

Morten Friedrich

---

**Enzymimmunologischer Nachweis von  
“pregnancy-associated glycoprotein” (PAG) als  
Hilfsmittel zur Trächtigkeitsdiagnose beim Rind**







**Enzymimmunologischer Nachweis von "pregnancy-  
associated glycoprotein" (PAG)  
als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsdiagnose  
beim Rind**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von  
**Morten Friedrich**  
geboren in Northeim

Göttingen, im März 2006

## **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, 2006  
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2006  
ISBN 10: 3-86727-046-5  
ISBN 13: 978-3-86727-046-5

D7

1. Referent: Prof. Dr. Wolfgang Holtz
2. Korreferent: Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2006

Die Illustration der Titelseite wurde freundlicherweise von Gernod Gayk erstellt.  
([www.gernod-gayk.de](http://www.gernod-gayk.de))

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2006  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://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, 2006  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 10: 3-86727-046-5  
ISBN 13: 978-3-86727-046-5

*Also lautet ein Beschluß:  
Daß der Mensch was lernen muß.*

*Nicht allein das A-B-C  
Bringt den Menschen in die Höh';*

*Nicht allein im Schreiben, Lesen  
Übt sich ein vernünftig Wesen;*

*Nicht allein in Rechnungssachen  
Soll der Mensch sich Mühe machen;*

*Sondern auch der Weisheit Lehren  
Muß man mit Vergnügen hören.*

*Wilhelm Busch*



*Meinen Eltern und Großeltern*



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis und Erläuterung der verwendeten Abkürzungen	i
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 Trächtigkeit beim Rind	3
2.1.1 Brunstzyklus	3
2.1.2 Frühe Embryonalentwicklung und Implantation	4
2.1.3 Embryonale Mortalität	7
2.2 Struktur und Funktion des "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG)	9
2.3 Trächtigkeitsuntersuchung beim Rind	17
2.3.1 Manuelle rektale Palpation	18
2.3.2 Bestimmung der Progesteronkonzentration	19
2.3.3 Ultrasonographische rektale Untersuchung	21
2.3.4 Nachweis des "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG)	22
2.4 Milchproteinbildung und Aufbereitung der Milch	25
2.4.1 Milchproteinbildung	25
2.4.2 Aufbereitung der Milch	27
2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
2.5.1 Enzymimmunologische Nachweisverfahren	29
2.5.2 Qualitätskriterien des ELISA	32
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1 Gewinnung und Aufbereitung von Blut- und Milchproben	35
3.2 Entwicklung des PAG-ELISA	36
3.2.1 Entwicklung des Blut-ELISA	36
3.2.2 Entwicklung des Milch-ELISA	43
3.2.3 Qualitätskriterien des ELISA	47
3.3 PAG-Konzentrationen in Blut und Milch während der Trächtigkeit	49
3.4 Eignung des PAG-Tests zur Trächtigkeitsfeststellung	51

3.4.1	PAG-Konzentrationen bei trächtigen und nicht trächtigen Kühen	51
3.4.2	Aussagesicherheit des PAG-Tests	52
3.5	Statistische Auswertung	54
3.5.1	PAG-Konzentrationen im Verlauf der Trächtigkeit	54
3.5.2	Eignung des PAG-Tests zur Trächtigkeitsfeststellung	55
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	PAG-Bestimmung im Blut	57
4.1.1	Optimale Kombination von Antiserum und Tracer	57
4.1.2	Inkubations- und Reaktionszeiten des ELISA	57
4.1.3	Qualitätskriterien des Blut-ELISA	58
4.1.4	Korrelation von RIA und ELISA	60
4.2	PAG-Bestimmung in der Milch	61
4.2.1	Qualitätskriterien des Milch-ELISA	61
4.2.2	Einfluss der Lagerung auf die PAG-Konzentration	63
4.2.3	PAG-Konzentrationen in Frischmilch, Magermilch, konservierter Milch oder Molke	64
4.2.4	PAG-Konzentrationen in der Milch trächtiger Kühe	65
4.3	PAG-Konzentrationen im Verlauf der Trächtigkeit	67
4.3.1	Blut-PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit	67
4.3.2	Milch-PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit	69
4.3.3	Exemplarische PAG-Verlaufskurven	72
4.4	Eignung des PAG-Tests zur Trächtigkeitsuntersuchung	75
4.4.1	PAG-Konzentrationen bei trächtigen und nicht trächtigen Kühen	75
4.4.2	Entwicklung der PAG-Konzentration in der frühen Trächtigkeit	81
4.4.3	Aussagesicherheit des PAG-Tests	84
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
5.1	ELISA-Entwicklung	86
5.2	Verlaufskurven der PAG-Konzentration bei trächtigen Tieren	91
5.3	Trächtigkeitsdiagnose mittels PAG-Nachweis	93
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>

<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>10.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>11.</b>	<b>Anhang</b>	<b>125</b>
11.1	Chemikalien und Geräte	125
11.2	ELISA-Entwicklung	128
11.3	Verlaufsprofile der Einzeltiere	130
11.4	Testgenauigkeit	137



## Verzeichnis und Erläuterung der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
al.	alii, andere
Anz.	Anzahl
aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
b, bo	bovine
bzw.	beziehungsweise
C. l.	Corpus luteum, Gelbkörper
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CV	coefficient of variation, Variationskoeffizient
d	day, Tag
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ed.	Edition, Ausgabe
ELISA	enzyme linked immunsorbent assay
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
g	Gramm
Hrsg.	Herausgeber
°C	Grad Celsius
h	hour, Stunde
Ig	Immunglobulin
KB	künstliche Besamung
l	Liter
M	Mol
Max.	Maximum
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min.	Minute
Min.	Minimum

---

ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NT	nicht trächtig
o.ä.	oder ähnlich
OD	"optical density", optische Einheiten
p	Wahrscheinlichkeit
PAG	pregnancy-associated glycoprotein
p. c.	post coitum, nach der Befruchtung
P <sub>4</sub>	Progesteron
pH-Wert	Maßzahl für die Wasserstoffionen-Konzentration einer Lösung
pI	Isoelektrische Punkt
%	Prozent
PSPB	pregnancy specific protein B
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
RR	recovery rate, Wiederfindungsrate
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
∑	Summe (gr. Sigma)
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	standard error of mean, Standardfehler des Mittelwerts
Suppl.	Supplement, Ergänzungsband
Tab.	Tabelle
TU	Trächtigkeitsuntersuchung
u.a.	unter anderem
US	Ultrasonographie
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
$\bar{x}$	Stichproben-Mittelwert
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten stieg die durchschnittliche Laktationsleistung bei Milchkühen stetig an. Wurden zu Beginn der 70er Jahre noch durchschnittliche Laktationsleistungen von 4500kg erreicht, lagen diese im Kontrolljahr 2003/04 bei über 8000kg pro Kuh (Holstein Schwarzbunte, VIT, 2004). Die beobachteten Leistungssteigerungen sind weitestgehend auf verbesserte Fütterungs- und Haltungsbedingungen sowie ein erhöhtes genetisches Potential zurückzuführen und scheinen mit schlechteren Reproduktionsleistungen und verkürzter Nutzungsdauer der Tiere einherzugehen (LUCY, 2001; SHELDON und DOBSON, 2003). Das durchschnittliche Alter einer Milchkuh liegt derzeit bei 4,8 Jahren und die Trächtigkeitschancen einer Erstbesamung betragen etwa 25%. Eine entgegensätzlich verlaufende Entwicklung von Betreuungsaufwand und einer, mit zunehmender Milchleistung beobachteten Verkürzung der Brunstdauer führte zu einer Verlängerung der Zwischenkalbezeit. Diese lag nach dem Jahresbericht der VIT im Jahr 2004 bei 401 Tagen. Jeder Tag einer über 365 Tage verlängerten Zwischenkalbezeit führt zu wirtschaftlichen Verlusten, durch geringere Milchleistungen pro Kuh und Jahr, einen geringeren Zuchtfortschritt, sowie höhere Remontierungsraten (WIECZOREK et al., 1977). Eine Verkürzung der Zwischenkalbezeit kann nur durch intensive Brunstbeobachtung und eine frühzeitige und verlässliche Trächtigkeitsuntersuchung erreicht werden. Eine Realisierung dessen ist aufgrund der ständig wachsenden Bestandsgrößen und dem zunehmenden Arbeitsaufwand nur durch ein optimiertes Herdenmanagement und den Einsatz biotechnologischer Hilfsmittel zu realisieren.

Verlässliche Trächtigkeitsdiagnosen sind neben der Durchführung einer rektalen oder ultrasonographischen Untersuchung auch durch die Konzentrationsbestimmung verschiedener Steroidhormone in einer Blut- oder Milchprobe möglich. Da die einzelnen Verfahren oft mit einem erheblichen Zeit- und/oder Kostenaufwand verbunden sind, stellt die rektale Untersuchung für viele Betriebe nach wie vor die gängigste Methode der Trächtigkeitsuntersuchung dar.

Im Jahre 1986 wurde beim Rind erstmals ein Glykoprotein plazentalem Ursprungs beschrieben, welches während der Trächtigkeit im Blutserum der Mutter nachweisbar ist. Der Nachweis dieses Glykoproteins, dem "pregnancy-associated glycoprotein"

(PAG), mittels Radioimmunoassay (RIA) stellt eine alternative Möglichkeit der Trächtigkeitsdiagnose ab dem 30. Tag nach der Belegung dar (ZOLI et al., 1992b).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein alternatives enzymimmunologisches Verfahren (ELISA) für den Nachweis des PAG etabliert werden, welches verlässliche Messungen ohne die Nachteile der für den RIA erforderlichen radioaktiven Markierung gestattet.

Da die Entnahme einer Blutprobe mit einem größeren Aufwand als die Entnahme einer Milchprobe verbunden ist und auch ein gewisses hygienisches Risiko birgt, sollte nach der Etablierung des Assays geprüft werden, ob und ab wann PAG auch in der Milch nachzuweisen ist und in wie weit dieser Nachweis eine Möglichkeit der Trächtigkeitsdiagnose darstellen kann.

Die Verfügbarkeit eines verlässlichen und kostengünstigen Trächtigkeitstest ab dem 30. Tag beim Rind anhand einer Blut- oder Milchprobe wäre sowohl für milch- als auch fleischerzeugende Betriebe von großem Interesse.

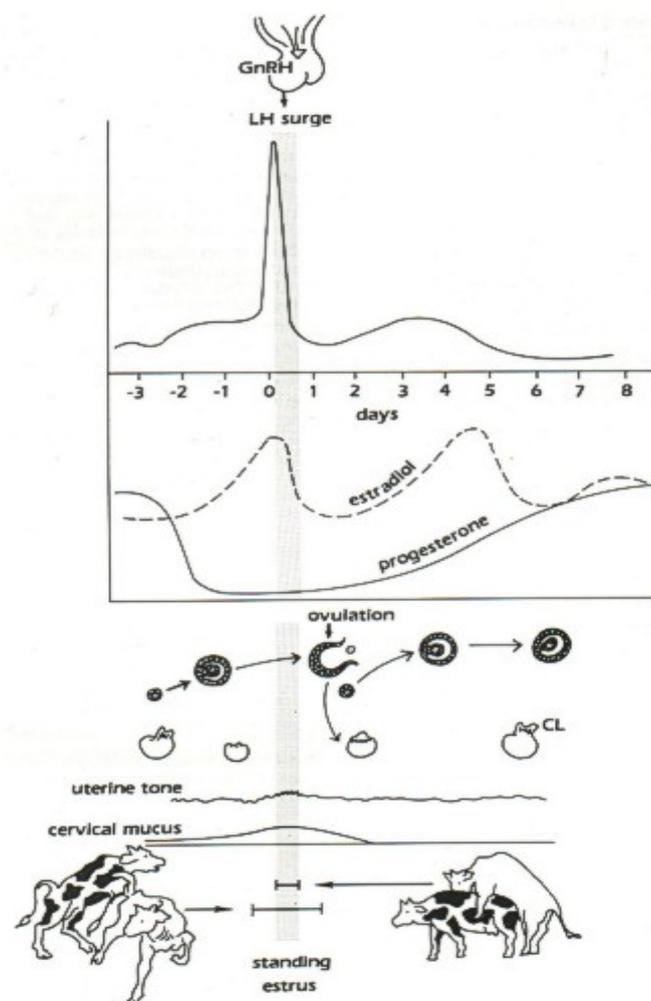
## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Trächtigkeit beim Rind

#### 2.1.1 Brunstzyklus

Unter Einwirkung von FSH und LH setzt beim weiblichen Rind im Alter von 8-11 Monaten die Geschlechtsreife ein. Die am Ovar (ovarier Zyklus) und am Uterus (uteriner Zyklus) ablaufenden Vorgänge werden als Sexualzyklus oder Brunstzyklus zusammengefasst. Die äußerlich sichtbare Brunst (Östrus), also der wiederkehrende Zustand der Paarungsbereitschaft, ist der erste Tag jedes Brunstzyklus. Die Dauer des Brunstzyklus liegt im Mittel bei 21 (16-30) Tagen, die der Brunst bei 24 (bis 48) Stunden. Der Brunstzyklus wird in 4 Phasen unterteilt: Proöstrus (Vorbrunst), Östrus (Brunst), Metöstrus (Nachbrunst) und Diöstrus oder Interöstrus (Zeit ohne Brunsterscheinungen) und wird maßgeblich von LH und FSH der Adenohypophyse und den Hormonen der Ovarien gesteuert (MICHEL, 1986).

Der Brunstzyklus (Abb. 1) beginnt mit der Ausschüttung des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) vom Hypothalamus. Das GnRH stimuliert die Sekretion des Follikelstimulierenden-Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH) der Hypophyse. Auf den



**Abb. 1:** Ablauf des Brunstzyklus mit Follikel- und Gelbkörperentwicklung, sowie Progesteron-, Östradiol- und LH-Verläufen beim Rind (nach HAFEZ und HAFEZ, 2000).

