loss of moisture during storage (e.g. samples stored for 192 h at 40°C lost about 60% of their weight) the differences among storage groups were largely reduced though statistically significant ($P < 0.01$). Individual differences were considerable. The effects of number, sex and weight of kids as well as parity and weight of doe were not statistically significant ($P > 0.05$). By way of conclusion it may be stated that the effect of storage duration and temperature on total unconjugated estrogen content of feces is rather insignificant, which

may be considered favorable for the utilization of total estrogen concentration in feces as a means of pregnancy detection as long as the concentrations are related to the dry matter content of the feces.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, N.R., Abordi, J.A., Briegel, J.R., Sanders, M.R., 1994. Effect of diet on the clearance of estradiol-17 β in the ewe. *Biol. Reprod.* 51, 668-674.
- Agwu, J.O., Holtz, W., 1986. Die Anwendung des Progesterontests zur Fruchtbarkeitsüberwachung bei Ziegen. *Der Ziegenzüchter.* 2, 3, 17-19.
- Aigner, A., Neumann, S., 1997. *Immunchemie.* Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- Atkinson, Y.H., Gogolin-Ewens, K.J., Hounsel, E.F., Davies, M.J., Brandon, M.R., Seamark, R.F., 1993. Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. *J. Biol. Chem.* 268, 26679-26685.
- Austin, K.J., Sasser, R.G., King, C.P., Vierk, J.E., Hansen, T.R., 1997. Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 56 (suppl 1) 122 (Abstr.).
- Bamberg, E., Choi, H.S., Möstl, E., 1986. Östrogenbestimmung im Kot zur Trächtigkeitsdiagnose bei Pferd, Rind, Schwein, Schaf, und Ziege. *Tierärztl. Umschau.* 41, 406-408.
- Bamberg, E., Choi, H.S., Möstl, E., Scharf, A., 1985. Applicability of estrogen determination in feces to the diagnosis of pregnancy in cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 32, 119-122.
- Bamberg, E., Schwarzenberger, F., 1990. Fecal steroid assay for monitoring of estrous cycle and pregnancy. In: Kaneko, J.J (ed), *Proc IVth Cong Int Soc Anim Clin Biochem.* Davis: Univ California. 95-99.
- Band, V., Kharbanda, S.M., Murugesan, K., Farooq, A., 1987. Steroid production in vitro by granulosa, theca, and luteal cells from goat ovaries. *Biol. Reprod.* 36, 799-806.
- Beckers, J-F., Wouters-Ballman, P., Ectors, F., 1988. Isolation and radioimmunoassay of a bovine pregnancy specific protein. *Theriogenology* 29, 219 (Abstr.).
- Beckers, J-F., Dewulf, M., Verstegen, J., Wouters-Ballman, P., Ectors, F., 1988. Isolation of a bovine chorionic gonadotrophin (bCG). *Theriogenology* 29, 219 (Abstr.).
- Beckers, J-F., De Coster, R., Wouters-Ballman, P., Fromont-Lienard, Ch., Van der Zwalmen, P., Ectors, F., 1982. Dosage radioimmunologique de l'hormone placentaire somatotrope et mammotrope bovine. *Ann. Méd. Vét.* 126, 9-21.
- Benitez-Ortiz, W., 1992. Diagnostic de gestation et étude de la mortalité embryonnaire chez les ruminants par dosage de la pregnancy associated glycoprotein (PAG). Ph.D. thesis. Institute de Médecine Tropicale Prince Léopold. Antwerp. Belgium.

- Billings, H.J., Katz, L.S., 1999. Facilitation of sexual behavior in French-Alpine goats treated with intravaginal progesterone-releasing devices and estradiol during the breeding and nonbreeding seasons. *J. Anim. Sci.* 77, 2073-2078.
- Borjesson, D.L., Boyce, W.M., Gardner, I.A., DeForge, J., Lasley, B., 1996. Pregnancy detection in bighorn sheep (*Ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. *J. Wildlife Dis.* 32, 67-74.
- Bostedt, H., Berchtold, M., Grassler, R., 1972. Pregnancy diagnosis in sheep based on cervical mucus examination. *Schweiz Arch. Tierheilkd.* 114, 119-128.
- Bostedt, H., Dedié, K., 1996. Schaf und Ziegenkrankheiten. 2. Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. S. 463.
- Brockmann, D.K., Whitten, P.L., 1996. Reproduction in free-ranging *Propithecus verreauxi*: Estrus and the relationship between multiple partner matings and fertilization. *Am. J. Phys. Anthropol.* 100, 57-69. In: Whitten, P.L., Brockman, D.K., Stavisky, R.C., 1998. Recent Advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. *Yearbook Phys. Anthropol.* 41, 1-23.
- Brown, J.L., Wildt, D.E., Graham, L.H., Byers, A.P., Collins, L., Barrett, S., Howard, J.G., 1995. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. *Biol. Reprod.* 53, 93-102.
- Butler, J.E., Hamilton, W.C., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Hass, G.M., Williams, R.J., 1982. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.* 26, 916-925.
- Challis, J.R.G., Linzell, J.L., 1971. The concentrations of total unconjugated oestrogens in the plasma of pregnant goats. *J. Reprod. Fert.* 26, 401-404.
- Challis, J.R.G., Linzell, J.L., 1973. Oestrone metabolism in pregnant and lactating goats. *J. Endocr.* 57, 451-457.
- Chan, J.S.D., Robertson, H.A., Friesen, H.G., 1978. Maternal and fetal concentrations of ovine placental lactogen measured by radioimmunoassay. *Endocrinology* 102, 1606-1613.
- Chapeau, C., King, G.J., Bamberg, E., 1993. Fecal estrogens in one primate and several ungulate species during various reproductive stages. *Anim. Reprod. Sci.* 34, 167-175.
- Chard, T., 1989. An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. 3rd. edn., Elsevier, Amsterdam, p. 272.
- Chiang, C.S., 1987. A linear method for determining specific activity of tracers in radioimmuno-assay. *Clin Chem.* 37, 1245-1247.

- Choi, H.S., 1987. Immunologische Bestimmung von Sexualsteroiden zur Fertilitätskontrolle bei Rind, Schwein und Pferd. Wien. Tierärztl. Mschr. 74, 14-22.
- Clark, J.H., Schrader, W.T., O'Malley, B.W., 1985. „Mechanisms of steroid hormone action“. In: William's Textbook of Endocrinology, Saunders, Phila. pp. 33-75.
- Cole, H.H., Hart, G.H., 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. Am. J. Physiol. 93, 57-68.
- Colosi, P., Thordarson, G., Hellmiss, R., Sing, K., Forsyth, I.A., Gluckman, P., Wood, W.I., 1989. Cloning and expression of ovine placental lactogen. Mol. Endocrinol. 3, 1462-1469.
- Cordoba, M.C., Sartori, R., Fricke, P.M., 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. J. Dairy Sci. 84, 1884-1889.
- Coubrough, C.A., Castell, M.C., 1998. Fetal sex determination by ultrasonically locating the genital tubercle in ewes. Theriogenology 50, 263-267.
- Currie, W.B., Card, C.E., Michel, F.J., Ignatz, G., 1990. Purification, partial characterization, and development of a specific radioimmunoassay for goat placental lactogen. J. Reprod. Fert. 90, 25-36.
- Currie, W.B., Wong, M.S.F., Cox, R.J., Thorburn, G.D., 1973. Spontaneous or dexamethasone induced parturition in the sheep and goat: changes in plasma concentrations of maternal prostaglandin F and foetal oestrogen sulphate. Mem. Soc. Endocr. 20, 95-118.
- Desaulniers, D.M., Goff, A.K., Betteridge, K.J., Rowell, J.E., Flood, P.F., 1989. Reproductive hormone concentrations in faeces during the oestrous cycle and pregnancy in cattle (*Bos taurus*) and muskoxen (*Ovibos moschatus*). Can. J. Zool. 67, 1148-1154.
- Dhinsda, D.S., Metcalfe, J., Resko, J.A., 1981. Oestrogen concentrations in systemic plasma of pregnant pygmy goats. J. Reprod. Fert. 62, 99-103.
- Dickie, M.B., Holzmann, A., 1992. The use of rapid progesterone tests (Serozyme-Progesterone, Ovucheck) for the diagnosis of pregnancy in Austrian mountain sheep. Zentralbl. Veterinarmed. A. 39, 525-530.
- Dionysius, D.A., 1991. Pregnancy diagnosis in dairy goats and cows using progesterone assay kits. Aust. Vet. J. 68, 14-16.
- Dore, J.J.Jr., Kattesh, H.G., Godkin, J.D., 1996. Isolation and identification of porcine embryonic basic protein as a fragment of pregnancy-associated glycoprotein-2. Int. J. Biochem. Cell Biol. 28, 1249-1255.