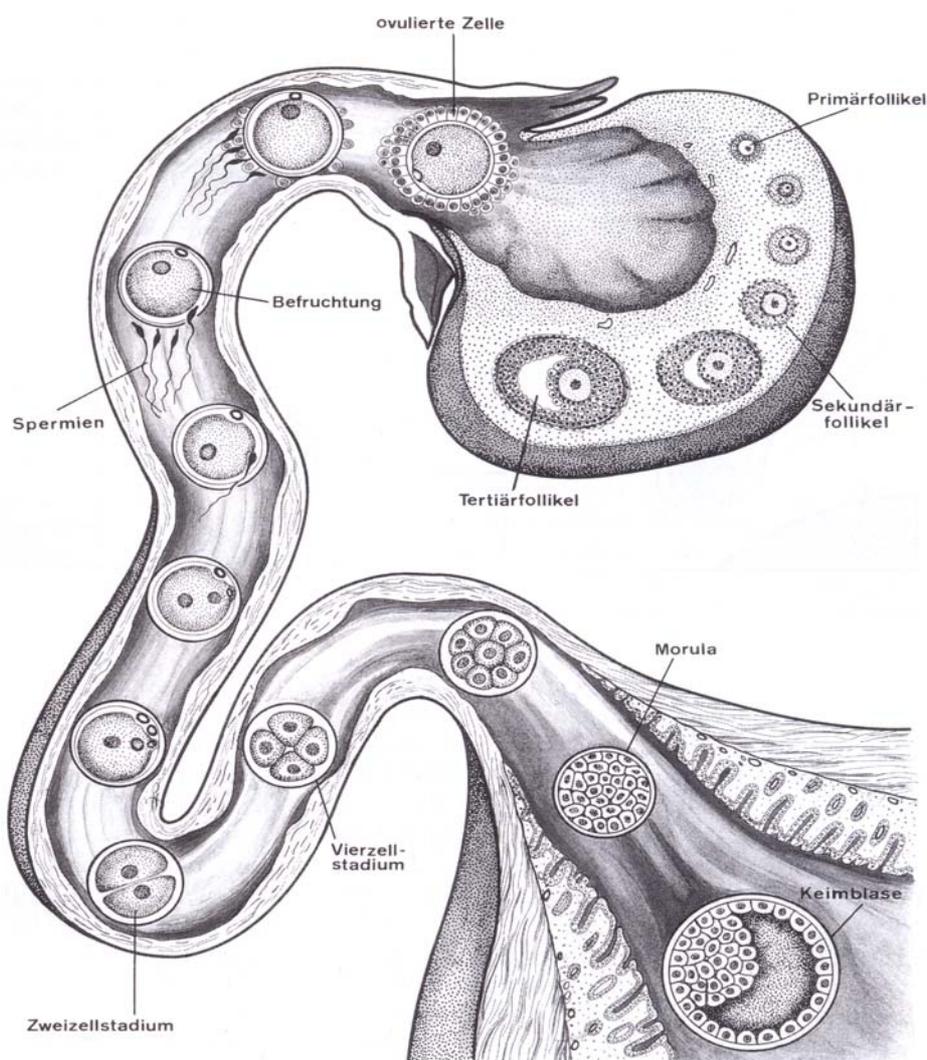
Follikel epithelzellen (Granulosazellen) erscheinen FSH- und auf den angrenzenden Zellen des Interstitiums (Theca interna) LH-Rezeptoren. Unter der Wirkung von FSH und LH synthetisieren die Theca interna Östradiol (E<sub>2</sub>) und die Granulosazellen Progesteron und Östradiol.

Während des Proöstrus entwickelt sich unter vermehrtem FSH-Einfluss einer der heranreifenden Follikel auf den Ovarien zum Tertiärfollikel. Die Tertiärfollikel sind Hauptproduktionsort der brunstauslösenden Östrogene. Durch die Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) wird schließlich zum Ende der Brunst, bis maximal 14 Stunden nach Brunstende, die Ovulation ausgelöst. Die Granulosazellen des ovulierten Follikels wandeln sich unter LH-Einfluß in Granulosaluteinzellen um. Die Gesamtheit der Granulosaluteinzellen wird als Gelbkörper (Corpus luteum, Cl) bezeichnet. Er ist Hauptproduktionsort des Progesterons. Die Produktion des Progesterons steigt parallel mit der Anbildung des Gelbkörpers an, welcher im Diöstrus seine volle Funktion erreicht. Unter Progesteroneinfluss wird die Uterusschleimhaut auf die Implantation der befruchteten Eizelle vorbereitet und die Ausschüttung von GnRH, LH und FSH unterbunden. Ein neuer Zyklus beginnt mit der erneuten Ausschüttung von GnRH, nachdem das vom Endometrium gebildete Prostaglandin (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) die Rückbildung des Gelbkörpers (Luteolyse) und damit den Abfall der Progesteronkonzentration ausgelöst hat (MICHEL, 1986; BAZER et al., 1993; SCHAMS und BERISHA, 2004).

### 2.1.2 Frühe Embryonalentwicklung und Implantation

Nach der erfolgreichen Verschmelzung von Einzelle und Spermium zur Zygote durchläuft die befruchtete Eizelle mehrere mitotische Teilungen (Furchung), wandert vom Ort der Befruchtung, dem Ovidukt, bis in den Uterus, dem Ort der Implantation (BAZER et al., 1993) und erreicht nach 8-9 Tagen das Stadium der Blastozyste. Der schematische Ablauf der Furchung bis zum Stadium der Blastozyste ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Blastozyste (Keimblase) besteht aus zwei unterschiedlichen Zellgruppen, einer einzelligen äußeren Wand, dem Trophoblast, und einem inneren Zellknoten, dem Embryoblast oder Embryonalknoten. Aus dem Embryoblast entwickelt sich der eigentliche Embryo, aus dem Trophoblast die den Embryo umgebenden Chorionhülle (SCHNORR und KRESSIN, 2001).

Um die Luteolyse des Cl zu verhindern, ohne welches der Erhalt der Trächtigkeit nicht gewährleistet ist, wird zwischen dem 12. und 21. Tag der Trächtigkeit vom Trophoblast ein spezifisches Protein abgegeben, das bovine Interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ). Interferon- $\tau$  führt unter anderem zu einer Reduzierung der Bildung von Oxytocin- und Östradiolrezeptoren im Uterusepithel und einer vermehrten Bildung eines Prostaglandininhibitors (PGSI). Dadurch wird die pulsatile Ausschüttung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aus dem Endometrium, welche zur Luteolyse des Cl und damit zum Abbruch der Trächtigkeit führen würde, unterdrückt (BAZER et al., 1997; DEMMERS et al., 2001).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung von Eizellreifung, Befruchtung und embryonaler Entwicklung bis hin zum Stadium der Blasozyste (nach SCHNORR und KRESSIN, 2001).

Bei Bestehen der Trächtigkeit entwickelt sich das Corpus luteum zum Cl graviditatis und bleibt als Progesteronbildungsort während der gesamten Gravidität bestehen. Das von ihm abgegebene Progesteron bewirkt neben der Transformation

des proliferierten Endometriums und der Reduzierung der Uteruskontraktionen auch das Ausbleiben einer neuen Ovulation durch einen inhibierenden Effekt auf die GnRH bzw. FSH und LH Ausschüttung (THATCHER et al., 1995; HOFFMANN und SCHULER, 2002). Eine detaillierte Beschreibung der Interaktion von Progesteron, Interferon- $\tau$ , plazentalem Laktogen (PL), Wachstumshormonen (GH) und verschiedenen uterinen Rezeptoren für den Erhalt der Trächtigkeit findet sich bei SPENCER und BAZER (2004).

Aus den Zellen des Embryoblast entwickeln sich der Embryo sowie das Amnionepithel, das Entoderm des primären Dottersacks, der Allantois und das Mesoderm für die Eihäute. Aus den kubischen Zellen des Trophoblast entsteht das Chorionepithel (Trophektoderm), das später zusammen mit dem parietalem Blatt des Mesoblasten das den Embryo umhüllende Chorion bildet. Bei beginnender Implantation verbinden sich zweikernige Zellen des Trophoektoderm mit den Epithelzellen des Endometriums zu einem Zellsyncytium (GEISERT und MALAYER, 2000). Dieser Zellverband ist ein wichtiger Produktionsort verschiedenster Substanzen, die in direktem oder indirektem Zusammenhang mit dem Entstehen und dem Erhalt der Trächtigkeit stehen. Zu ihnen gehören unter anderem plazentales Laktogen (DUELLO et al., 1986), Progesteron (WOODING et al., 1996), Prostaglandin (REIMERS et al., 1985), sowie eine Reihe von Wachstumshormonen und -faktoren, zahlreiche Proteine und Glykoproteine, unter ihnen auch das PAG (BECKERS et al., 1998).

Der Vorgang der Implantation beginnt beim Rind nicht vor dem 16. Tag nach der Befruchtung. Er wird in Vorkontakt-, Appositions- und Adhäsionsphase unterteilt. Das durch das Progesteron auf die Nidation vorbereitete Endometrium nimmt zunächst Kontakt mit dem Trophoektoderm des Embryo auf, welches mit kleinen Epithelwucherungen, den primären Zotten bedeckt ist. Später heften sich die zottenartigen Ausstülpungen an die Oberfläche des Endometriums. Aus den sekundären Zotten des Chorionepithels mit bindegewebiger Grundlage und Vaskularisation bilden sich in vereinzelt Bereichen die Kotyledonen, die sich ab der 5. Woche der Trächtigkeit mit den Karunkeln der Uterusschleimhaut zu den Plazentomen (80-120 Stück) verbinden. Die Bildung der Plazentome ist zwischen dem 40. und 50. Trächtigkeitstag abgeschlossen. Über sie erfolgt der Stoffaustausch zwischen Fetus und Mutter (GOODWINE, 2004; LEE und DEMAYO, 2004). Nach der vollständigen

Verankerung der Plazenta wachsen die gebildeten Plazentome von anfänglich 6,5 : 3,5 : 2,0cm auf Größen von bis zu 14,0 : 6,5 : 4,5cm an. Zwischen dem 42. und 50. Tag der Trächtigkeit endet mit der Differenzierung der Organe auch die embryonale Entwicklungsphase. Nach der Anlage der Organe wird im allgemeinen vom Fetus gesprochen (MICHEL, 1986).

Im weiteren Verlauf der Trächtigkeit wird die Entwicklung der Frucht durch das Zusammenspiel von plazentales Wachstumshormon (GH), Prolaktin (PRL) und plazentales Laktogen gesteuert (GOODWINE, 2004). Die Vorbereitung auf die Geburt und das Einsetzen der Wehen wird letztendlich durch das Zusammenspiel von Progesteron, Östrogenen und Oxytocin eingeleitet (KINDAHL et al., 2004).

### 2.1.3 Embryonale Mortalität

Schlechte Trächtigkeitsraten lassen sich entweder auf Befruchtungsstörungen oder Trächtigkeitsabbrüche zurückführen. In früheren Studien wurden beim Rind Befruchtungsraten von bis zu 95% angenommen (AYALON, 1978) und eine hohe embryonale bzw. fetale Sterblichkeit als Hauptursache für schlechte Trächtigkeitsraten angesehen. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die tatsächlichen Befruchtungsraten bei Milchkühen zwischen 55 und 88% liegen (HUMBLOT, 2001; SANTOS et al, 2004). Von verschiedensten Faktoren, die Einfluss auf die Fruchtbarkeit nehmen können, spielt bei Hochleistungstieren Hitzestress die wichtigste Rolle (HANSEN, 2002). Während Befruchtungsstörungen in der Regel durch das Auftreten einer neuen Brunst nach 21 Tagen erkannt werden, kommt es bei Trächtigkeitsabbrüchen zu einem verzögerten Auftreten der nächsten Brunst. Die Zeit bis zur nächsten Brunst ist abhängig vom Zeitpunkt des Absterbens des Embryo und der Zeit bis zur Regression des Corpus luteus sowie dem Entwicklungsstand der Follikel (KASTELIC et al., 1991, SANTOS et al., 2004).

In Abhängigkeit vom Auftreten der nächsten Brunst, werden Trächtigkeitsabbrüche in frühen oder späten embryonalen Fruchttod ("early" bzw. "late embryonic mortality") unterschieden. Bei Kühen die bis zum 24. Tag nach der Besamung erneut in Brunst kommen wird von einer Befruchtungsstörung oder einem frühen, bei einer Brunst bis zum 42.-50. Tag von einem späten embryonalen Fruchttod ausgegangen. Trächtigkeitsabbrüche nach dem 50. Tag werden als fetale Verluste bezeichnet. Nach dem Auftreten eines embryonalen Fruchttodes werden Fruchtwasser, Embryo und die Fruchthüllen von der Kuh resorbiert. Dieser Vorgang kann bis zu zwei

Monate dauern (AURICH, 1999). Eine mögliche Mumifizierung der Frucht wird ab der 5. Trächtigkeitswoche beschrieben. Das Einsetzen eines neuen Zyklus bleibt in dieser Zeit aus (KASTELIC und GINTHER, 1989; AURICH 1999).

SANTOS et al. (2004) geben einen Übersicht über verschiedene Studien und zeigten, dass die durchschnittlichen Trächtigkeitsraten am Tag 30 nach der Belegung bei hochleistenden Milchkühen zwischen 35-45% liegen. Der Anteil der tatsächlich abkalbenden Tiere beläuft sich auf etwa 28%. Die geringsten Trächtigkeitsverluste treten in der fetalen, die höchsten, mit bis zu 60%, in der frühen Embryonalphase auf. Die Häufigkeiten des Auftretens embryonaler Sterblichkeit ist abhängig von verschiedensten Faktoren und unterliegt daher starken Variationen (HUMBLOT, 2001, SANTOS et al., 2004).

## 2.2 Struktur und Funktion des "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG)

Nach ZOLI et al. (1991; 1992a) bildet die Plazenta des Rindes schon kurz nach Beginn der Trächtigkeit eine Gruppe spezifischer Proteine. Ein solches Protein ist das von BUTLER et al. (1982) beschriebene "pregnancy-specific protein B" (bPSPB) oder das von BECKERS et al. (1988) beschriebene und von XIE et al. (1994) identifizierte "pregnancy-associated glycoprotein-2" (PAG-2). ZOLI et al. isolierten 1991 nach der von BUTLER et al. (1982) beschriebenen Methode mehrere Varianten eines sauren Glykoproteins aus fetalen Kotyledonen, welche sie zur Gruppe der "pregnancy-associated glycoproteins" (PAG) zusammenfassten, die nach BECKERS et al. (1999) zur Familie der Aspartat-Proteasen zählen. Das zuvor beschriebene bPSPB hat nach LYNCH et al. (1992) einen dem bovinen PAG-1<sub>67</sub> (67kDA) fast identischen Aminosäureaufbau, und wird ebenfalls den PAG zugeschrieben. Aspartat-Proteasen gehören zur Gruppe der sauren proteolytischen Enzyme, sind also am Abbau verschiedener Proteine beteiligt. Sie bestehen aus einer einzelnen gefalteten Polypeptidkette mit angehängten N-Glykanen.

**Tab. 1:** Vergleich der Aminosäuresequenzen repräsentativer PAG und Aspartat-Proteinasen (nach GREEN et al., 1998)

	pPEP A	rhPEP	boPAG-1	ovPAG-1	boPAG-2	ovPAG-2	pPAG-1	pPAG-2	ePAG	rPEP F	hCath D
pPEP A	100										
rhPEP	86	100									
boPAG-1	48	49	100								
ovPAG-1	48	50	73	100							
boPAG-2	50	51	58	59	100						
ovPAG-2	49	49	59	60	65	100					
pPAG-1	49	49	49	48	50	53	100				
pPAG-2	51	52	54	53	57	57	64	100			
ePAG	56	56	52	53	54	52	54	57	100		
rPEP F	56	57	51	50	53	58	56	58	69	100	
hCath D	49	46	40	40	40	45	36	40	42	44	100

pPEP A: porcines Pepsinogen A; rhPEP: Rhesus Affe Pepsinogen A; boPAG-1: bovine PAG-1; ovPAG-1: ovine PAG-1; boPAG-2: bovine PAG-2; ovPAG-2: ovine PAG-2; pPAG-1: porcines PAG-1; pPAG-2: porcines PAG-2; ePAG: equines PAG; rPEP F: Kaninchen Pepsinogen F; hCath D: humanes Cathepsin D; hCath E: humanes Cathepsin E.

Ihre katalytische Aktivität ist abhängig von zwei Aspartat-Resten im Zentrum der Substratbindungsstelle (STRYER, 1994). Die Aminosäuresequenzen verschiedener PAG zeigen hohe Homogenität untereinander, zwischen verschiedenen Spezies sowie zu anderen Aspartat-Proteasen wie Pepsin, Cathpepsin oder Chymosin (Tabelle 1), weisen aber gezielte Mutationen einzelner Aminosäuren in den Aspartat-Resten im katalytischen Zentrum auf (GREEN, et al., 1998). Ihre katalytische Fähigkeit kann durch Mutation einzelner Aminosäuren der Bindungsstelle reduziert oder völlig inaktiviert werden. Dies scheint nach GURUPRASAD et al. (1996) auch die Ursache für den Verlust der katalytischen Aktivität der meisten PAG zu sein.

Aufgrund der phylogenetischen Abstammung der Aspartat-Proteasen wird vermutet, dass das PAG bei den meisten Säugetieren im Genom verankert ist und während der Trächtigkeit exprimiert wird (HUGHES et al., 2003).

Variationen des PAG die aus plazentarem Gewebe extrahiert oder mittels cDNA-

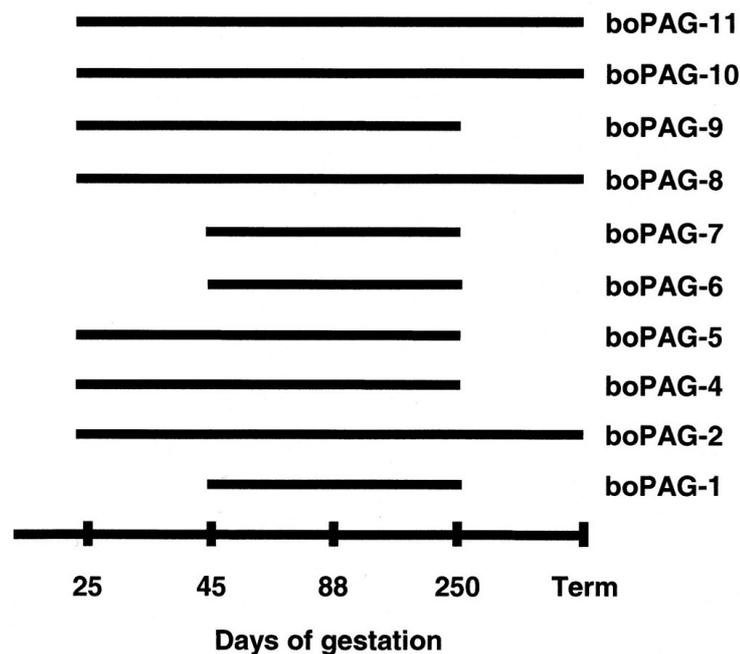


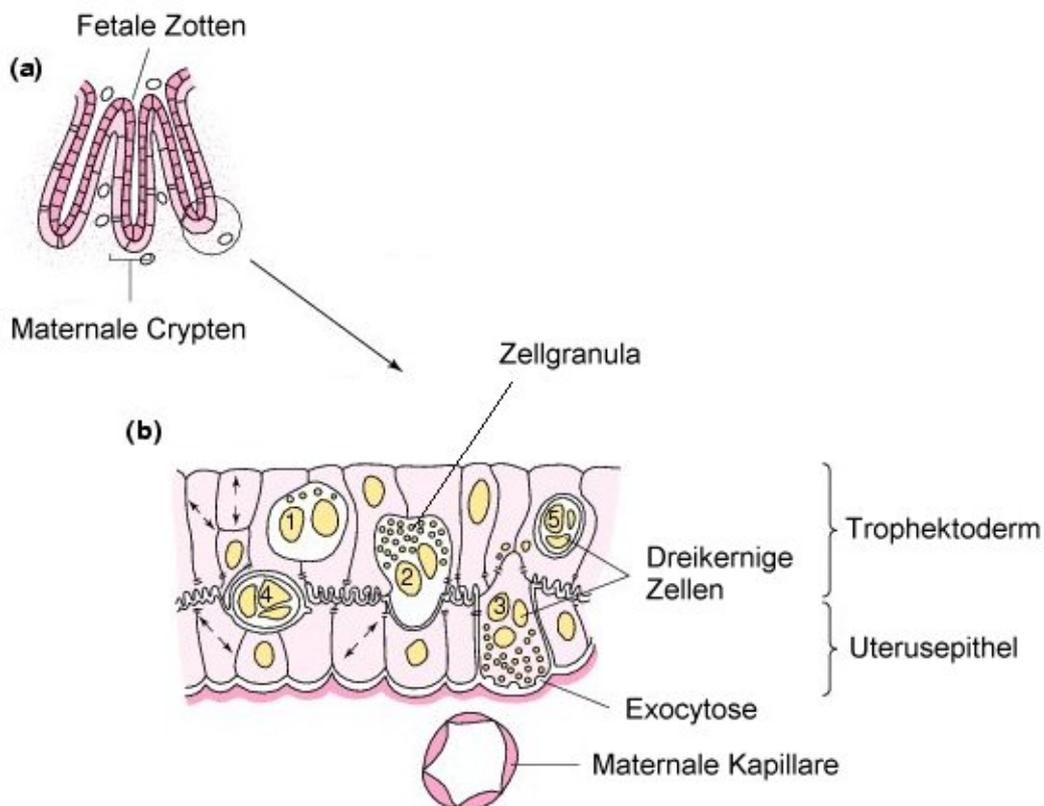
Abb. 3: Expressionsmuster verschiedener boviner PAG während der Trächtigkeit (nach GREEN et al., 2000)

Screening nachgewiesen wurden und sich in Molekulargewicht (47 - 90 kDa) und isoelektrischem Punkt (3,7 - 5,4 pI) unterscheiden, werden bei verschiedenen Tierarten beschrieben. Bisher wurden unterschiedliche PAG bei Schaf (oPAG, ZOLI et al., 1990), Rind (bPAG, ZOLI et al., 1991), Ratte (DAS, 1994), Pferd (GREEN et al., 1994 und 1999), Ziege (caPAG, GARBAYO et al., 1998, SOUSA et al., 1999),

Schwein (pPAG, SZAFRANSKA et al., 1995, 2001a, 2001b; SZAFRANSKA und PANASIEWICZ, 2002), Lama (DREW et al., 1995), Elch (WHITE et al., 1995), Hirsch (OSBORN et al., 1996), Katze (GAN et al., 1997), Maus (CHEN et al., 2001), Affe (ZHOU und HAMMARSTROM, 2001) und beim Rentier (ROPSTAD, et al., 2005) nachgewiesen. Ein Expressionsmuster einiger der von GREEN et al. (2000) beschriebenen 21 bovinen PAG ist in Abb. 3 zu sehen. Der Unterschied in der Molekülmasse einiger PAG ist nach KLISCH et al. (2005) scheinbar auf den Grad der Glykosilation, also die Art und Anzahl der angehängten Zuckerketten (N-Glykane) zurückzuführen. Die bisher beschriebenen PAG lassen sich anhand phylogenetischer Analysen in zwei Gruppen unterteilen (WOODING et al., 2005). Die phylogenetisch gesehen ältere Gruppe tritt beim Rind sowohl in den ein- als auch den zweikernigen Zellen (BNC) des Trophoblasten auf, während die Gruppe der neueren PAG scheinbar nur in den zweikernigen Zellen gebildet wird (ZOLI et al., 1991 und XIE et al., 1991).

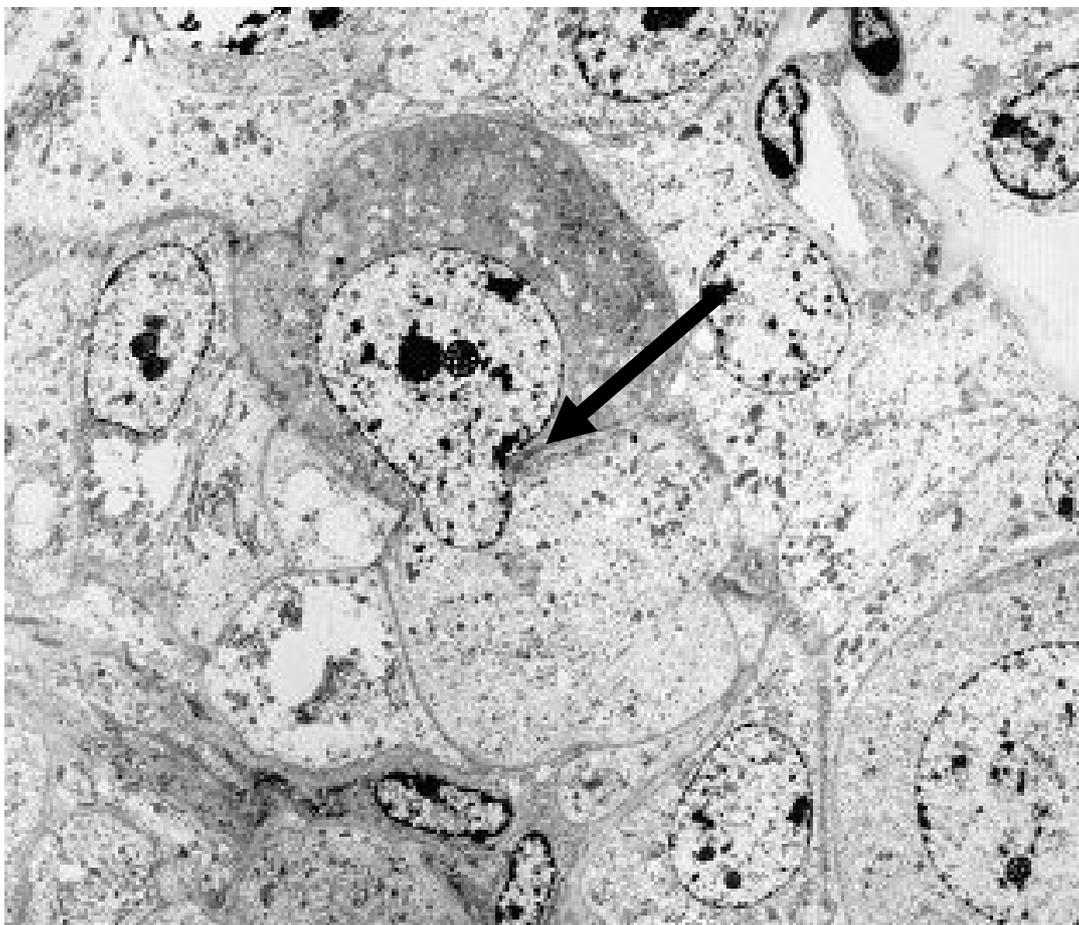
Die Bildung von zweikernigen Zellen in Trophoblast und Trophektoderm ist eine Besonderheit der Plazentation bei Wiederkäuern. Die ersten zweikernigen Zellen treten zu Beginn der Implantation auf (WOODING, 1983). Sie entstehen durch eine azytokinetische Mitose mononukleärer Trophoblastzellen (WOODING, 1992), also durch Zellkernteilung ohne anschließende Trennung der Zellwand. Die so entstandenen BNC besitzen keinerlei Verbindung zu den einkernigen Trophoblastzellen und wandern entlang der *tight junctions* zur maternalen Basalmembran, um mit dem Uterusepithel zu fusionieren (WOODING und WATHES, 1980). Im späteren Verlauf der Trächtigkeit entstehen sie in den inneren Epithelschichten des Chorion und wandern durch das Chorionepithel. Nach der Fusionierung geben sie die in Form von Granula angereicherten Substanzen, darunter auch das PAG, mittels Exocytose an das maternale Gewebe ab. Im Verlauf der Trächtigkeit kann ihr Anteil bis zu 20% der Zellpopulation der ausgebildeten Plazenta betragen (WOODING, 1983). Bis zum 40. Tag der Trächtigkeit entsteht beim Rind durch den Verschmelzungsprozess von embryonalen und maternalen Epithelzellen ein mehrkerniges Zellsyncytium, das in eine vollständige Epithelschicht umgewandelt wird und für eine erfolgreiche Implantation und die daran anschließende Entwicklung der Plazenta erforderlich ist (GEISERT und MALAYER, 2000). Von nun an erfolgt eine Migration der binuklearen Zellen nur noch zur Bildung

kurzlebiger dreikerniger feto-maternaler Hybridzellen, die, nach Abgabe ihrer synthetisierten Stoffe an das maternale Gewebe, vom Trophektoderm resorbiert werden. Der Ablauf der Fusionierung der zweikernigen Trophoblastzellen zu feto-maternalen Hybridzellen ist bei WOODING (1992) und GREEN et al. (1998) beschrieben. In Abbildung 4 ist die schematische Entstehung der zweikernigen Zellen sowie deren Fusionierung beim Rind dargestellt. Zweikernige Zellen (1) verlassen das trophektodermale Epithel, dringen in das maternale Uterusepithel ein (2) und verschmelzen mit den maternalen Epithelzellen. Nach der Verschmelzung werden die in den Granula angereicherten Stoffe mittels Exocytose in das angrenzende maternale Gewebe abgegeben (3). Ab dem 40. Tag der Trächtigkeit werden neu gebildete dreikernige Zellen nach erfolgter Exocytose wieder im Trophektoderm (4, 5) resorbiert (nach WOODING und WATHES, 1980; WOODING, 1983; SASSER et al., 1986; GREEN et al., 2000; KLISCH und LEISER, 2003, KLISCH et al., 2005).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung von Plazentation (a) und feto-maternaler Verbindung (b) beim Rind. Zweikernige Trophoblastenzellen (1,2) fusionieren mit maternalen Epithelzellen (3). Nach Exocytose gelangt u.a. PAG in den maternalen Blutkreislauf. Ab dem 40. Trächtigkeitstag werden beim Rind kurzlebige dreikernige Zellen gebildet die nach Verschmelzung im Trophektoderm resorbiert werden (4,5). (nach GREEN et al. 1998)

Zu den von der Plazenta gebildeten und durch die BNC abgegebenen Stoffen zählen neben den PAG noch verschiedene Gonadotropine, Laktogene, Somatomammotropine, Prolaktin sowie Wachstumshormone und –faktoren. Sie alle stehen vermutlich in Zusammenhang mit der Entwicklung, der Erkennung und dem Erhalt der Trächtigkeit, ihre genauen Regulations- und Wirkmechanismen konnten allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine Übersicht der endokrinen Funktion der Plazenta und des feto-maternalen Syncytiums findet sich bei BECKERS et al. (1998). In Abbildung 5 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Verbindung einer fetalen und einer maternalen Zelle (Pfeil) dargestellt.



**Abb. 5:** Beginnende Bildung einer feto-maternalen Hybridzelle beim Rind (mit freundl. Genehmigung von Dr. K. Klisch, MH Hannover).