- Dosogne, H., Burvenich, C., Freeman, A.E., Kehrl, M.E., Detilleux, J.C., Sulon, J., Beckers, J-F., Hoeben, D., 1999. Pregnancy-associated glycoprotein and decreased polymorphonuclear leukocyte function in early post-partum dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 47-54.
- Dosogne, H., Massart-Leen, A.M., Burvenich, C., 2000. Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480, 295-305.
- Drion, P.V., Beckers, J.F., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J.Y., Lonergan, P., 1997. Regolazione della crescita follicolare e luteinica. *SUMMA. Riproduzione dei ruminanti.* 5-16.
- Duello, T.M., Byatt, J.C., Bremel, R.B., 1986. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology.* 119, 1351-1355.
- El Amiri, Remy, B., Souza, N.M., Gerardin-Otthiers, N., Desbuleux, H., Perényi, Z., Banga Mboko, H., Beckers, J-F., 2002. Purification and characterization of a pregnancy-associated glycoprotein (ovPAG-6) from sheep placenta removed between 66 to 100 days of gestation. *Biotechnol. Agron. Environ.* 6, 11 (Abstr.).
- Engeland, I.V., Ropstad, E., Andresen, O., Eik, L.O., 1997. Pregnancy diagnosis in dairy goats using progesterone assay kits and oestrous observation. *Anim. Reprod. Sci.* 47, 237-243.
- Engeland, I.V., Ropstad, E., Kindahl, H., Andresen, O., Waldeland, H., Tverdal, A., 1999. Foetal loss in dairy goats: function of the adrenal glands, corpus luteum and the foetal-placental unit. *Anim. Reprod. Sci.* 55, 205-222.
- Engvall, E., Pearlmann, P., 1971. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8, 871-874.
- Fernández-Arias, A., Alabart, J.L., Folch, J., Beckers, J.F., 1999. Interspecies pregnancy of spanish ibex (*Capra pyrenaica*) fetus in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy-associated glycoprotein. *Theriogenology* 51, 1419-1430.
- Fraser, A.F., Robertson, J.G., 1968. Pregnancy diagnosis and detection of foetal life in sheep and pigs by an ultrasonic method. *Br. Vet. J.* 124, 239-244.
- Gadsby, J.E., Burton, R.D., Heap, R.B., Perry, J.S., 1976. Steroid metabolism and synthesis in early embryonic tissue of pig, sheep and cow. *J. Endocr.* 71, 45-46.
- Gajewski, Z., Beckers, J-F., Melo de Sousa, N., Thun, R., Sulon, J., Faundez, R., 1999. Determination of pregnancy associated glycoprotein concentrations in sheep a retrospective study. *Postepy Biologii Komórki.* 26, 89-96.
- Gan, X., Xie, S., Green, J., Roberts, R.M., 1997. Identification of transcripts for pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in carnivora and perissodactyla. 30th annual meeting Portland, Oregon, USA. *Biol. Reprod.* 56 (suppl 1), 431 (Abstr.).

- Gandy, B., Tucker, W., Ryan, P., Williams, A., Tucker, A., Moore, A., Godfrey, R., Willard, S., 2001. Evaluation of the early conception factor (ECFTM) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 56, 637-647.
- Garbayo, J.M., Green, J.A., Manikkam, M., Beckers, J-F., Kiesling, D.O., Ealy, A.D., Roberts, R.M., 2000. Caprine pregnancy-associated glycoproteins (PAG): their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 311-322.
- Garbayo, J.M., Remy, B., Alabart, J.L., Folch, J., Wattiez, R., Falmagne, P., Beckers, J-F., 1998. Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biol. Reprod.* 58, 109-115.
- Ghannam, S.A., Bosc, M.J., Du Mesnil du Buisson, F., 1972. Examination of vaginal epithelium of the sheep and its use in pregnancy diagnosis. *Am. J. Vet. Res.* 33, 1175-1185.
- Glatzel, P.S., 1999. Feasibility of detecting steroid hormones in cattle feces for monitoring ovarian function. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere.* 27, 36-40.
- Goes de Pinho, T., 1995. Untersuchungen zum Verlauf freier und konjugierter Östrogene in Blutplasma, Kot und Urin während der Trächtigkeit des Rindes. Diss. Gießen.
- González, F., Sulon, J., Calero, P.O., Batista, M., Gracia, A., Beckers, J-F., 2001. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats. *Theriogenology* 56, 671-676.
- González, F., Sulon, J., Garbayo, J.M., Batista, M., Cabrera, F., Calero, P.O., Gracia, A., Beckers, J-F., 1999a. Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology* 52, 717-725.
- González, F., Sulon, J., Garbayo, J.M., Batista, M., Cabrera, F., Calero, P.O., Gracia, A., Beckers, J-F., 1999b. Diagnóstico de gestación en la cabra por determinación de las concentraciones de proteínas asociadas a la gestación (PAG). VIII Jornadas sobre Producción Animal, ITEA. 20, 681-683
- González, F., Sulon, J., Garbayo, J.M., Batista, M., Cabrera, F., Calero, P.O., Gracia, A., Beckers, J-F., 2000. Secretory profiles of pregnancy-associated glycoproteins at different stages of pregnancy in the goat. *Reprod. Dom. Anim.* 35, 79-82.
- Gorski, J., Erb, R.E., 1959. Characterization of estrogens in the bivariate. *Endocrinology.* 64, 707.
- Green, J.A., Xie, S., Newman, A., Szafranska, B., Roberts, R.M., Baker, C.B., McDowell, K., 1994. Pregnancy-associated glycoproteins of the horse. *Biol. Reprod.* 50 (suppl 1), 152 (Abstr.).