Nach der Entdeckung der PAG wurde vermutet, dass diese eine Rolle bei der Immunsuppression im Uterus spielen, also eine Schutzfunktion für den Embryo darstellen (ZOLI et al., 1992b, DUNBAR et al., 1990). Nach GURUPRASAD et al. (1996) und ROBERTS et al. (1995) handelt es sich bei den PAG um inaktive

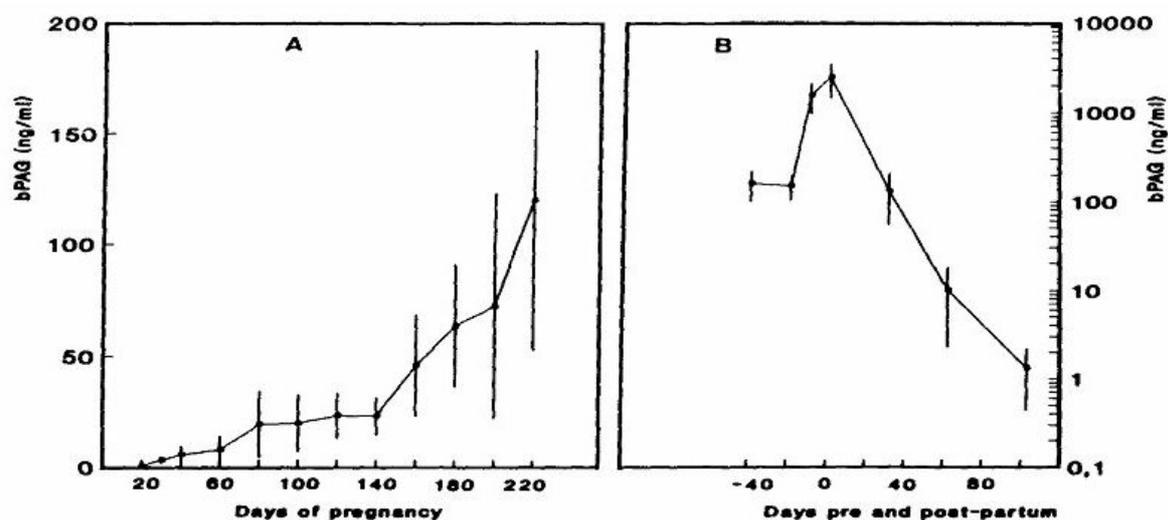
Enzyme, die dem Pepsin ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Der Verlust ihrer enzymatischen Aktivität ist auf verschiedene Aminosäuren-Substitute an katalytisch wichtigen Positionen zurückzuführen (XIE et al, 1991; GURUPRASAD et al., 1996). ROBERTS et al. (1996) vermuten, dass PAG eine endokrine Funktion besitzen, die Einfluss auf die Hormonbildung der Plazenta oder das Corpus luteum nehmen kann. Aufgrund dessen und der Mutationen im katalytischen Zentrum sollten PAG nach ROBERTS et al. (1996) nicht zu den Proteasen, sondern zu den Hormonen gezählt werden. AUSTIN et al. (1999) konnten im Endometrium eine verstärkte Bildung eines  $\alpha$ -Chemokines unter Einfluss von PAG nachweisen, während DEL VECCHIO et al. (1990, 1995a,b) bei in vitro kultivierten Gelbkörperzellen einen Effekt auf die Produktion von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  nachweisen konnten. Dies wurde durch verschiedene Untersuchungen der Arbeitsgruppe von WEEMS et al. (1996, 1998ab, 2001, 2002, 2003) bestätigt. Sie lassen vermuten, dass PAG eine Rolle in der Erkennung und Aufrechterhaltung der Trächtigkeit spielt, da in vitro ein Einfluss des PAG auf die Prostaglandin- $\text{E}_2$  Sekretion des Endometriums und damit ein indirekten Effekt auf die Progesteronbildung des CI nachgewiesen wurde.

XIE et al. (1994) stellten fest, dass PAG-2 die Fähigkeit hat auch an LH-Rezeptoren zu binden, und so als LH-Antagonist fungieren und könnte. DOSOGNE et al. (1999, 2000) stellten einen negativen Effekt des PAG auf die Reaktionsaktivität maternaler Leukozyten fest und schlussfolgerten, PAG könnte Bestandteil eines für die Immunabwehr wichtigen Regulationssystems des Organismus sein. Auch WOODING et al. (2005) vermuteten, dass es Bestandteil eines physischen oder immunologischen Schutzmechanismus des Fetus sein könnte. PATEL et al. (2004) entwickelten ein Zellkulturverfahren zur Herstellung von rekombinantem bPAG, um die Erforschung seiner Funktionen zu erleichtern, denn trotz aller Spekulationen und nachgewiesener Effekte konnte die genaue Funktion des PAG noch nicht geklärt werden (WOODING et al., 2005). Nach GREEN et al. (1998) sei das maternal nachweisbare PAG lediglich eine Folge der invasiven Verschmelzung von Embryo und Plazenta und nur aufgrund der Nähe zu maternalen Gefäßen auch im Blutkreislauf der Mutter zu finden. Tatsache ist allerdings, dass sein Nachweis im Blut für einen frühzeitigen serologischen Trächtigkeitstest bei verschiedensten

Tierarten geeignet ist (SASSER et al., 1986; ZOLI et al., 1992b; GREEN, et al., 2000 und 2005).

Quantitative Nachweise für PSPB oder PAG mittels RIA oder ELISA wurden bislang bei Rind (SASSER et al., 1986; HUMBLLOT et al., 1988ab; MIALON et al., 1994; ZOLI et al., 1992b; PERÉNYI et al., 2002; FRIEDRICH und HOLTZ, 2004; GREEN et al., 2005, GREEN und ROBERTS, 2006), Schaf (ZOLI et al., 1990), Ziege (GONZALES et al., 1999) und Pferd (LEA und BOLTON, 1988) beschrieben.

Der Verlauf der PAG-Konzentration im Blut während der Trächtigkeit beim Rind wurde von SASSER et al. (1986) und ZOLI et al. (1992b) untersucht. In Abbildung 6 ist der Verlauf der PAG-Konzentration im Blut trächtiger Kühe bis einschließlich 100 Tage post partum dargestellt. Nach einem langsamen Anstieg zu Beginn der Trächtigkeit stiegen die Konzentrationen bis zum 150. Tag etappenweise an und erreichten ihr Maximum ( $2462,42 \pm 1017,88$  ng/ml) 1 bis 5 Tage vor der Geburt. TEFERA et al. (2001) wiesen bei Tieren mit Nachgeburtsverhaltung eine signifikant höhere Konzentrationen vor der Geburt nach als bei Tieren ohne Nachgeburtsverhaltung.



**Abb. 6:** PAG-1 Verlauf bei trächtigen Kühen (ZOLI et al., 1992b).

Nach der Abkalbung fielen die Werte stetig ab und erreichten die untere Nachweisgrenze spätestens zum 90. Tag post partum. Der langsame Abfall der PAG-Konzentration lässt sich nach ZOLI et al. (1992b) und PATEL et al. (1997) zum einen auf die hohen Konzentrationen vor der Geburt und zum anderen auf eine relativ hohe Halbwertszeit des PAG zurückführen. Laut SOUSA et al. (2003) liegt die

Halbwertszeit für PAG tauriner Rinder nach dem Abkalben zwischen 7,0 und 8,8 Tagen (berechnet nach KLINDT et al., 1979). SZENCI et al. (2003) konnten eine deutlich geringere Halbwertszeit zu Beginn der Trächtigkeit zeigen und folgerten daraus, dass embryonaler Fruchttod spätestens nach 2,7 – 3,9 Tagen anhand des PAG-Abfalls sicher erkannt werden kann. BREUKELMANN et al. (2005b) beobachteten einen signifikanten Abfall der PAG-Konzentration nach einem induziertem Fruchttod am 47./48. Tag der Trächtigkeit schon nach wenigen Stunden. Spätestens 7 Tage nach dem Abbruch der Trächtigkeit erreichte die PAG-Konzentration wieder basales Niveau. Die Veränderung der Halbwertszeit hängt vermutlich mit der Zusammensetzung der angehängten Zuckerketten (N-Glycane) der zu unterschiedlichen Zeiten exprimierten PAG zusammen (KLISCH et al., 2005).

### 2.3 Trächtigkeitsuntersuchung beim Rind

Um nicht trächtige Tiere frühzeitig erkennen und gegebenenfalls erneut besamen oder beim Auftreten möglicher Störungen eine Therapie einleiten zu können ist eine sichere Trächtigkeitsdiagnose erforderlich (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE, 1999). Mögliche Verfahren einer frühzeitigen Trächtigkeitserkennung sind die (trans-) rektale Palpation, oft auch als rektale Untersuchung bezeichnet, die transrektale Ultrasonographie, sowie die Bestimmung von Progesteron- oder PAG-Verläufen (SCHNEIDER, 1982; SZENCI et al., 1998a). Die Genauigkeit und Aussagesicherheit der verschiedenen Methoden zur Trächtigkeitsuntersuchung (TU) werden anhand Sensitivität, Spezifität, sowie dem positiv prädiktivem und dem negativ prädiktivem Wert beschrieben (THRUSFIELD, 1995). Die Berechnung dieser Kriterien ist in Tabelle 2 beschrieben.

**Tab. 2:** Definition von Parametern der Trächtigkeitsuntersuchung aus verschiedenen Ergebniskombinationen (nach THRUSFIELD, 1995).

Parameter	Definition
Genauigkeit	$\Sigma$ korrekt positive und negative Diagnosen / $\Sigma$ Untersuchungen x 100
Sensitivität (SE)	$\Sigma$ korrekt positive Diagnosen / $\Sigma$ tatsächlich positive Tiere x 100
Spezifität (SP)	$\Sigma$ korrekt negative Diagnosen / $\Sigma$ tatsächlich negative Tiere x 100
prädiktiver Wert positiv (PPV)	$\Sigma$ korrekt positive Diagnosen / $\Sigma$ positiv diagnostizierte Tiere x 100
prädiktiver Wert negativ (NPV)	$\Sigma$ korrekt negative Diagnosen / $\Sigma$ negativ diagnostizierte Tiere x 100

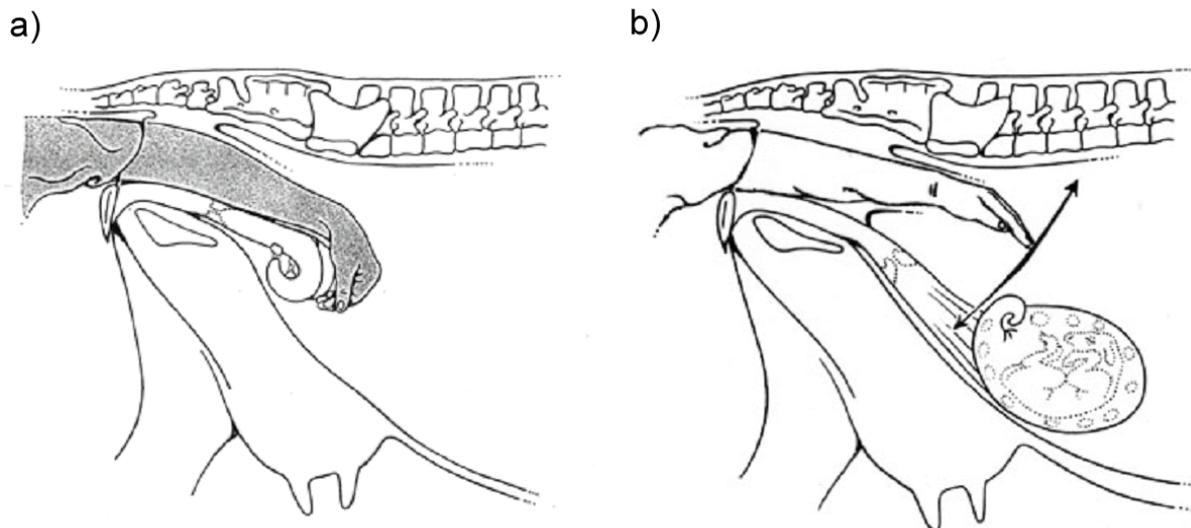
Für die Berechnungen werden nicht trächtige Tiere als negativ und trächtige Tiere als positiv bezeichnet. Die Genauigkeit eines Trächtigkeitstests gibt den Anteil korrekt positiv und negativ gestellter von allen gestellten Diagnosen an und wird als Maß der Sicherheit eines Tests angesehen (THRUSFIELD, 1995). Die Sensitivität gibt den Anteil im Test korrekt erkannter trächtiger Tiere von den tatsächlich trächtigen Tieren an. Die tatsächlich trächtigen Tiere setzen sich aus den korrekt positiv und den falsch negativ erkannten Tieren zusammen. Die Spezifität gibt den Anteil korrekter negativer Diagnosen des Tests von den tatsächlich nicht trächtigen Tieren

an. Die tatsächlich nicht trächtigen Tiere ergeben sich aus der Summe korrekt erkannter negativer Tiere und den falsch positiven Tieren. Eine Sensitivität von 90% bedeutet demnach, dass von 100 tatsächlich trächtigen Tieren 90 durch den Test als korrekt trächtig, während 10 Tiere falsch negativ erkannt werden.

Die Aussagesicherheit eines Trächtigkeitstests wird anhand des positiv (PPV) und negativ prädiktivem (NPV) Wert angegeben. Diese ergeben sich aus der Anzahl der korrekt positiven (bzw. negativen) von allen positiven (bzw. negativen) Diagnosen. Sie sind das Maß für die Verlässlichkeit der getroffenen Aussage und geben an, wie viele der als trächtig erkannten Tiere tatsächlich trächtig (bzw. nicht trächtig) sind (SZENCI et al., 1998a; MÜLLER, 2000). Bei einem PPV von 80% wären 80 von 100 Tieren bei denen eine positive Diagnose gestellt wurde tatsächlich trächtig.