- Green, J.A., Xie, S., Szafranska, B., Gan, X., Newman, A.G., McDowell, K., Roberts, R.M., 1999. Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta. *Biol. Reprod.* 60, 1069-1077.
- Green, J.A., Xie, S., Quan, X., Bao, B., Gan, X., Mathialagan, N., Beckers, J-F., Roberts, M., 2000. Pregnancy-associated bovine and ovine Glycoproteins exhibit spatially and Temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol. Reprod.* 62, 1624-1631.
- Green, J.A., Xie, S., Roberts, M., 1998. Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Rev. Reprod.* 3, 62-69.
- Grunert, E., Ahlers, D., Heuwieser, W., 1989. The role of estrogens in the maturation process of the bovine placenta. *Theriogenology* 31, 1081-1091.
- Guilbault, L.A., Beckers, J-F., Lapierre, S., Zoli, A.P., Benitez-Ortiz, W., Roy, G.L., 1991. Peripartum concentration of placental protein hormones (bPL and bPAG) in Holstein and Hereford recipients carrying pubered Holstein fetuses. *Theriogenology* 35, (suppl 1), 208 (Abstr.).
- Guilbault, L.A., Beckers, J-F., Roy, G.L., Grasso, F., 1988. Plasma concentrations of bovine placental lactogen, prolactin and prostaglandins during the periparturient period in Ayrshire heifers bearing different breeds of fetus. *Theriogenology* 29, 255 (Abstr.).
- Guruprasad, K., Blundell, T.L., Xie, S., Green, J., Szafranska, B., Nagel, R.J., McDowell, K., Baker, C.B., Roberts, R.M., 1996. Comparative modelling and analysis of amino acid substitutions suggests that the family of pregnancy-associated glycoprotein includes both active and inactive aspartic proteinases. *Protein Eng.* 9, 849-856.
- Hayden, T.J., Thomas, C.R., Forsyth, I.A., 1979. Effect of number of young born (litter size) on milk yield of goats: Role for placental lactogen. *J. Dairy Sci.* 62, 53-57.
- Heistermann, M., Agil, M., Büthe, A., Hodges, J.K., 1998. Metabolism and excretion of oestradiol-17 β and progesterone in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Anim. Reprod. Sci.* 53, 157-172.
- Hock, B., Seifert, M., 1998. Monitoring-Strategien für oestrogene Wirkstoffe. *BIOforum.* 690-696.
- Hoeben, D., Burvenich, C., Massart-Leen, A.M., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D., Beckers, J-F., 1999. In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68, 229-240.
- Hoeben, D., Monfardini, E., Opsomer, G., Burvenich, C., Dosogne, H., De Kruif, A., Beckers, J-F., 2000. Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *J. Dairy Res.* 67, 249-259.

- Hoffmann, B., 1983. Untersuchungen zur Steroidhormonsynthese in der Plazenta des Rindes. Wien. Tierärztl. Mschr. 70, 224-228.
- Hoffmann, B., Goes de Pinho, T., Schuler, G., 1997. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 105, 296-303.
- Hoffmann, B., Wagner, W.C., Hixon, J.E., Bahr, J., 1979. Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow. Anim. Reprod. Sci. 2, 253-266.
- Holtz, W., 1982. Die Feststellung der Trächtigkeit bei verschiedenen landwirtschaftlichen Nutztieren mit Ultraschall. Verhandlungsbericht Tagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung. Giessen, Germany. 105-107.
- Holtz, W., 1992. Pregnancy diagnosis through faecal estrogens in goats. First International Symposium on Faecal Steroid Monitoring in Zoo Animals. Rotterdam. 62-67.
- Hulet, C.V., 1969. Pregnancy diagnosing in the ewe using an ultrasonic doppler instrument. J. Anim. Sci. 28, 44-47.
- Hulet, C.V., 1972. A rectal abdominal palpation technique for diagnosing pregnancy in the ewe. J. Anim. Sci. 35, 814-819.
- Humblot, P., 2002. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. Theriogenology 56, 1417-1433.
- Humblot, P., Camous, S., Martal, J., Charlery, J., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sasser, R.G., 1988a. Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. J. Reprod. Fert. 83, 215-223.
- Humblot, P., Camous, S., Martal, J., Charlery, J., Jeanguyot, N., Thibier, M., Sasser, R.G., 1988b. Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. Theriogenology 30, 257-267.
- Humblot, P., De Montigny, G., Jeanguyot, N., Tetedoie, F., Payen, B., Thibier, M., Sasser, R.G., 1990. Pregnancy-specific protein B and progesterone concentrations in French Alpine goats throughout gestation. J. Reprod. Fert. 89, 205-212.
- Irving-Rodgers, H.F., Mussard, M.L., Kinder, J.E., Rodgers, R.J., 2002. Composition and morphology of the follicular basal lamina during atresia of bovine antral follicles. Reproduction. 123, 97-106.
- Janowski, T., Zdunczyk, S., Ras, A., Mwaanga, E.S., 1999. Use of estrone sulfate determination in goat blood for the detection of pregnancy and prediction of fetal number. Tierärztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere. 27, 107-109.

- Jones, C.J.P., Koob, B., Stoddart, R.W., Hoffmann, B., Leiser, R., 1994. Lectin-histochemical analysis of glycans in ovine and bovine near-term placental binucleate cells. *Cell Tissue Res.* 278, 601-610.
- Kahn, W., Achtzehn, J., Kahn, B., Richter, A., Schulz, J., Wolf, M., 1993. Sonography of pregnancy in sheep. II. Accuracy of transrectal and transcutaneous pregnancy diagnosis. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 100, 29-31.
- Kahn, W., Fraunholz, J., Kaspar, B., Pyczak, T., 1990. Sonographic diagnosis of early pregnancy in horses, cattle, sheep, goats, swine, dogs and cats. Standard values and limitations. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 103, 206-211.
- Kaltenbach, C.C., Dunn, T.G., Koritnik, D.R., Tucker, W.F., Batson, D.B., Staigmiller, R.B., Niswender, G.D., 1976. Isolation and identification of metabolites of ¹⁴C-labelled estradiol in cattle. *J. Toxicol. Environmental Health.* 1, 607-616.
- Kaplan, D.H., Katz, L.S., 1994. Exposure to constant photoperiod alters serum prolactin concentrations and behavioral response to estradiol in the ovariectomized goat. *J. Anim. Sci.* 72, 3088-3097.
- Karen, A., Beckers, J-F., Sulon, J., Souza, N.M., Szabados, K., Reczigel, J., Szenci, O., 2002. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Biotechnol. Agron. Environ.* 6, 8 (Abstr.).
- Kaulfuss, K.H., Suss, R., Schenk, P., 1999. Real-time ultrasonographic (B-mode) pregnancy diagnosis in sheep. 4. Results of a field study in Germany. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere.* 27, 74-82.
- Kaulfuss, K.H., Uhlich, K., Brabant, S., Blume, K., Strittmatter, K., 1996a. Real-time ultrasonic pregnancy diagnosis (B-mode) in sheep. 1. Frequent examinations during the first month of pregnancy. *Tierarztl. Prax.* 24, 443-452.
- Kaulfuss, K.H., Zipper, N., May, J., Suss, R., 1996b. Ultrasonic pregnancy diagnosis (B-mode) in sheep. 2. Comparative studies using transcutaneous and transrectal pregnancy diagnosis. *Tierarztl. Prax.* 24, 559-566.
- Kaye, M.M., Fernández, J.M., Walker, R.L., Williams, C.C., 2000. Effects of processing and storage on the measurement of hormones in goat blood. In: 7th International Conference on Goats. Tours, France. 451.
- Kirakofe, G.H., Wright, J.M., Schalles, R.R., Ruder, C.A., Paris, S., Sasser, R.G., 1993. Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 71, 2199-2205.
- Kirkpatrick, J.F., Gudermuth, D.F., Flagan, R.L., McCarthy, J.C., Lasley, B.L., 1993. Remote monitoring of ovulation and pregnancy of Yellowstone bison. *J. Wildl. Manag.* 57, 407-412.