### 2.3.1 Manuelle rektale Palpation

Eine manuelle rektale Palpation oder auch rektale Untersuchung von Uterus und Ovarien ist nach wie vor die gängigste Methode der Trächtigkeitsuntersuchung (AHLERS, 1999), da ohne technischen Aufwand Trächtigkeiten oder Anomalien



**Abb 7:** Schematische Darstellung einer manuellen rektalen Untersuchung beim Rind. a) Palpation der Gebärmutter b) Trächtigkeit 5. Monat (nach Rosenberger, 1990)

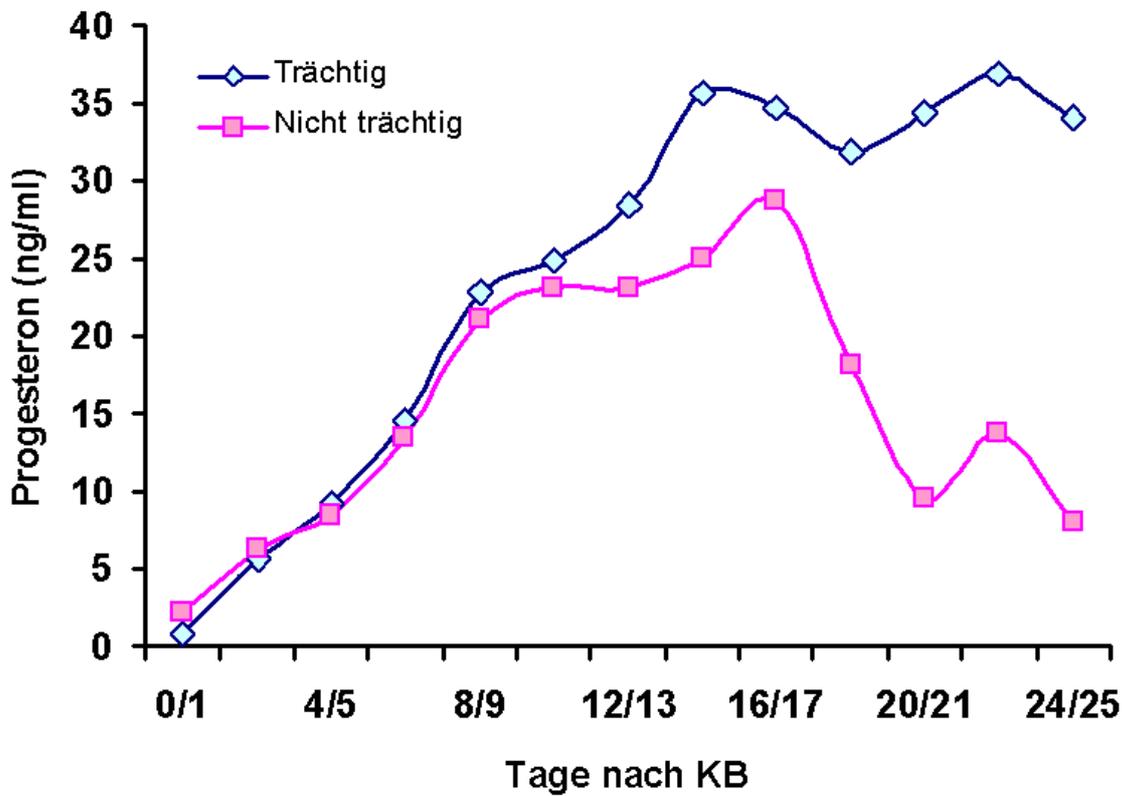
direkt diagnostiziert werden können. Hierbei werden Lage, Größe, Symmetrie der Uterushörner sowie Beschaffenheit, Inhalt und Füllungszustand des Uterus untersucht (Abb. 7). Nach VAN DER WEIJDEN und TAVERNE (1999) können in den

ersten 28 Tagen der Trächtigkeit durch die rektale Untersuchung keine Unterschiede zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren festgestellt werden. Ab der 5. Woche kann bei Färsen durch den sog. "positiven Eihautgriff" die Diagnose "tragend" gestellt werden. Bei älteren Kühen ist die Gravidität ab der 6. bis 8. Woche durch geübte Personen relativ sicher und ab der 9. Trächtigkeitswoche sehr sicher feststellbar (AHLERS und ANDRESEN, 1997). Nach PITCHER und GALLIGAN (1990) ist ein erfahrener Untersucher in der Lage ab dem 35. Tag nach der KB eindeutige Aussagen zu treffen. Verschiedenste Ursachen für Fehldiagnosen nach der rektalen TU, zum Beispiel durch die Ansammlung krankhaften Inhalts in der Gebärmutter, sind in der Literatur beschrieben (BAXTER und WARD, 1997; VAN DER WEIJDEN und TAVERNE, 1999). In verschiedenen Untersuchungen wurde beschrieben, dass es durch frühzeitige rektale Palpation unter Umständen zu einer Schädigung der Fruchthüllen oder der Frucht kommen kann, die zum Abort führt (BALL und CAROLL, 1963; ROWSON und DOTT, 1963; BELLOWS et al. 1975; ABBITT et al. 1978). Nach ABBITT et al. (1978) treten die meisten embryonalen Verluste nach Palpation der Allantochorion-Membran auf. Nach VAILLANCOURT et al. (1979) hängen Verluste vor dem 50. Tag der Trächtigkeit mehr mit dem Zeitpunkt der Untersuchung als der Untersuchungsart zusammen. Andere Studien konnten keinen direkten Zusammenhang zwischen einer manuellen rektalen Palpation und dem Auftreten des embryonalen Fröhrtods nachweisen (THURMOND und PICANSO 1993; THOMPSON et al. 1994).

### 2.3.2 Bestimmung der Progesteronkonzentration

Das Ausbleiben der Ausschüttung von Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  durch das Endometrium führt zu einer Umwandlung des Corpus luteus periodicum in das Corpus luteus graviditatis. Vom bestehenden CI wird kontinuierlich Progesteron ausgeschüttet, so dass der für einen neuen Zyklus benötigte Abfall des Progesteronspiegels ausbleibt. Der Bestimmung des Progesterongehalts in Blut oder Milch zwischen dem 18. und 24. Tag nach der Bedeckung kann daher als früher Nachweis der Trächtigkeit genutzt werden und ist ein wertvolles Hilfsmittel zur Kontrolle der Zyklusaktivität (HOLTZ et al., 1986). Tiere ohne Zyklusaktivität weisen nur basale Progesteronkonzentrationen in der Milch von weniger als 2ng/ml auf, während bei

trächtigen Tieren die Konzentrationen ab dem 14./15. Tag auf mehr als 30ng/ml ansteigt (Abb. 8).

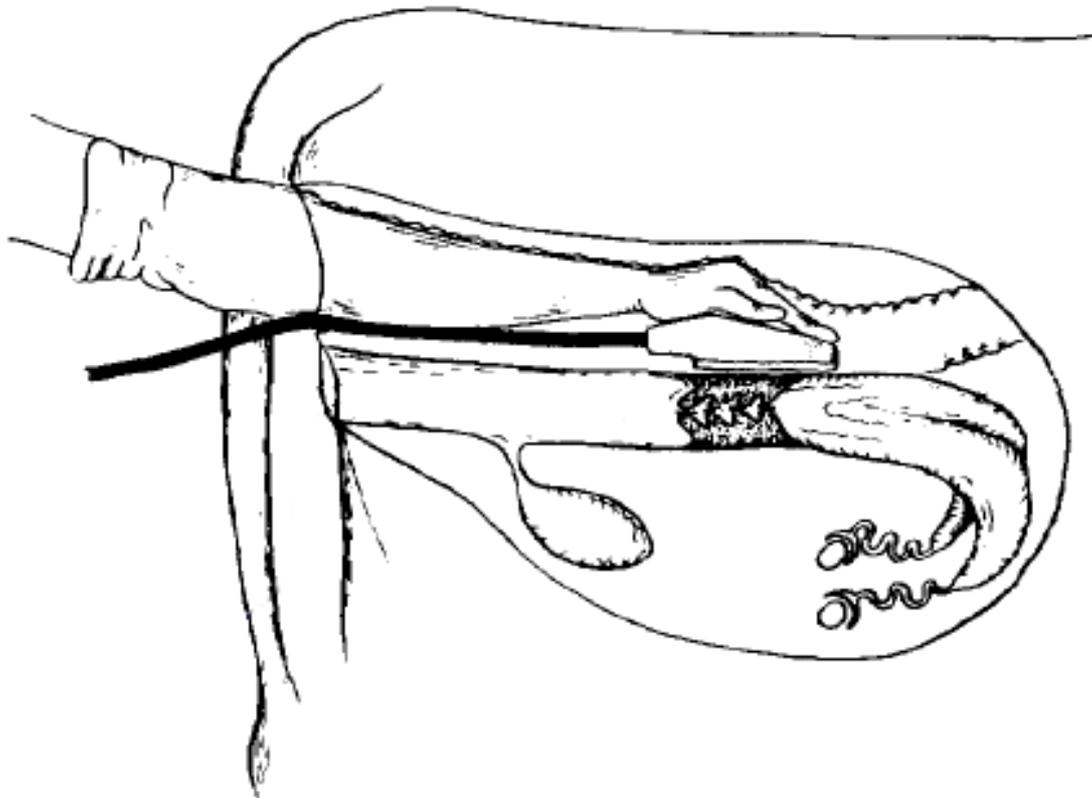


**Abb. 8:** Mittlere Nachgemelks-Progesteronkonzentrationen nach erfolgreicher (trächtig) und erfolgloser (nicht trächtig) Besamung (nach NIGGEMEYER, 1989).

Bei nicht trächtigen Tieren fällt die Konzentration ab dem 16./17. Tag des Zyklus aufgrund der Rückbildung des Cl wieder ab. Ein Progesteronwert mit weniger als 10ng/ml zwischen 20. und 21. Tag nach erfolgter Bedeckung spricht mit hoher Sicherheit gegen eine Trächtigkeit (NIGGEMEYER, 1989). Nach PIETERSE et al. (1990) liegt der Anteil korrekt trächtig erkannter Tiere zwischen 59,3 und 61%. Nach NIGGEMEYER (1989) kann am 21. Tag nach der Bedeckung die Diagnose "nicht tragend" mit einer Sicherheit von 97,9% gestellt werden, während die Diagnose "tragend" nur mit 78,4%-iger Sicherheit gestellt werden kann. Die verringerte Sicherheit der korrekt positiven Diagnose ist nach VAN DER WEIJDEN und TAVERNE (1999) auf verschiedene Ursachen, wie späterer embryonaler Früh Tod, verzögerte oder gestörte Rückbildung des Gelbkörpers sowie einen verkürzten Brunstzyklus zurückzuführen.

### 2.3.3 Ultrasonographische rektale Untersuchung

Der Einsatz bildgebender Ultrasonographie in der Trächtigkeitsdiagnostik bietet die Möglichkeit einer frühzeitigen Trächtigkeitsuntersuchung. Bei der rektalen Ultrasonographie (Abb. 9) werden Schallwellen eingesetzt, die zwischen 16Hz und 16kHz liegen, sich also außerhalb des hörbaren Bereichs befinden. Durch die bildgebende Ultrasonographie ist es nicht nur möglich, Form und Größe vorhandener Ovarstrukturen oder den Inhalt des Uterus darzustellen, sondern auch die Kontraktionen des Uterus sowie bei regelmäßiger Untersuchung die Follikelentwicklung sichtbar zu machen (PIERSON und GINTHER, 1988).



**Abb. 9:** Schematische Darstellung einer ultrasonographischen Untersuchung beim Rind (modifiziert nach BEAL et al., 1992).

Vom Schallkopf des Gerätes werden Ultraschallwellen abgegeben, die von den verschiedenen Strukturen des Uterus unterschiedlich reflektiert werden. Anhand der reflektierten und vom Schallkopf wieder aufgenommenen Schallwellen wird ein Bild berechnet. Hierbei werden Gewebestrukturen, die die Schallwellen mehr oder weniger stark reflektieren (Gewebe oder Knochen) als echogen und solche die sie nicht reflektieren, wie beispielsweise Flüssigkeiten, als nicht echogen bezeichnet

(PIERSON und GINTHER, 1988). Nach GIGER (1995) ist der Einsatz unterschiedlicher Schallfrequenzen beim Rind möglich, wobei die Auflösung der Bilder mit abnehmender Frequenz schlechter und die Eindringtiefe in das Gewebe größer wird. Für die Darstellung von Ovarien und Gebärmutter wird in der Literatur ein 7,5MHz Schallkopf verwendet.

Eine Trächtigkeitsdiagnose mittels US kann bei Färsen ab Tag 25 und bei Kühen ab Tag 28 gestellt werden (MÜLLER, 2000). Nach CURRAN et al. (1986) ist die Allantoisflüssigkeit bei Färsen frühestens ab dem 23. Tag sichtbar und ab dem 25. Tag als flüssigkeitsgefüllter Raum mit einem Durchmesser von bis zu 10mm zu erkennen. Eine sichere Diagnose der Trächtigkeit ist ab dem 28. Tag durch eine sichtbare Darstellung der Herzpulsation (GIGER, 1995) oder die Erkennung der sich heranbildenden Wirbelsäule ab dem 29. Tag (CURRAN et al., 1986) möglich. Eine Geschlechtsbestimmung des Kalbes kann ab dem 55. Tag erfolgen (BEAL et al., 1992). Die Genauigkeit und der frühestmögliche Zeitpunkt der Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultrasonographie sind abhängig vom Anwender, wie anhand der unterschiedlich beschriebenen Sensitivitäten deutlich wird. So liegt der Anteil korrekt trächtig erkannter Tiere am Tag 28 zwischen 76% (SZENCI et al., 1998a) und 98% (MÜLLER, 2000).

Die ultrasonographische Untersuchung ist nicht nur für die Überwachung der Trächtigkeit zur Erforschung physiologischer Zusammenhänge von großer Bedeutung (BEAL et al., 1992), sondern auch im Rahmen des Embryo-Transfers, besonders bei der Follikelpunktion, oder der Kontrolle des Follikelwachstums im Zusammenhang mit verschiedenen Superovulationsbehandlungen ein unverzichtbares Hilfsmittel (FRICKE, 2002). Die genaue Funktionsweise, sowie weitere Möglichkeiten des Einsatzes der Ultrasonographie in der Brunstdiagnostik und die Sicherheit der gestellten Diagnosen haben PIERSON und GINTHER (1988), KÄHN et al. (1989), sowie KASTELIC et al. (1988) und MÜLLER (2000) eingehend abgehandelt.

### 2.3.4 Nachweis des "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG)

Seit 1976 konnten beim Rind immer wieder neue Glykoproteine embryonalen Ursprungs nachgewiesen werden, die in Zusammenhang mit einer Trächtigkeit stehen (ROBERTS und PARKER, 1976; BUTLER et al., 1982; ZOLI et al., 1992ab). Die meisten dieser Proteine zählen zu einer Gruppe saurer Proteasen, den PAG. Der Nachweis verschiedener PAG als Hilfsmittel einer frühen Trächtigkeitsdiagnose wurde erstmals von SASSER et al. (1986) beschrieben. Ab dem 24. Tag nach der Besamung treten erhöhte Konzentrationen im maternalen Blutserum auf. Eine verlässliche Trächtigkeitsdiagnose anhand der PAG-Konzentration ist ab dem 28. Tag möglich (Tabelle 3). Da ein Anstieg der PAG-Konzentration bei einzelnen Tieren nicht vor dem 36. Tag nachgewiesen werden konnte (SZENCI et al., 1998), liegt die Sicherheit einer PAG-Untersuchung um den 30. Tag bei 95% und ab dem 40. Tag bei nahezu 100%. Nach BREUKELMANN et al. (2005a) ist der Nachweis von PAG auch nach ET möglich ist und kann zur Trächtigkeitsuntersuchung genutzt werden.

**Tab. 3:** Genauigkeit einer PAG-Trächtigkeitsdiagnose mittels RIA zu verschiedenen Zeiten nach erfolgter Besamung beim Rind (Se=Sensitivität, Sp=Spezifität, PPV=positive predictive value, NPV=negative predictive value).