- Klauke, M., Hoffmann, B., 1992. Progesterone and estrogen receptors in the myometrium of the cow during the estrous cycle and pregnancy and of the sheep at the time of parturition. *Anim. Reprod. Sci.* 29, 195-203.
- Kolb, E., 1984. *Biochemie und Pathobiochemie der Fortpflanzung*. Veb Gustav Fischer Verlag Jena. pp. 138-158.
- Küst, D., Schaetz, F., 1983. *Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren*. 5. Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 455-457.
- Kutty, C.I., 1999. Gynecological examination and pregnancy diagnosis in small ruminants using bimanual palpation technique: a review. *Theriogenology* 51, 1555-1564.
- Larter, N.C., Arcese, P., Rajamahendran, R., Cormack Gates, C., 1993. Measurement of immunoreactive progestins excreted in faeces as a potential indicator of pregnancy. *Wildl. Res.* 20, 739-743.
- Larter, N.C., Rajamahendran, R., Sivakumaran, K., 1994. Immunoreactive faecal progestins as indicators of reproductive status. *Vet. Rec.* 134, 474-475.
- Limpach, J., 1985. Metabolisierung und Nachweis von Östrogenen im Kot von Rindern. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 72, 317-318.
- Lindahl, I.L., 1969. Pregnancy diagnosis in dairy goats using ultrasonic Doppler instruments. *J. Dairy Sci.* 52, 529-530.
- Lynch, R.A., Alexander, B.M., Sasser, R.G., 1992. The cloning and expression of the bovine pregnancy specific protein B (bPSPB) gene. *Biol. Reprod.* 46 (suppl 1) 73 (Abstr.).
- Macdonald, I.A., Bokkenheuser, V.D., Winter, J., McLernon, A.M., Mosbach, E.H., 1983. Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Research. Review.* 24, 675-700.
- Martal, J., Djiane, J., 1975. Purification of a lactogenic hormone in sheep placenta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 65, 770-778.
- Martinez, M.F., Bosch, P., Bosch, R.A., 1998. Determination of early pregnancy and embryonic growth in goats by transrectal ultrasound scanning. *Theriogenology* 49, 1555-1565.
- Matsuda-Motomura, D.M., Gartley, C.J., Bellem, A.C., Liptrap, R.M., Madison, V., Goodrowe, K.L., 1995. Endocrine and behavioral events of estrous cyclicity and synchronization in wood bison (*Bison bison athabasca*). *Theriogenology* 43, 273 (Abstr.).
- Mattioli, M., Gaiani, R., Bono, G., Chiesa, F., 1984. Estrone to estrone sulfate conversion and viceversa in bovine placentome. *Arch. Vet. Ital.* 35, 22-26.
- Menchaca, A., Rubianes, E., Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology* 57, 1411-1419.

- Meyer, H.H.D., 1989. Enzymimmunologische Meßverfahren zur Hormonanalytik. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.
- Meyer, H.H.D., 1992. Latest developments in steroid EIA. First International Symposium on Faecal Steroid Monitoring in Zoo Animals. Rotterdam. 2-4.
- Meyer, H.H.D., Hoffmann, S., 1987. Development of a sensitive microtitration plate enzyme-immunoassay for the anabolic steroid trenbolone. Food Addit. Contam. 4, 149-160.
- Meyer, H.H.D., Rohleder, M., Streich, W.J., Göltenboth, R., Ochs, A., 1997. Sexualsteroidprofile und Ovaraktivitäten des Pandaweibchens YAN YAN im Berliner Zoo. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 143-147.
- Memon, M.A., Ott, R.S., 1980. Methods of pregnancy diagnosis in sheep and goats. Cornell Vet. 70, 226-231.
- Möller, R., 1991. Enzymimmunoassays mit zweitem Antikörper für Progesteron und porcinem LH. Diss. Göttingen.
- Mori, J., 1991. Early pregnancy factor in animals. Jap. J. Anim. Reprod. 37, 45-56. In: Takagi et al., 1998. Theriogenology 50, 255-262.
- Morrow, C.J., Monfort, S.L., 1998. Ovarian activity in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) determined by faecal steroid analysis. Anim. Reprod. Sci. 53, 191-207.
- Morton, H., Morton, D.J., Ellendorff, F., 1983. The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig. J. Reprod. Fert. 68, 437-446.
- Morton, H., Nancarrow, C.D., Scaramuzzi, R.J., Evison, B.M., Clunie, G.J.A., 1979. Detection of early pregnancy in sheep by the rosette inhibition test. J. Reprod. Fert. 56, 75-80.
- Möstl, E., Choi, H.S., Wurm, W., Ismail, N., Bamberg, E., 1984. Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 alpha in faeces. Br. Vet. J. 140, 287-291.
- Möstl, E., Lehmann, H., Wenzel, U., 1993. Gestagens in faeces of mink and cats for monitoring corpus luteum activity. J. Reprod. Fert., Suppl. 47, 540-541.
- Möstl, E., Palme, R., Bamberg, E., 1988. Androgens and oestrogens in periparturient cows. J. Reprod. Fert. Abstr. Series 1, 61, 112 (Abstr.).
- Munson, L., Kao, J.J., Schlafer, D.H., 1989. Characterization of glycoconjugates in the bovine endometrium and chorion by lectin histochemistry. J. Reprod. Fert. 87, 509-517.
- Münster, E., 1989. Entwicklung von enzymimmunologischen Meßverfahren auf Mikrotiterplatten zur Bestimmung von Testosteron und Progesteron im Blutplasma. Doktorarbeit. Universität Stuttgart-Hohenheim.
- Murray, R.D., Newstead, R., 1988. Determination of steroid hormones in goats milk and plasma as an aid to pregnancy diagnosis using an ELISA. Vet. Rec. 122, 158-161.

- Nancarrow, C.D., Evison, B.M., Scaramuzzi, R.J., Turnbull, K.E., 1979. Detection of induced death of embryos in sheep by the rosrte inhibition test. *J. Reprod. Fert.* 57, 385-389.
- Niswender, G.D., 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction. Review.* 123, 333-339.
- Ogren, L., Talamantes, F., 1988. Prolactins of pregnancy and their source. *Int. Rev. Cytology.* 112, 1-65.
- Osborn, D.A., Beckers, J-F., Sulon, J., Gassett, J.W., Muller, L.I., Murphy, B.P., Miller, K.V., Marchinton, R.L., 1996. Use of glycoprotein assays of pregnancy diagnosis in white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 60, 388-393.
- Ott, R.S., Braun, W.F., Lock, T.F., Memon, M.A., Stowater, J.L., 1981. A comparison of intrarectal Doppler and rectal abdominal palpation for pregnancy testing in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178, 730-731.
- Padilla, G., Holtz, W., 1999. Pregnancy diagnosis in the Boer goat using transrectal and transabdominal ultrasonography. 32nd Conference on Physiology and Pathology of Reproduction. *Reprod. Dom. Anim.* 34, 31 (Abstr.).
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., Ismail, M.N., 1996. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 43-63.
- Palme, R., Möstl, E., Brem, G., Schellander, K., Bamberg, E., 1997. Faecal metabolites of infused ¹⁴C-progesterone in domestic livestock. *Reprod. Dom. Anim.* 32, 199-206.
- Palter, S.F., Tavares, A.B., Hourvitz, A., Veldhuis, J.D., Adashi, E.Y., 2001. Are estrogens of importance to primate/human ovarian folliculogenesis ? *Endocrine. Reviews.* 22, 389-424.
- Parker, C.W., 1990. „Immunoassays“ in „Methods in Enzymology“. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. 70, pp. 274-279.
- Patel, O.V., Domeki, I., Sasaki, N., Takahashi, T., Hirako, M., Sasser, R.G., Humblot, P., 1995. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy-specific protein B concentrations in the bovine. *Theriogenology* 44, 827-833.
- Patel, O.V., Sulon, J., Beckers, J-F., Takahashi, T., Hirako, M., Sasaki, N., Domeki, I., 1997. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *Eur. J. Endocrinol.* 137, 423-428.
- Patzl, M., Schwarzenberger, F., Osmann, C., Bamberg, E., Bartmann, W., 1998. Monitoring ovarian cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progestagen and oestrogen analysis. *Anim. Reprod. Sci.* 53, 209-219.
- Pennington, J.A., Hoffman, W.F., Schultz, L.H., Spahr, S.L., Lodge, J.R., 1982. Milk progesterone for pregnancy diagnosis in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 65, 2011-2014.

- Perényi, Z.S., Szenci, O., Sulon, J., Drion, P.V., Beckers, J.F., 2002. Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 100-104.
- Plant, J.W., 1980. Pregnancy diagnosis in sheep using a rectal probe. *Vet. Rec.* 106, 305-306.
- Ranilla, M.J., Sulon, J., Carro, M.D., Mantecón, A.R., Beckers, J-F., 1994. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in churra and merino sheep. *Theriogenology* 42, 537-545.
- Ranilla, M.J., Sulon, J., Mantecon, A.R., Beckers, J.F., Carro, M.D., 1997. Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Rum. Res.* 24, 125-131.
- Reimers, T.J., Ullman, M.B., Hansel, W., 1985. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 33, 1227-1236.
- Roberts, R.M., Xie, S., Nagel, R.J., Low, B.G., Green, J., Beckers, J.F., 1995. Glycoproteins of the aspartyl proteinase gene family secreted by the developing placenta. *Adv. Exp. Med. Biol.* 362, 231-240.
- Robertson, H.A., Chan, J.S.D., Hackett, A.J., Marcus, G.J., Friesen, H.G., 1980. Diagnosis of pregnancy in the ewe at mid-gestation. *Anim. Reprod. Sci.* 3, 69-71.
- Robertson, H.A., King, G.J., 1979. Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 55, 463-470.
- Robertson, H.A., Sarda, I.R., 1971. A very early pregnancy test for mammals: ist application to the cow, ewe and sow. *J. Endocr.* 49, 407-419.
- Rodbard, D., 1974. Statistical and quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 10, 1255-1270.
- Rosenfeld, C.S., Wagner, J.S., Roberts, R.M., Lubahn, D.B., 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Review.* 122, 215-226.
- Ruder, C.A., Stellflug, J.N., Dahmen, J.J., Sasser, R.G., 1988. Detection of pregnancy in sheep by radioimmunoassay of sera for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology* 29, 905-912.
- Safar-Hermann, N., Ismail, M.N., Choi, H.S., Möstl, E., Bamberg, E., 1987. Pregnancy diagnosis in zoo animals by estrogen determination in feces. *Zoo Biol.* 6, 189-193.
- Saleh, M., Ahmed, A.S., Nono, A.H., Eissa, H.M., 1988. Radiographic estimation of pregnancy in goats. *Zuchthyg.* 23, 38-42.
- Sangha, G.K., Sharma, R.K., Guraya, S.S., 2002. Biology of corpus luteum in small ruminants. *Small Rum. Res.* 43, 53-64.

- Sasser, R.G., Crock, J., Ruder-Montgomery, C.A., 1989. Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J. Reprod. Fert.* 37, 109-113.
- Sasser, R.G., Ruder, C.A., Ivani, K.A., Butler, J.E., Hamilton, W.C., 1986. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.* 35, 936-942.
- Schiffer, B., Daxenberger, A., Meyer, K., Meyer, H.H.D., 2001. The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promotants in cattle. *Environ. Health Perspect.* 109, 1145-1151.
- Schlenker, G., Müller, W., Glatzel, P., 1998. Continuing studies on the stability of sex steroids in the feces of cows over 12 weeks. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.* 111, 248-252.
- Schlafer, D., 1993. Placental development, structure and function. *Proc. Annual Meeting of Soc. for Theriogenology.* pp. 32-38.
- Schlafer, D.H., Fisher, P.J., Davies, C.J., 2000. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 145-160.
- Schuler, G., 2000. Plazentare Steroide beim Rind: Biosynthese und Beziehungen zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome. *Habilitationsschrift.* Gießen.
- Schwartz, N.B., 1982. Novel peptides in ovarian follicular fluid: Implications for contraceptive development. *Res. Frontiers Fert. Regul.* 2, 1-11.
- Schwarzenberger, F., Patzl, M., Francke, R., Ochs, A., Buitter, R., Schaftenaar, W., De Meurichy, W., 1993. Fecal progesterone evaluations to monitor the estrous cycle and pregnancy in the okapi (*Okapia johnstoni*). *Zoo Biology.* 12, 549-559.
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R., Bamberg, E., 1996a. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 515-526.
- Schwarzenberger, F., Son, C.H., Pretting, R., Arbeiter, K., 1996b. Use of group-specific antibodies to detect fecal progesterone metabolites during the estrous cycle of cows. *Theriogenology* 46, 23-32.
- Schwarzenberger, F., Walzer, C., Tomasova, K., Vahala, J., Meister, J., Goodrowe, K.L., Zima, J., Strauß, G., Lynch, M., 1998. Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Anim. Reprod. Sci.* 53, 173-190.
- Shaw, F.D., Morton, H., 1980. The immunological approach to pregnancy diagnosis: a review. *Vet. Rec.* 106, 268-270.

- Shemesh, M., Ayalon, N., Mazor, T., 1979. Early pregnancy diagnosis in the ewe, based on milk progesterone levels. *J. Reprod. Fert.* 56, 301-304.
- Shideler, S.E., Ortuno, A.M., Moran, F.M., Moorman, E.A., Lasley, B.L., 1993. Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. *Biol. Reprod.* 48, 1290-1298.
- Short, R.V., 1962a. Steroids present in the follicular fluid of the cow. *J. Endocrinol.* 23, 401.
- Short, R.V., 1962b. Steroid concentrations in normal follicular fluid and ovarian cyst fluid from cow. *J. Reprod. Fertil.* 4, 27.
- Sindermann, B., 1991. Östrogensulfatbestimmung im Serum und Östrogenbestimmung im Kot von Ziegen zur Trächtigkeitsfeststellung. Diss. vet. med. Göttingen und Giessen.
- Sindermann, B., Sohnrey, B., Holtz, W., Palme, R., 1992. Pregnancy detection in Goats by faecal oestrogen determination. In: *Recent Advances in Goat Production*, R.R. Lokeshwar (ed.), Nutan Printers, New Delhi, India.
- Sousa, N.M., Garbayo, J.M., Figueiredo, J.R., Sulon, J., Gonçalves, P.B.D., Beckers, J-F., 1999. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Rum. Res.* 1739, 1-11.
- Sousa, N.M., Zongo, M., Pitala, W., Boly, H., Sawadogo, L., Sanon, M., Figueiredo, J.R., Dias Gonçalves, P.B., El Amiri, B., Perènyi, Z., Beckers, J-F., 2002. Pregnancy-associated glycoprotein concentrations during pregnancy and postpartum period in Azawak Zebu cattle. *Theriogenology* (in press).
- Statistical Analysis System Institute., 1989. *SAS/STAT User's Guide*, Release 6.08 TS407 edn., SAS Institute, Cary, NC USA.
- Stryer, L., 1995. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford. 4. Auflage. pp. 721-749.
- Sutherland, S.R., Lindsay, D.R., 1991. Ovariectomized does do not require progesterone priming for oestrous behaviour. *Reprod. Fert. Dev.* 3, 679-684.
- Szafranska, B., Xie, S., Green, J., Roberts, R.M., 1995. Porcine pregnancy-associated glycoproteins: New members of the aspartic proteinase gene family expressed in Trophectoderm. *Biol. Reprod.* 53, 21-28.
- Szenci, O., Beckers, J.F., Humblot, P., Sulon, J., Sasser, G., Taverne, M.A.M., Varga, J., Baltusen, R., Schekk, Gy., 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology* 50, 77-88.