Tage nach Belegung	Anzahl	SE (%)	SP(%)	PPV(%)	NPV(%)
29-30	138	92,0	82,6	81,6	92,5
35	430	98,9	87,5	93,0	97,9
37-38	100	100	84,0	83,5	100

nach SCENCI et al. (1998) und ZOLI et al. (1992b)

Aufgrund seiner hohen Halbwertszeit von bis zu 8 Tagen (SOUSA et al., 2003) kann die Aussagesicherheit des PAG-Trächtigkeitstests, bei einer erneuten Belegung vor dem 60. Tag nach der letzten Kalbung, beeinflusst werden. Neben den von SASSER et al. (1986) und ZOLI et al. (1992b) beschriebenen RIAs zum Nachweis von PSPB und bPAG1 wurde von GREEN et al. (2005) ein Sandwich-ELISA entwickelt, der auf drei monoklonalen Antikörpern basiert und ebenfalls eine Trächtigkeitsdiagnose ab dem 28. Tag nach der Belegung ermöglicht. Die monoklonalen Antikörper besitzen eine hohe Bindungsaffinität zu drei kurzlebigen

PAG, deren Konzentration während der Trächtigkeit weit aus geringer ist, aber ihr basales Niveau bereits 60 Tage nach der Kalbung wieder erreichen.

PERÉNYI (2002) stellte fest, dass die PAG-Konzentration bei Einzeltieren bereits ab dem 25. Trächtigkeitstag Werte von mehr als 5,0ng/ml, mitunter sogar bis zu 17ng/ml (Tag 30), erreichen kann. Nach einem erkennbaren ersten Anstieg, fiel die Konzentration zumeist wieder leicht ab und blieb bis zum 60. Tag auf gleichem Niveau. Nach TAVERNE et al. (2002) ist ein deutlich erkennbares Absinken der PAG-Konzentration als Zeichen für den Abbruch der Trächtigkeit angesehen werden. Die im Blut messbare PAG-Konzentration scheint neben dem Trächtigkeitstag auch von der Milchmenge, sowie Anzahl und Geschlecht der Feten beeinflusst zu werden. LÓPEZ-GATIUS et al. (2006) wiesen eine signifikant negative Korrelation zwischen Milchleistung und PAG-Gehalt bei hochleistenden Kühen nach. Signifikant höhere PAG-Konzentrationen wurden auch bei männlichen Feten und bei Zwillingsträchtigkeiten nachgewiesen.

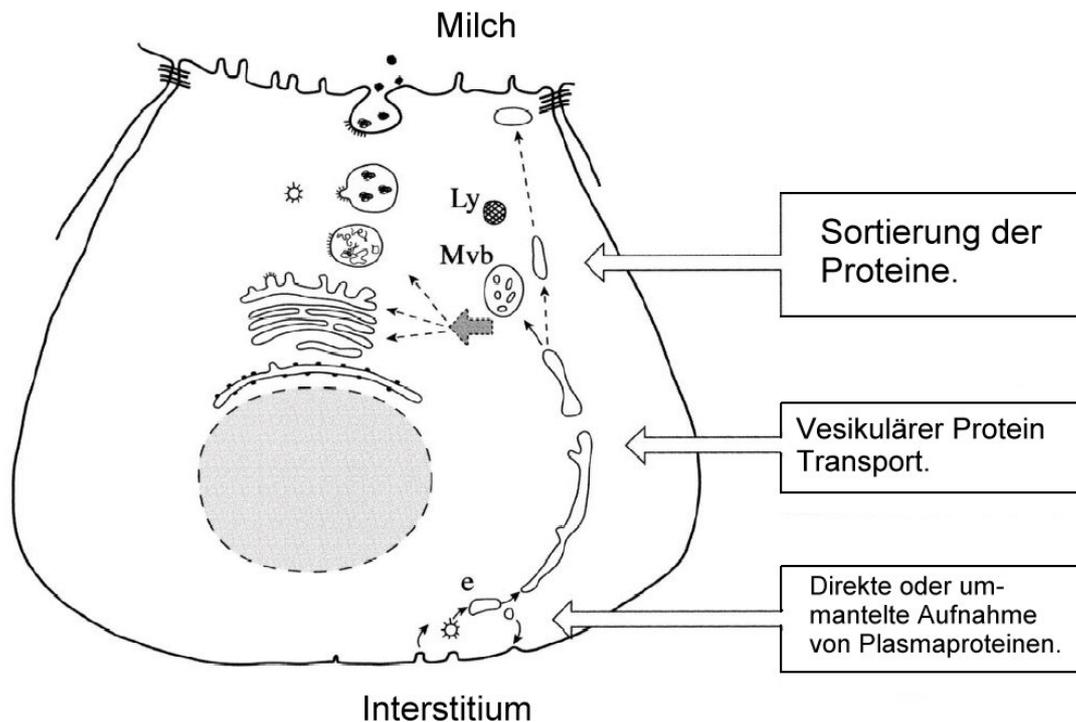
Mittels Radioimmunoassay (GONZÁLEZ et al., 2001) oder ELISA (FRIEDRICH und HOLTZ, 2004) ist es möglich PAG auch in der Milch nachzuweisen. Diesen Nachweis als Hilfsmittel in der Trächtigkeitsdiagnostik zu verwenden, wurde bislang nur bei der Ziege (GONZÁLEZ et al., 2001) beschrieben, da in der Kuhmilch nur geringe Konzentrationen, durchschnittlich etwa 2-3% der im Blut enthaltenen Menge nachgewiesen werden konnten (METELO et al., 2004; GAJEWSKI et al., 2005).

## 2.4 Milchproteinbildung und Aufbereitung der Milch

### 2.4.1 Milchproteinbildung

Die Milch wird in der Literatur als eine inhomogene, komplexe Flüssigkeit charakterisiert, die sich aus verschiedenen Stoffgruppen zusammensetzt. Als Durchschnittswerte für Kuhmilch werden 87,5% Wasser, 4,8% Kohlenhydrate, 3,5-4,2% Fett, 3,5% Protein und 0,7% Mineralstoffe angegeben (LKV, 2005). Die chemische Zusammensetzung der Milch ist abhängig von Spezies, Rasse, Alter, Gesundheits- und Ernährungsstatus sowie Laktationsstadium bzw. -dauer, Körpergewicht, Trächtigkeit, Individuum und verschiedenen Umweltfaktoren wie Jahreszeit, Vegetation, Klima, Fütterung, Krankheiten, Melktechnik sowie Melk- bzw. Saugfrequenz (nach TAMBAJONG, 2002). Die Bestandteile der Milch gelangen durch unterschiedliche Mechanismen aus den Drüsenepithelzellen in das Lumen der Alveolen. Die Fette, überwiegend Triglyceride, werden aus den Vesikeln des Golgi-Apparats gebildet und werden durch einen apokrinen Sekretionsmechanismus abgegeben (LIEBIG, 2003). Die Milchproteine setzen sich aus verschiedenen Gruppen zusammen. Nach Zentrifugation wird zwischen zwei Haupt-Proteinfractionen unterschieden, den Caseinen und den Molken- oder Serumproteinen. Als Molkenproteine werden Proteine bezeichnet, die nach der Ausfällung der Caseine in der wässrigen Fraktion der Milch verbleiben. Zu ihnen gehören das bovine Serum Albumin (BSA),  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\alpha$ -Lactalbumin, die Immunoglobuline und die Proteose-Peptonfraktion, eine Mischung verschiedenster hitzestabiler saurer Glykoproteine (WHITNEY et al., 1976), zu denen auch das wasserlösliche PAG gezählt werden kann (GONZÁLEZ et al., 2001).

Milchproteine können auf verschiedenen Wegen aus dem einschichtigen Drüsenepithelzellen in das Lumen der Alveolen gelangen. Da sie aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften die Doppelmembran der Zellen nicht passieren können, muss der Transport in das Lumen aktiv erfolgen. Im Drüsenepithel synthetisierte Proteine werden vom Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel abgeschnürt und durch Exocytose aus der Zelle abgegeben (merokrine Sekretion). Extrazelluläres Material wird mittels Endozytose von der basalen Seite aufgenommen und durch Endocytose in das apikale Lumen der Alveole freigesetzt. Dieser Vorgang wird als Transcytose bezeichnet (nach NEVILLE, 1999 und OLLIVIER-BOUSQUET, 2002).



**Abb. 10:** Schematische Darstellung transzellulärer Wege von Plasmaproteinen durch eine Milchdrüsenepithelzelle. Mittels Endocytose aufgenommene Proteine werden in Endosomen (e), Vesikularkörpern (Mvb) oder Lysosomen (Ly) in der Zelle angereichert und nach einer erfolgten Sortierung teilweise in das Lumen der Milchalveolen abgegeben (Exocytose) (nach BOISGARD et al., 2001).

Nach BOISGARD et al. (2001) gelangen Plasmaproteine, zu denen auch das PAG gezählt werden kann, in der Regel mittels Transcytose durch das Drüsenzellepithel in die Milch. Hierbei nehmen zahlreiche noch unerklärte Sortierungs- und Transportmechanismen einen Einfluss auf die von den Epithelzellen aufgenommenen Proteine (Abb. 10), so dass der in der Milch nachweisbare Anteil verschiedener Plasmaproteine von den Konzentrationen im Blut stark abweichen kann. In der Zeit vor der Geburt konnten METELO et al. (2004) einen Anteil von bis zu 10% der PAG-Blutkonzentration in der Milch nachweisen, während der Anteil zu Beginn der Trächtigkeit etwa 1% betrug. METELO et al. (2004) vermuten das dies mit dem von PEAKER (1974) beschriebenen pränatalem Auftreten geöffneter Tight Junctions zwischen den äußeren Epithelzellen der Milchdrüse zusammenhängen könnte, durch welche ein direkter Übergang verschiedener Stoffe vom Interstitium in die Milch in dieser Zeit möglich ist.

Neben den Plasmaproteinen sind verschiedene Enzyme in der Milch nachweisbar. Viele von ihnen sind milcheigenem Ursprungs (originäre Enzyme). Bakterielle Enzyme können bei Infektionen schon im Euter entstehen, gelangen meistens jedoch während der Entnahme einer Probe in die Milch. Die meisten aktiven originären Enzyme der Milch lassen sich den Gruppen der Oxidoreduktasen (Lactoperoxidase, Katalasen) oder Hydrolasen (Lipasen, Proteasen) zuordnen (SHAHANI et al., 1973). Während der Lagerung der Proben nehmen sowohl originäre als auch bakterielle Enzyme durch ihre katalytischen Fähigkeiten Einfluss auf die Inhaltsstoffe und die Haltbarkeit einer Milchprobe. In wie weit dabei auch in der Milch befindliche PAG beeinflusst werden, ist bislang nicht nachgewiesen. Durch den Zusatz verschiedener Konservierungsstoffe wie Kaliumdichromat oder Natriumazid oder eine gekühlte Lagerung lässt sich das die Aktivität proteolytischer Enzyme sowie das mikrobielle Wachstum von Bakterien in der Milch reduzieren, was zu einer Verlangsamung der Verstoffwechslung der Milchproteine führt und so eine längere Haltbarkeit der Proben ermöglicht (SENYK et al., 1985; MA et al., 2003).

#### 2.4.2 Aufbereitung der Milch

Da die Milch in ihrer Zusammensetzung stark variieren kann und verschiedenen enzymatischen Veränderungen unterliegt, werden in der Literatur unterschiedliche Verfahren zur Haltbarmachung und Homogenisierung beschrieben.

Während der Lagerung von frischer Milch kommt es durch das Verbinden des Milchfetts zu größeren Fetttröpfchen, den Chylomikronen, zum Aufrahmen der Milch an der Oberfläche. Nach dem Abschöpfen des Milchfetts verbleibt als wässrige Phase die Magermilch. Bei der Homogenisierung werden die in der Milch gebildeten großen Fetttröpfchen (Chylomikronen) durch verschiedene Verfahren wieder dahingehen gespalten, dass die fette und die wässrige Phase eine einheitliche Mischung bilden. Zu den Verfahren der Homogenisierung zählen die Ultraschallhomogenisierung für 15sek. bei 20kHz und 50Watt (nach NIGGEMEYER, 1989) und die Milchtemperierung für 30 Minuten bei 39°C (nach METELO, 2004). Durch Zentrifugation lässt sich Frischmilch in eine Fettfraktion (Rahm), eine wässrige Fraktion (Magermilch) und einen Bodensatz (Casein-Mizellen und Milchzellen) trennen. Nach NIGGEMEYER (1989) kann die Herstellung der Magermilch unter Verwendung von verschlossenen und auf den Kopf gestellten Reaktionsgefäße bei

einer 30-minütigen Zentrifugation bei 620xg erfolgen. Durch den Zusatz von Lab oder die Absenkung des pH-Wertes, wird die Struktur der Caseinmizellen zerstört und das Casein kann mittels 25-minütiger Zentrifugation (2000xg, +4°C) ausgefällt werden (HAYES und NIELSEN, 2000). Die verbleibende caseinfreie wässrige Phase wird als Milchserum oder Molke bezeichnet. Das Absenken des pH-Werts wirkt sich zudem negativ auf proteolytische Prozesse in der Milch aus und reduziert das enzymatische Zersetzen von Proteinen und Glykoproteinen, die während der Lagerung auftreten (SENYK et al., 1985; MA et al., 2003). Durch Wärmebehandlung oder Zugabe verschiedener Konservierungsstoffe, wie Kaliumdichromat bzw. Natriumazid (MARTINEZ et al., 2003; MKU, 2004) oder einer Lagerung bei +4 oder -20°C lässt sich dieser Vorgang ebenfalls aufhalten bzw. unterbinden. Eine Wärmebehandlung von mehr als 60°C kann allerdings zu einer Inaktivierung oder Denaturierung von Milchenzymen oder -proteinen führen (ALICHANDIS et al. 1986), so dass Milchproben für die Bestimmung von Protein-Konzentrationen gekühlt gelagert werden sollten. Die Lagerung bei -20°C sowie der Zusatz von 0,1%igem Natriumazid zur Reduzierung enzymbedingter Veränderungen in der Milch bis zur anschließenden radioimmunologischen Bestimmung der PAG-Konzentration wurde von GONZÁLES et al. (2001) für Magermilchproben der Ziege als geeignet beschrieben.

## 2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### 2.5.1 Enzymimmunologische Nachweisverfahren

Die Konzentrationsbestimmung verschiedener makromolekularer Substanzen, zu denen auch Hormone und Proteine zählen, mittels eines Radioimmunoassay (RIA) findet seit 1960 in den verschiedensten Bereichen der Diagnostik Verwendung (CHARD, 1989). Seit der Entdeckung des enzymimmunologischen Nachweises (EIA) als Alternative zum Umgang mit den radioaktiven Substanzen des RIA wurden verschiedenste Formen des EIA für den Nachweis unterschiedlicher Stoffe entwickelt (CROWTHER, 2000; WILD, 2001).

Bei der immunologischen Bestimmung biologisch aktiver Substanzen in Körperflüssigkeiten wird die Reaktion zwischen Antigen (AG) und spezifischem Antikörper (AK) durch die nachfolgende Bestimmung einer an das AG oder den AK gebundenen radioaktiven Substanz (z.B.  $^{131}\text{Iod}$ ,  $^{125}\text{Iod}$ ) oder eines Enzyms (z.B. Meerrettichperoxidase oder andere pflanzliche, bakterielle oder tierische Enzyme) nachgewiesen. Bei der Verwendung einer radioaktiven Markierung wird vom "Radio-Immuno-Assay" (YALOW und BERSON, 1960 und 1961), bei der Verwendung einer enzymatischen Markierung vom "Enzym-Immuno-Assay" (NAKANE und PIERCE, 1967) gesprochen. Markierungssubstanzen für pharmakologische, chemische oder metabolische Untersuchungen werden als Tracer bezeichnet. Der EIA eignet sich vor allem zum Nachweis von Medikamenten, Hormonen oder Proteinen (z.B. Tumormarker) und ist annähernd so empfindlich wie der RIA, ohne den Nachteil des Umgangs mit radioaktiven Stoffen (MEYER, 1989). Laut WEBSTER et al. (1990) ist eine Umwandlung bereits etablierter RIA-Tests in einen EIA möglich, da im RIA verwendete Antikörper nach einer Änderung der Markierung auch im EIA eingesetzt werden können.