- Takagi, M., Nishimura, K., Oguri, N., Ohnuma, K., Ito, K., Takahashi, J., Yasuda, Y., Miyazawa, K., Sato, K., 1998. Measurement of early pregnancy factor activity for monitoring the viability of the equine embryo. *Theriogenology* 50, 255-262.
- Talamantes, F., Ogren, L., 1988. The placenta as an endocrine organ: polipeptides. In: *The Physiology of Reproduction*. Vol. 2, (E. Knobil & J. Neil et al. Eds) Raven Press Ltd., New York, pp. 2093-2144.
- Tamanini, C., Chiesa, F., Prandi, A., Galeati, G., 1986. Estrone and estrone conjugate plasma levels throughout pregnancy in the goat: their determination as a pregnancy diagnosis test. *Anim. Reprod. Sci.* 11, 35-42.
- Taylor, W., 1971. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitam. Horm.* 29, 201-285.
- Thorburn, G.D., Nicol, D.H., Basset, J.M., Shutt, A.D., Cox, R.J., 1972. Parturition in the goat and sheep: changes in corticosteroids, progesterone, oestrogens and prostaglandin. *F. J. Reprod. Fert. (suppl)* 16, 61-84.
- Trapp, M.J., Slyter, A.L., 1983. Pregnancy diagnosis in the ewe. *J Anim Sci.* 57, 1-5.
- Turner, C.B., Hindson, J.C., 1975. An assessment of a method of manual pregnancy diagnosis in the ewe. *Vet. Rec.* 96, 56-58.
- Tyrrell, R.N., Plant, J.W., 1979. Rectal damage in ewes following pregnancy diagnosis by rectal-abdominal palpation. *J Anim Sci.* 48, 348-350.
- Velle, W., 1958. Studies on estrogens in cattle. The metabolic transformation of estradiol-17 β to estrone and estradiol-17 α in the young calf. *Acta Endocrinol.* 28, 186.
- Velle, W., 1963. Metabolism of estrogenic hormones in domestic animals. *General and Comparative Endocrinology.* 3, 621-635.
- Watt, B.R., Anderson, G.A., Campbell, I.P., 1984. A comparison of six methods used for detecting pregnancy in sheep. *Aust Vet J.* 61, 377-382.
- White, P.J., Garrott, R.A., Kirkpatrick, J.F., Berkeley, E.V., 1995. Diagnosing pregnancy in free-ranging elk using fecal steroid metabolites. *J. Wildl. Dis.* 31, 514-522.
- Whitten, P.L., Brockman, D.K., Stavisky, R.C., 1998. Recent Advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. *Yearbook Phys. Anthropol.* 41, 1-23.
- Willard, J.M., Ruder, C.A., Sasser, R.G., Stellflug, J.N., 1987. Ovine pregnancy specific protein B in the sera of early pregnant and peripartum ewes. *Proc. West. Sect. Amer. Soc. Anim. Sci.* 38, 231-233.

- Willard, S.T., Hughes Jr, D.M., Bringans, M., Sasser, R.G., White, D.R., Jaques, J.T., Godfrey, R.G., Welsh Jr, T.H., Randel, R.D., 1996. Artificial insemination, hybridization and pregnancy detection in sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 46, 779-789.
- Willard, S.T., Sasser, R.G., Jaques, J.T., White, D.R., Neuendorff, D.A., Randel, R.D., 1998. Early pregnancy detection and the hormonal characterization of embryonic-fetal mortality in fallow deer (*Dama dama*). *Theriogenology* 49, 861-869.
- Wilson, I.A.N., 1981. Ovine pregnancy diagnosis: technique in use at the grassland research institute. Technical Report, Grassland Research Institute, Hurley. 28, 41-45.
- Wisdom, G.B., 1976. Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem.* 22, 1243-1255.
- Wooding, F.B., 1992. Current topic: synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*. 13, 101-113.
- Wooding, F.B.P., 1982. The role of binucleate cell in ruminant placental structure. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 31, 31-39.
- Wooding, F.B.P., Flint, A.P.F., 1994. In Lamming G.E (ed) *Pregnancy and Lactation*. Chapman & Hall. London. 233-460.
- Wooding, F.B.P., Flint, A.P.F., Heap, R.B., Morgan, G., Buttle, H.L., Young, I.R., 1986. Control of binucleate cell migration in the placenta of sheep and goats. *J Reprod Fertil.* 76, 499-512.
- Xie, S., Green, J., Bao, B., Beckers, J-F., Valdez, K.E., Hakami, L., Roberts, R.M., 1997. Multiple pregnancy-associated glycoproteins are secreted by day 100 ovine placental tissue. *Biol. Reprod.* 57, 1384-1393.
- Xie, S., Low, B.G., Nagel, R.J., Beckers, J-F., Roberts, R.M., 1991. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm. *Biol. Reprod.* 51, 1145-1153.
- Xie, S., Low, B.G., Nagel, R.J., Kramer, K.K., Anthony, R.V., Zoli, A.P., Beckers, J-F., Roberts, R.M., 1991. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10247-10251.
- Xie, S., Nagel, R.J., Green, J., Beckers, J-F., Roberts, R.M., 1996. Trophoblast-specific processing and phosphorylation of pregnancy-associated glycoprotein-1 in day 15 to 25 sheep placenta. *Biol. Reprod.* 54, 122-129.
- Zarrouk, A., Engeland, I., Sulon, J., Beckers, J.F., 1999. Determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in goats (*Capra hircus*) with unsuccessful pregnancies: a retrospective study. *Theriogenology* 51, 1321-1331.

- Zeim, I., Tainturier, D., Ben Othmen, H., Beckers, J.F., Chemli, J., 1997. Non délivrance et infécondité: intérêts de l'étioproston et du dosage de la PAG1 (Pregnancy Associated Glycoprotein 1) au cours du postpartum chez la vache. *Revue Méd. Vét.* 148, 725-732.
- Zhang, W.C., Nakao, T., Moriyoshi, M., Nakada, K., Ohtaki, T., Ribadu, A.Y., Tanaka, Y., 1999. The relationship between plasma oestrone sulphate concentrations in pregnant dairy cattle and calf birth weight, calf viability, placental weight and placental expulsion. *Anim. Reprod. Sci.* 54, 169-178.
- Zipper, N., Kaulfuss, K.H., May, J., Elze, K., 1997. Real-time ultrasonographic pregnancy diagnosis (B-mode) in sheep. 3. Determination of the number of embryos and fetuses. *Tierarztl. Prax.* 25, 212-222.
- Zoli, A.P., Beckers, J-F., Ectors, F., 1990. Isolation of an ovine pregnancy-specific protein. *Theriogenology* 33 (suppl 1), 366 (Abstr.).
- Zoli, A.P., Beckers, J-F., Ectors, F., 1995. Isolement et caractérisation partielle d'une glycoprotéine associée à la gestation chez la brebis. *Ann. Méd. Vét.* 139, 177-184.
- Zoli, A.P., Beckers, J-F., Wouters-Ballman, P., Closset, J., Falmagne, P., Ectors, F., 1991. Purification and characterization of bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol. Reprod.* 45, 1-10.
- Zoli, A.P., Demez, P., Beckers, J-F., Reznik, M., Beckers, A., 1992a. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. *Biol. Reprod.* 46, 623-629.
- Zoli, A.P., Guilbault, L.A., Delahaut, P; Benítez Ortiz, W., Beckers, J-F., 1992b. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Ist application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.* 46, 83-92.

8. Anhang

8.1. PAG von nicht trächtigen Kontrolltieren

Tabelle A: PAG-Konzentration im Blutplasma von nicht trächtigen Kontrolltieren (n=25).

Proben	Konzentration (ng/ml)
1	1.226
2	0.941
3	1.485
4	1.487
5	2.278
6	1.163
7	1.918
8	1.397
9	2.165
10	1.096
11	1.062
12	1.099
13	0.755
14	0.859
15	1.973
16	1.602
17	0.969
18	2.202
19	2.208
20	0.850
21	2.344
22	1.361
23	1.278
24	1.275
25	1.419
26	1.391
27	2.331
28	1.458
29	1.214
30	1.327
31	0.852
32	1.793
33	1.141
34	1.577
35	1.061
36	1.856
37	1.441
$\bar{x} \pm \text{SEM}$	1.46 (0.08)

8.2. Gesamtöstrogenbestimmung im Kot

Tabelle B: Geräte und Verbrauchsmaterial.

-
- Autoklav (Schütt Göttingen)
 - Bechergläser und Messzylinder aus Glas (100, 250, 1000 und 2000 ml, Brand D-97877 Wertheim)
 - Braune Flaschen (500, 1000 und 2500 ml)
 - Computersoftware (SLT-TECAN GmbH, D-74564 Crailsheim)
 - Digital-pH-Meter, Typ 643 (WTW, D-82362 Weilheim)
 - Dispensette 1-10 ml (Brand D-97877 Wertheim)
 - Feinanalysenwaage 1602 MP (Fa. Sartorius, Göttingen)
 - Gefrierschrank -80°C (GFL, D-3006 Burgwedel)
 - 12-Kanal-Pipette 50-200 µl (Dynatech, Denkendorf)
 - Magnetrührer „Ika-Combimag Ret“ (Janke und Keinkel GmbH & Co. Kg, Staufen)
 - Magnetrührstäbchen (Schütt Göttingen)
 - Mikroliterpipetten 4710 für verschiedene Volumina 2-20, 10-100, 100, 100-1000 µl (Fa. Eppendorf, Hamburg)
 - Mikrotiterplatten (Nunc Immuno Plate Maxi Sorp F96, Nunc GmbH D-65083 Wiesbaden)
 - Mikrotiterplattenphotometer „SUNRISE“ mit Drucker EPSON 1520 (TECAN GmbH D-74564 Crailsheim)
 - Mikrotiterplattenschüttler Heidolph DSG 304/M4 (Bibby Dunn Labortechnik GmbH, D-55758 Asbach)
 - Miniwasher 8 Kanal (FA. Dynatech, Denkendorf)
 - Octadecyl Festphase Kartuschensäulen (C₁₈; J.T. Baker, Vertreter Schütt Göttingen)
 - Pasteurpipetten (Ochs GmbH, D-37120 Bovenden)
 - Reagenzglasschüttler Vortex „Genie TM“ (Fa. Binder und Hobein, Zürich)
 - Röhrchen aus Glas (15 x 100 und 13 x 133 mm, Ochs GmbH, D-37120 Bovenden)
 - Sterilisator (Schütt Göttingen)
 - Szintillations-Flaschen (20 ml) aus Glas mit flachem Boden und Schraubverschluss (φ 24 mm) mit Metalleilage (Schütt Göttingen)
 - Vakuumpumpe für 12 Kartuschensäulen (J.T. Baker, Vertreter Schütt Göttingen)
 - Wasserbadschüttler (Schütt Göttingen)
 - Zentrifuge (Suprafuge 22 Heraeus SEPATECH, D-37520 Osterode)
-

Tabelle C: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g) von 22 trächtigen Ziegen nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2585.8	307.9	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2847.7	319.6	3001.9	323.7	3424.2	404.3
6	-	-	3095.5	367.4	3217.0	347.5	3897.9	481.7
12	-	-	3376.8	321.6	3861.9	477.4	4774.7	586.7
24	-	-	4254.9	500.8	5084.0	624.1	6771.8	649.9
48	-	-	4990.9	513.1	5976.8	531.7	7424.6	564.1
96	-	-	6311.8	538.0	6973.5	539.8	7864.8	721.8
192	-	-	6932.3	599.6	7477.2	590.6	8677.7	655.2

Tabelle D: Für den Feuchtigkeitsverlust korrigierte Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von 22 trächtigen Ziegen nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2585.8	307.9	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2739.5	307.4	2764.7	298.2	2893.4	341.6
6	-	-	2900.4	344.2	2708.2	295.1	2759.2	338.2
12	-	-	3028.9	288.4	2738.1	338.5	2363.3	284.9
24	-	-	3430.2	409.1	2536.9	311.4	2749.3	263.9
48	-	-	3397.8	343.5	2522.2	224.3	2992.1	227.3
96	-	-	3231.6	275.4	2921.9	226.2	3161.6	290.2
192	-	-	3223.5	278.8	3132.9	247.4	3479.6	262.8

Tabelle E: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von einlingtragenden Müttern (n=5) nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2382.0	397.3	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2554.0	462.4	2723.2	414.5	3036.2	567.0
6	-	-	3110.6	581.4	2831.6	497.4	2668.2	497.2
12	-	-	3131.6	712.2	2723.8	580.3	2160.6	411.3
24	-	-	3425.0	567.6	2383.4	493.7	2850.0	531.5
48	-	-	3529.8	682.6	2587.4	525.1	3071.0	539.8
96	-	-	3191.8	547.4	2841.2	473.4	3022.2	550.3
192	-	-	3099.2	522.0	2991.0	489.1	3409.2	667.1

Tabelle E1: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von zwillingtragenden Müttern (n=11) nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2723.4	558.3	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2779.1	509.9	2788.7	495.6	2875.2	571.8
6	-	-	2844.1	553.0	2690.8	479.5	2788.9	558.2
12	-	-	3019.2	405.6	2550.0	383.9	2244.2	403.8
24	-	-	3368.4	634.0	2525.2	477.9	2737.5	390.9
48	-	-	3295.4	503.5	2382.7	320.6	2920.5	296.2
96	-	-	3218.8	405.5	2854.3	329.9	3136.2	424.1
192	-	-	3096.5	434.9	2952.0	357.7	3301.3	324.0

Tabelle E2: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von drillingtragenden Müttern (n=4) nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2883.5	584.0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	3108.7	518.9	2988.0	581.8	3030.2	506.8
6	-	-	3095.5	701.8	2773.7	603.0	2934.0	729.1
12	-	-	3068.0	702.7	3542.0	1376.7	2991.5	964.9
24	-	-	3918.5	1141.1	2852.0	868.4	2886.0	663.3
48	-	-	3704.2	943.7	2868.2	532.5	3324.2	658.9
96	-	-	3568.2	706.4	3397.0	525.4	3752.0	709.4
192	-	-	3460.2	703.3	3525.0	632.4	4017.0	755.8