Häufig verwendete EIA-Verfahren sind EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) und ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay). Der EMIT wird als homogenes, der ELISA als heterogenes Testverfahren bezeichnet. Homogen bedeutet hierbei, dass kein Trennschritt erfolgt, um das vom AK gebundene Material von dem verbliebenen freien Material zu entfernen. Das Testreagens beim EMIT ist meist ein (Enzym-AG-)AK-Komplex dessen Enzym durch die AK-Bindung inaktiviert

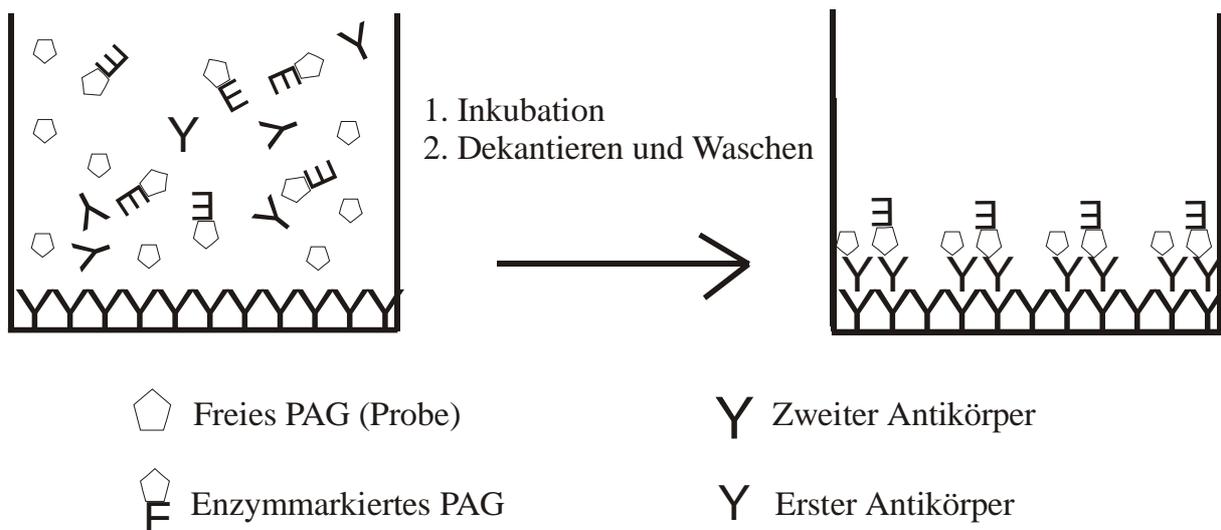
ist. Das AG, also die zu messende Substanz des Untersuchungsgutes, verdrängt entsprechend seiner Konzentration einen Teil des gebundenen Enzym-AG vom spezifischen Antikörper. Durch die Freisetzung, das heißt die Aufhebung der sterische Hemmung, wird das Enzym aktiviert und löst eine (Farb-) Reaktion aus. Die so messbare Enzymaktivität ist dabei proportional zu der AG-Konzentration der Probe ohne eine Trennung von löslicher u. AG-gebundener Phase ist nicht notwendig (WILD, 2001). Diese Verfahren sind aber nur für den Nachweis weniger Stoffe geeignet, da die hierfür genutzten Enzyme nur eine geringe spezifische Aktivität aufweisen und ihre Reaktionsaktivität durch zahlreiche Störfaktoren beeinflusst wird (MEYER, 1989).

Erfolgt eine Trennung von antikörpergebundenem und -freiem Material wird von einem heterogenen Assay, dem ELISA gesprochen. Die unterschiedlichen Varianten des ELISA, wie den "Antibody capture assay", den "Antigen capture assay" oder den "Doppelantikörper" oder "Sandwich assay" (MEYER, 1989) nutzen alle das Prinzip einen biologischer Stoff an eine feste Matrix zu binden. Als Matrix kommen eigens für den ELISA entwickelte Mikrotiterplatten aber auch Polymerkugeln zum Einsatz. Die Trennung kann z.B. durch einfaches Dekantieren des ungebundenen Markers erfolgen. Der ELISA lässt sich ferner nach zwei Testprinzipien eingliedern, dem *kompetitive Assay* und dem *nicht-kompetitiven Assay (Sandwich-Assay)*.

Beim *nicht-kompetitiven Assay* wird zunächst ein spezifischer Antikörper an eine Fest-Phase, beispielsweise eine Mikrotiterplatte, gebunden. Im nächsten Schritt wird die Testlösung hinzugegeben und das Hormon, bzw. das Antigen, vom gebundenen Antikörper adsorbiert. Im nächsten Schritt wird ein zweiter spezifischer Antikörper hinzugegeben, der bereits markiert ist oder anschließend selektiv markiert werden kann. Die gebundene und messbare Menge des markierten Antikörpers ist proportional zur Antigenmenge oder zumindest positiv korreliert. Die Durchführung eines solchen ELISA ist entweder mit Vorinkubation oder mit gleichzeitiger Inkubation von 1. und 2. Antikörper sowie der Probe möglich. Der nicht-kompetitive Test kann nur für den Nachweis von Substanzen mit höherem Molekulargewicht verwendet werden, da für die Bindung der AK mindestens zwei unabhängige Epitope erforderlich sind. Daher ist der nicht-kompetitive Test für niedermolekulare Substanzen, wie Steroidhormone, ungeeignet (MÖLLER, 1991).

Beim *kompetitiven Assay* konkurriert eine unbestimmte Menge unmarkierter Substanzen, meist Hormone oder Proteine, mit einer bekannten Menge markierter Hormone oder Proteine um eine limitierte und konstante Menge von Antikörper-Bindungsstellen, die an eine Fest-Phase, z.B. an eine Mikrotiterplatte, gebunden sind. Die spezifischen Antikörper können dabei entweder direkt an die feste Phase gebunden werden oder unter Verwendung eines zweiten, IgG-spezifischen Antikörpers, an diese gekoppelt werden (Doppelantikörper-Verfahren).

Bei dem von MIYAI et al. (1976) erstmals beschriebenen Doppelantikörper-Verfahren wird eine Mikrotiterplatte zunächst mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper vom Schaf beschichtet. Anschließend werden durch die immunologische Bindung spezifische Antikörper an den Beschichtungsantikörper gebunden. Dies kann entweder in Vorinkubation oder bei gleichzeitiger Inkubation mit dem nachzuweisenden Antigen erfolgen (Abb. 11).



**Abb. 11:** Prinzip eines kompetitiven Doppelantikörper-ELISA mit gleichzeitiger Inkubation von Probe, spezifischem Antikörper und Tracer (nach MÖLLER, 1991).

An die gebundenen AK lagern sich das AG der Probenlösung (z.B. einer Serumprobe) an. Nach der Zugabe des markierten Antigens (Tracer), erfolgt ein Trennschritt, um nicht gebundenes (markiertes) Probenmaterial zu entfernen, welches sonst die Ergebnisse verfälschen würde. Die Enzymaktivität des gebundenen Enzyms kann nach Zugabe eines entsprechenden reaktiven Substrats photometrisch gemessen werden und korreliert mit der in der Probe enthaltenen AG-

Menge (MEYER, 1989). Eine Übersicht über die zumeist verwendeten Enzymmarker findet sich bei PORSTMANN und KIESSIG (1992). Gängigste Enzymmarker sind die alkalische Phosphatase, die Peroxidase oder die Avidin bzw. Streptavidin-Peroxidase.

Die Markierung mit Biotin anstelle der direkten Peroxidase- oder einer Avidin-Markierung ist für den Assay von Vorteil. Zum Einen ist das Verfahren der Biotinmarkierung relativ einfach und preisgünstig, zum Anderen treten aufgrund des geringen Molekulargewichts des Biotins nur sehr geringe sterische Behinderungen der Tracer-Antikörperbindung auf (HENNIES, 1994). Biotin besitzt zudem eine hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin und kann aufgrund seiner reaktiven Carboxylgruppe, die nicht an der Bindung mit dem Streptavidin beteiligt ist, leicht an die Aminosäure Lysin und so an einen Antikörper gekoppelt werden. Aus diesen Gründen findet es in vielen immunchemischen Techniken Verwendung (BIEBER, 1990). Bei sachgerechter Lagerung und Zusatz von Gefrierschutzmitteln weisen biotinmarkierte Proteine eine Haltbarkeit von mehrere Monaten bis zu Jahren auf (MUTAYOBA et al. 1990).

Auch moderne Nachweisverfahren der Biosensorik, wie der Einsatz von Nanotiterplatten, "Surface Plasmon Resonance" (SPR) oder "Whole-Cell-Systems", basieren auf der Fähigkeit spezifischer Antikörper gezielt an die Epitope nachzuweisender Analyte zu koppeln. Die Sensitivität neuerer Verfahren übersteigt die des ELISA deutlich, da durch den Einsatz sensitiver Messgeräte wie Laserabtastung, DNA-Mikrochips oder Immunsensoren auch schon minimalste Mengen teils ohne die Verwendung einer Markierungssubstanz mit hoher Genauigkeit nachgewiesen werden können (KEUSGEN, 2002).

### 2.5.2 Qualitätskriterien des ELISA

Zur Bestimmung der Genauigkeit eines ELISA können verschiedene Qualitätskriterien erfasst werden. Zu ihnen zählen die untere Nachweisgrenze (Sensitivität), der arithmetischen Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (SE), Interassay und Intraassay-Variationskoeffizient (CV),

Wiederfindungsrate (RR%), Parallelität der Standardkurve, sowie die Feststellung möglicher Kreuzreaktionen (Spezifität).

Als Maßstab für Sensitivität des ELISA wird die untere Nachweisgrenze angesehen. Sie gibt an welche untere Konzentration sich noch signifikant vom 0-Standard eines Assays unterscheidet. Sie wird anhand des Mittelwerts von mindestens 20 Analysen des 0-Standards zuzüglich der doppelten Standardabweichung errechnet. Der Variationskoeffizient ist das Maß für die Wiederholbarkeit des ELISA. Er ist der prozentuale Anteil der Standardabweichung am arithmetischen Mittelwert einer Probe (nach MÖLLER, 1991; MANN, 1996) und gibt an, in wie weit die Konzentration einer mehrfach gemessenen Probe variiert. Unterschieden werden hierbei die Intraassay- und die Interassay-Varianz. Die Intraassayvarianz ist der Variationskoeffizient für wiederholte Messungen einer Probe innerhalb eines Tests, also für Proben auf einer Mikrotitrationsplatte. Die Interassayvarianz wird durch den Variationskoeffizienten für wiederholte Messungen einer Probe auf unterschiedlichen Mikrotitrationsplatten beschrieben. Optimale Intraassay-Variationskoeffizienten eines Assays sollten für Proben im mittleren Konzentrationsbereich bei etwa 5% liegen und 10% nicht übersteigen. Für Proben am unteren Messbereich sowie Interassay-Variationskoeffizienten können bis zu 20% in Kauf genommen werden (WILD, 2001).

$$CV(\%) = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100\%$$

Als Wiederfindungsrate oder "recovery rate" (RR%) wird der prozentuale Anteil der gemessenen mittleren Konzentration von der erwarteten Konzentration bezeichnet.

$$RR(\%) = \frac{\text{gemessenen Konzentration}}{\text{erwartete Konzentration}} \times 100\%$$

Die Spezifität eines Assays gibt an, in welchem Maße ein Test von unspezifischen Substanzen in den zu untersuchenden Proben beeinflusst wird (WILD, 2001). Hierzu werden Verdünnungsreihen von dem nachzuweisenden Stoff (Antigen) ähnlichen

Substanzen erstellt und geprüft, bei welcher Konzentration diese das Bindungsvermögen für das Antigen beeinträchtigen. ZOLI et al. (1992b) konnten keine Kreuzreaktivität des verwendeten PAG-Antikörpers zu verschiedenen Hormonen der Hypophyse (LH, FSH), der Plazenta (bPL, SP<sub>1</sub>) oder des Fetus (AFP) feststellen.

Die Parallelität von Verdünnungsreihen und Standardkurven ist ein weiteres wichtiges Kriterium für die Verlässlichkeit des Nachweisverfahrens. Sie dient der Überprüfung der Messgenauigkeit der Standardkurve im Vergleich zu einer natürlich vorkommenden Menge an PAG in einer Serumprobe. Serumproben mit hohen PAG-Konzentrationen werden in einer Verdünnungsreihe vorverdünnt und analysiert. Die Parallelität der Kurven ist gegeben, wenn die Konzentration der Verdünnungsreihen im gleichen Maße abnimmt wie die der Standardreihen (MÖLLER, 1991). Ein nicht paralleler Verlauf kann eine übermäßige Verdrängung des Tracers, beispielsweise bei der Verwendung eines zu großem Probenvolumens verursachen und so die Genauigkeit des Tests negativ beeinflussen (HENNIES, 1994).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Gewinnung und Aufbereitung von Blut- und Milchproben

Für die Entwicklung und Validierung benötigte Blutproben wurden in der Zeit vom 01.04.2003 bis zum 15.10.2005 auf verschiedenen Betrieben in der Region um Göttingen, Einbeck und Kleve genommen. Bei den Betrieben handelte es sich ausnahmslos um milcherzeugende Betriebe mit Tieren der Rasse Holstein Frisian. Da die Entnahme einer einzelnen Blutprobe laut KIRACOFÉ et al. (1993) repräsentativ für die PAG-Konzentration im Blut einer Kuh und somit auch für den Nachweis einer Trächtigkeit ausreichend ist, erfolgte eine einmalige Blutentnahme nach einem von MEERMANN (1983) beschriebenen Vorgehen bei fixierten Tieren aus der Schwanzvene (*V. caudalis mediana*). Mittels einer sterilen 5ml Luer-Einweg-Spritze und Einweg-Kanülen (3 BD Microlance™) wurden mindestens 3ml Blut entnommen, zur Gewinnung des Blutserums 10 Stunden bei +4°C gelagert und anschließend für 10 Minuten bei 1500xg zentrifugiert. Von jeder Probe wurden dreimal 1ml Blutserum in 1,5ml Reaktionsgefäßen (EASY CAP, Sarstedt, Nümbrecht) bei -20°C bis zur Analyse mittels ELISA oder RIA (ULG, Belgien) tiefgefroren.