Tabelle E3: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von vierlingtragenden Müttern (n=2) nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	1743.0	199.0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	1910.5	257.5	1879.0	57.0	1960.0	22.0
6	-	-	1865.5	19.5	1923.0	160.0	1849.0	133.0
12	-	-	2302.0	418.0	1774.0	326.0	1766.5	72.5
24	-	-	2572.5	27.5	1990.0	291.0	1819.0	237.0
48	-	-	2766.0	122.0	2298.5	228.5	2239.5	43.5
96	-	-	2462.0	89.0	2376.0	168.0	2229.5	188.5
192	-	-	3271.5	374.5	3336.0	850.0	3361.0	718.0

Tabelle E4: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von drillings- und vierlinstragenden Müttern (n=6) nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2503.3	443.7	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2709.3	419.4	2618.3	436.2	2673.5	392.0
6	-	-	2685.5	514.1	2490.2	423.4	2572.3	515.9
12	-	-	2812.7	485.0	2952.7	950.8	2583.2	662.9
24	-	-	3469.8	775.5	2564.7	583.4	2530.3	479.9
48	-	-	3391.5	629.5	2678.3	362.4	2962.7	475.5
96	-	-	3199.5	504.5	3056.7	398.3	3244.5	553.8
192	-	-	3397.3	456.9	3462.0	458.0	3798.3	531.1

Tabelle F: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von einlingstragenden Müttern (n=2) mit einem männlichen Fetus nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2406.0	844.0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2626.5	969.5	3040.0	609.0	3265.0	622.0
6	-	-	3183.0	702.0	2958.5	657.5	2793.5	579.5
12	-	-	2958.0	791.0	2705.5	584.5	2209.5	516.5
24	-	-	3529.0	578.0	2346.5	721.5	3646.0	735.0
48	-	-	3716.0	1251.0	2951.0	1071.0	3742.0	776.0
96	-	-	3430.0	875.0	3251.0	851.0	3349.0	881.0
192	-	-	3410.5	735.5	3393.5	863.5	3664.0	1183.0

Tabelle F1: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von einlingtragenden Müttern (n=3) mit einem weiblichen Fetus nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2366.0	537.0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2505.7	629.7	2512.0	627.1	2883.7	955.7
6	-	-	3062.3	979.5	2747.0	819.5	2584.6	838.6
12	-	-	3247.3	1210.5	2736.0	1004.3	2128.0	688.1
24	-	-	3355.7	978.0	2408.0	799.0	2319.3	640.1
48	-	-	3405.7	1006.2	2345.0	680.7	2623.7	721.5
96	-	-	3033.0	844.0	2568.0	642.2	2804.3	831.6
192	-	-	2891.7	821.1	2722.7	677.5	3239.3	990.3

Tabelle F2: Gesamtöstrogenkonzentrationen im Kot (ng/g Trockenmasse) von mehrlingtragenden Müttern (n=17) mit männlichen und weiblichen Feten nach Lagerung bei verschiedenen Dauern und Temperaturen (Mittelwerte \pm SEM).

h	Temperatur (°C)							
	-20		4		20		40	
	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM	\bar{x}	SEM
0	2642.2	382.3	-	-	-	-	-	-
3	-	-	2794.1	379.5	2776.9	371.9	2851.3	417.2
6	-	-	2838.6	418.8	2671.9	359.6	2785.9	419.4
12	-	-	2998.7	322.1	2742.3	412.1	2422.9	352.7
24	-	-	3431.7	510.5	2582.0	382.4	2719.7	311.8
48	-	-	3358.9	407.1	2503.1	255.2	2968.9	257.3
96	-	-	3243.3	326.8	2945.6	265.1	3202.6	346.8
192	-	-	3260.1	334.2	3174.7	293.1	3500.3	290.6

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Holtz für die Überlassung des interessanten Themas und für die Unterstützung während der Promotion und Publikationen. Ich bedanke mich auch sehr für Vorschläge und Kritiken während des „Vorsingens“ und für die gute Arbeits- und Fußballatmosphäre.

Ebenso sei Herrn Prof. Dr. Bertram Brenig für die Übernahme des Korreferates und das Interesse an der Arbeit gedankt.

Ich danke Herrn Prof. Jean-François Beckers, Université de Liège in Belgien, für die Unterstützung während der Bestimmung der PAG-Konzentration und während der Vorbereitung der Publikation.

Bei Herrn Prof. H. H. D. Meyer, Universität München, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Enzym-Hormon-Konjugates und Antikörpers und für die Möglichkeit die Enzymimmunoassay-Methode im Labor zu lernen.

Herrn Prof. Bruns, Herrn Dr. Wallenhorst und Herrn Dr. König für die Unterstützung der statistischen Auswertung.

Frau Dr. Reischl für die Freundschaft und umfassende Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit. Danke !!!

Herrn Leliveldt für die Freundschaft, die wir im Laufe der Zeit aufgebaut haben und weil du mir immer bereit zu helfen warst egal wo, wohin oder wie warst du immer da. Ich danke dir !!!

Frau fast (2003) Dr. Moors für die Freundschaft während meiner Promotion und die vollen Blutproben, die Du in Relliehausen von „Lämmern“ gezogen hast !!!

Frau Sohnrey und Frau Stüwe für die Freundschaft und Hilfe während der Untersuchungen meiner Doktorarbeit.

Frau Dr. Wildenhayn für 4 Jahre Kollegialität im gemeinsamen Büro und Freundschaft.

Herrn Salzmann für die Hilfe und Organisation der Blutproben-Entnahme in Relliehausen.

Darüberhinaus danke ich allen Freunden und Kollegen des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik insbesondere der Arbeitsgruppe Fortpflanzung und Biotechnik, die durch ihre Hilfe maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitragen haben.

Besonders danken möchte ich meiner Frau, Tierärztin Elizabeth Najera de Ledezma, für ihr Liebe und Verständnis und GROSSEN Hilfe während unseres Aufenthaltes in Deutschland.

Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung vom mexikanischen Ministerium für öffentliche Erziehung (SEP) ermöglicht. Stipendium UANL-33.

Lebenslauf

Name: Ledezma Torres
Vorname: Rogelio Alejandro
Geburtsdatum, -ort: 21.04.1970 in Monclova, Coahuila, Mexiko
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: mexikanisch

Ausbildung:

1976-1982 **Grundschule:** Moderna Venustiano Carranza in Monclova, Mexiko
1982-1985 **Mittelschule:** Secundaria Técnica N°- 35 in Monclova, Mexiko
1985-1988 **Oberschule:** Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario N°- 22 in Cuatro Ciénegas, Mexiko
1988-1993 **Diplom:** An der Fakultät für Tiermedizin und Tierzucht, Autonome Universität von Nuevo León in Monterrey, Mexiko mit Abschluss Tierarzt
1993-1995 **M. Sc.:** Am Institut für Tierproduktion, Autonome Universität für Landwirtschaft „Antonio Narro“ in Saltillo, Mexiko mit Abschluss Master der Wissenschaft und Tierproduktion
1998-2002 **Promotion:** Am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Georg-August-Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Fortpflanzung und Biotechnik von Prof. Holtz.

Berufliche Tätigkeit:

Seit August 1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Fakultät für Tiermedizin und Tierzucht, Autonome Universität von Nuevo León in Monterrey, Mexiko.