Für die Milchanalyse wurden entweder 10ml Nachgemelksmilch aus einem klinisch gesunden Viertel oder eine Probe aus dem Gesamtgemelk eines Tieres entnommen, hierbei wurde darauf geachtet, dass die Milchproben sauber gewonnen und nicht durch Schmutz o.ä. kontaminiert wurden. Der Transport und die Lagerung der Milchproben erfolgte in 12ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) bei +4°C. Die Milchproben wurden entweder frisch analysiert oder als Vollmilch- bzw. Magermilchprobe bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung oder Analyse gelagert.

## 3.2 Entwicklung des PAG-ELISA

Die Zusammensetzung und die Beschreibung der im weiteren verwendeten Chemikalien, Puffer und Geräte sind im Anhang aufgeführt.

### 3.2.1 Entwicklung des Blut-ELISA

#### **Herstellung der PAG-Stammlösung (SL-1)**

Aufgereinigtes bovines PAG (bPAG-1) wurde von Prof. J.F. Beckers (ULG, Belgien) zur Verfügung gestellt. Genaue Angaben zur Gewinnung des bovinen PAG aus bovine Kotyledonen mittels HPLC sind bei ZOLI et al. (1991) nachzulesen. Das gereinigte bPAG wurde in PBS gelöst und als PAG-Lösung mit einer Konzentration von 1mg/ml bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Für die Herstellung der PAG-Stammlösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wurden 5 Eppendorfgefäße mit je 10 $\mu\text{l}$  PAG-Lösung und 990 $\mu\text{l}$  TP-1 gefüllt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Diese wurden zur Herstellung von Aliquots der Kontrollseren und Standardkurven nicht öfter als fünfmal aufgetaut und anschließend sofort wieder tiefgefroren.

#### **Markierung des PAG mit Biotin (Tracerherstellung)**

Die Herstellung des PAG-Tracers erfolgte in Anlehnung an das von HENNIES (1994) verwendete Verfahren zur Biotinisierung von caprinem Somatotropin.

Für die Herstellung des biotinylierten PAG wurden drei Überschusslösungen, die 20, 50 oder 125 Biotinmoleküle auf ein PAG-Molekül enthalten, verwendet. Je Überschusslösung wurden 40 $\mu\text{l}$  PAG-Stammlösung mit 160 $\mu\text{l}$  Boratpuffer versetzt. Die erforderlichen Biotinmengen errechneten sich wie folgt:

$$\frac{40\mu\text{l PAG-Lsg.} \times 455\text{DA (Biotingewicht)}}{67\text{kDA (PAG-Gewicht)}} \times \text{Überschuß (20x/50x/125x)} = \text{Biotinmenge}$$

Es wurden 5,43 $\mu\text{g}$ , 13,6 $\mu\text{g}$  bzw. 34,0 $\mu\text{g}$  Biotin für die 20-, 50- oder 125-fache Überschusslösung zugesetzt. Zur Vereinfachung der Biotindosierung wurde eine Biotinstammlösung hergestellt, hierzu wurden 2mg Biotin (BcapNHS) in 1ml DMSO gelöst. Die nicht verwendete Biotinstammlösung wurde bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert und nach der Überprüfung der Tracer umgehend entsorgt. Die angesetzten Lösungen wurden

anschließend 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 20µl 1M Ammoniumchlorid und anschließende 10-minütige Inkubation wurde die Reaktion abgestoppt.

Die freien Biotin- und PAG-Moleküle der drei Biotinlösungen wurden mittels einer PD-10 Säule (Sephadex G25) von den markierten Tracer-Molekülen getrennt. Vor der Trennung wurde die Gel-Säule mit 20ml PBS gespült, anschließend wurden 5ml PBS-BSA-Lösung zugegeben und gewartet, bis die Flüssigkeit bis zum oberen Rand des Gels abgesunken war, sodass etwa 2,7ml in der Säule verblieben. Die abgestoppte Überschusslösung wurde langsam und gleichmäßig in die Säule getropft, und mit 2ml BSA-PBS-Lösung gefüllt. Das erste Eluat von 2ml wurde verworfen. Anschließend wurden 10 x 0,5ml BSA-PBS-Lösung zugegeben und das jeweilige Eluat (0,5ml) in einem separaten Reaktionsgefäß aufgefangen. Dieser Vorgang wurde für jede Überschusslösung durchgeführt. Zwischen zwei Lösungen wurde die Säule mit 5ml PBS und 5ml BSA-PBS-Lösung gespült. Die Säule wurde erneut mit 5ml PBS und 5ml BSA gewaschen und nach Zugabe von PBS-Puffer mit 0,05% NaN<sub>3</sub> bei +4°C gelagert.

Von den verschiedenen Tracerlösungen wurden Verdünnungen in Testpuffer-1 von 1:200 bis 1:400000 hergestellt. Je 100µl der Tracerlösung wurden in die Vertiefungen unbeschichteter Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mittels einer automatischen Mikrotiterplatten-Waschvorrichtung (Columbus Plus, Tecan) viermal gewaschen, um ungebundenen Tracer zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden 100µl Streptavidin- Peroxidase-Lösung zugegeben und die Platte abermals 15min inkubiert. In dieser Zeit reagierte das Biotin des gebundenen Biotin-Proteinkonjugates mit der Peroxidase-Lösung. Nach erneutem Waschen (4x) wurden 150µl Substratlösung (20µl TMB / ml Substratpuffer) zugegeben. Die Enzymaktivität wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) beendet. Die Farbstärke des enzymatisch oxidierten TMB wurde photometrisch, bei einer Wellenlänge von 450nm (SunRise®, Tecan™), gemessen und anhand Optischer Einheiten der Extinktion (OD) bestimmt.

Die beiden Tracerlösungen mit den jeweils stärksten Extinktionswerten einer Überschusslösung wurden gepoolt und als Tracer 20 (TR-20), Tracer 50 (TR-50) und Tracer 125 (TR-125) bei -20°C aufbewahrt. Für die Gebrauchslösung wurden die Tracerlösungen 1 zu 1 mit Glycerol verdünnt und bei -20°C ohne gravierenden

Aktivitätsverlust bis zu einem Jahr gelagert. Das Glycerol verhindert ein Gefrieren der Lösungen und reduziert damit das Auftreten von Gefrierschäden

### **Vorbereitung der Mikrotitrationsplatten mit dem Beschichtungsantikörper**

Der Beschichtungsantikörper (auch 2. Antikörper genannt) ist ein vom Schaf gewonnener Anti-Kaninchen-IgG. Die Gewinnung des Beschichtungsantikörpers erfolgte nach dem bei MÖLLER (1991) beschriebenen Verfahren. Die Mikrotitrationsplatten wurden mit 100µl Antikörperlösung (10µg/ml Beschichtungspuffer) beschichtet. Die Platten wurden kurz auf dem Plattenschüttler geschüttelt und über Nacht bei +4°C für 12 Stunden inkubiert. Die Antikörperlösung wurde am nächsten Tag dekantiert. Zur Absättigung freier Bindungsplätze erfolgt eine Nachbeschichtung mit einer Casein-Lösung. Hierbei wurden je Vertiefung 250µl einer 2,5%igen Caseinlösung (in PBS) aufgetragen, eine Stunde bei RT inkubiert und die Mikrotiterplatten anschließend viermal gewaschen. Die so beschichteten Platten wurden ausgeklopft und in haushaltsüblichen Gefrierbeuteln sofort eingefroren.

### **Herstellung der Anti-bPAG-Stammlösung (1. Antikörper)**

Die für die Entwicklung des ELISA erforderlichen polyklonalen Antiseren wurden uns von Prof. J.F. Beckers (ULG, Belgien) zur Verfügung gestellt. Das Verfahren zur Gewinnung der Antiseren aus mit PAG immunisierten Kaninchen ist bei ZOLI et al. (1991) beschrieben. Die Lagerung der Antiseren erfolgte bei -20°C. Zur Herstellung der 1. Antikörper-Stammlösung werden 100µl Serum in 900µl Gefrierschutzpuffer gegeben. Der Gefrierschutzpuffer besteht aus 45% TP-1 und 55% Glycerol.

### **Affinität des PAG-Tracers zu verschiedenen Antiseren**

Die Traceraffinität der Antiseren wurde anhand von Tracer- und Antiserum-Verdünnungsreihen ermittelt. Für zwei unterschiedliche Antiseren (AS 726 und AS 805) wurden Verdünnungsreihen (1:1000 bis 1:64000) in Testpuffer-1 (TP-1) erstellt. Eine mit Beschichtungsantikörper behandelte Mikrotiterplatte wurde aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Von den Verdünnungsreihen der Antiseren wurden 12-mal jeweils 100µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben. In die ersten Reihe der Mikrotiterplatte wurden je 100µl der 1:1000 verdünnten Antiserumlösung gegeben, in die zweite 100µl der 1:2000 verdünnten Lösung, usw.. In der letzten Reihe wurden zur Kontrolle nur 100µl Testpuffer aufgetragen. Die Zugabe der

Tracerlösungen erfolgte nach 20-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Tracerlösungen wurden 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 in TP-1 verdünnt und spaltenweise für die drei verschiedenen Überschusslösungen (TR-20, TR-50, TR-125) aufgetragen, so dass sich das in Tabelle 4 dargestellte Pipettierschema ergab.

**Tab. 4:** Pipettierschema einer Mikrotiterplatte (12x8 Vertiefungen) zur Bestimmung der Affinität von Tracerlösungen und Antiserumlösungen (AS).

AS-Konzentration (in 1000)	Tracer-Konzentration der Überschusslösungen											
	20-fach				50-fach				125-fach			
	100	200	400	800	100	200	400	800	100	200	400	800
1												
2												
4												
8												
16												
32												
64												
0												

Nach einer 2-stündigen Inkubationsdauer von Tracer und Antiserum wurden die Mikrotiterplatten 2 mal gewaschen, um den ungebundenen Tracer zu entfernen. Anschließend wurden je Vertiefung 100µl Peroxidase-Streptavidin-Lösung zugegeben und die Platte 30min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiterem 4-maligen Waschen wurden je Vertiefung 150µl Substratlösung (20µl TMB / ml Substratpuffer) zugegeben. Die Enzymaktivität wurde nach 45 Minuten durch Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M) beendet. Die optische Aktivität des oxidierten TMB wurde photometrisch bestimmt. Für einen ELISA optimale Werte sollten nicht über 2,0 optischen Einheiten (OD) liegen, da eine Konzentrationsunterscheidung bei höheren Werten nicht mehr möglich ist (MÖLLER, 1991). Eine für den ELISA geeignete Kombination sollte nach MÖLLER (1991) zwischen 0,8 und 1,5 Einheiten liegen.

Besaßen Tracer und Antiserum eine derart starke Affinität zueinander, dass in allen Verdünnungskombinationen Werte von mehr als 2,0 OD auftreten, wurde die Bestimmung der Tracer-Antiserum-Affinität mit höheren Konzentrationen bei Antiserum und Tracer wiederholt, bis Werte zwischen 0,8 und 1,5 OD auftraten.

### Gewinnung von PAG-freiem Nullserum

Von 20 verschiedenen Bullen und nicht-tragenden Kühen wurden jeweils mindestens 4ml Blutserum gewonnen und mittels ELISA analysiert. Da die Proben alle keinen messbaren PAG-Gehalt aufwiesen, wurden von ihnen jeweils 400ml Blut aus der Vena jugularis entnommen, 24h bei +4°C gelagert und anschließend 10min bei 1500xg zentrifugiert. Das daraus gewonnene Blutserum wurde gepoolt und in für den Test geeigneten Mengen (Aliquot á 4ml) in 5ml Reaktionsgefäßen bei –20°C tiefgefroren. Das PAG-freie Serum wird im folgenden als Testpuffer-B (TP-B) bezeichnet. Die für den Test erforderlichen Mengen wurden vor Beginn des Assays aufgetaut. Nicht benötigtes aufgetautes Nullserum wurde bis zum nächsten Test, längstens aber 3 Tage, bei +4°C gelagert.

### Herstellung der Standardkurve

Zur Herstellung einer Standardkurve wurden 5µl PAG-Stammlösung (SL-1) zu 3995µl PAG-freiem Blutserum (TP-B) in ein 5ml Reaktionsgefäß gegeben und mittels Reaktionsgefäßmischer (Vortex Genie 2) gut vermischt. Die so entstandene Standardlösung (S<sub>6</sub>) enthielt eine Konzentration von 12,5ng/ml. Die Standardlösung wurde in Aliquots von 500µl bei –20°C tiefgefroren. Für die Herstellung der Standardreihen wurde am Tag vor der Durchführung des ELISA oder direkt vor Testbeginn ein Aliquot aufgetaut und 250µl daraus mit 250µl TP-B verdünnt, was einer Konzentration von 6,25ng/ml entsprach. Durch eine 1:2 Weiterverdünnung der Proben in TP-B wurde folgende Standardreihe erstellt.

Bezeichnung	PAG-Konzentration (ng/ml)
Standard 6 (S <sub>6</sub> )	12,5
Standard 5 (S <sub>5</sub> )	6,25
Standard 4 (S <sub>4</sub> )	3,125
Standard 3 (S <sub>3</sub> )	1,56
Standard 2 (S <sub>2</sub> )	0,78
Standard 1 (S <sub>1</sub> )	0,39
Standard 0 (S <sub>0</sub> )	0

Die erstellte Standardreihe wurde bis zur Testdurchführung, längstens aber 4 Tage bei +4°C gelagert.

### Durchführung des Blut-ELISA

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden 30min vor Testbeginn aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Ausgenommen davon waren die 1. Antikörper- und die Tracerlösung, die erst direkt vor der Verwendung aus dem Gefrierschrank entnommen und in den entsprechenden Mengen in TP-1 gelöst wurden. Die tiefgefrorenen beschichteten Mikrotitrationsplatten wurden vor Gebrauch 25 Minuten auf Raumtemperatur gebracht und gut ausgeklopft. Unmittelbar darauf wurden je Vertiefung 100µl der Anti-bPAG-Lösung (1:200000) aufgetragen und die Platten 20h über Nacht bei +4°C inkubiert. Vor dem Auftragen der Analyseproben wurde die Platte entleert, mehrmals ausgeklopft und dann mit 50µl TP-1 pro Well behandelt, um die Beschichtungsantikörper während des Auftrages der Proben vor Schäden durch Austrocknung zu schützen. Je Vertiefung wurden 50µl Standardlösung oder Probe im Doppelansatz aufgetragen. Als Kontrolle wurden Proben mit definierten Konzentrationen von 1,5 und 10ng/ml verwendet. Das Probenvolumen des Assays setzt sich aus 50µl TP-1 und 50µl Serumprobe zusammen. Das Pipettierschema ist in Abbildung 12 dargestellt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Platte 20 Stunden über Nacht bei +4°C inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S0_1	S0_2	K1_1	P3_1	P7_1	P11_1	P15_1	P19_1	P23_1	P27_1	P31_1	P35_1
B	S6_1	S6_2	K1_2	P3_2	P7_2	P11_2	P15_2	P19_2	P23_2	P27_2	P31_2	P35_2
C	S5_1	S5_2	K2_1	P4_1	P8_1	P12_1	P16_1	P20_1	P24_1	P28_1	P32_1	P36_1
D	S4_1	S4_2	K2_2	P4_2	P8_2	P12_2	P16_2	P20_2	P24_2	P28_2	P32_2	P36_2
E	S3_1	S3_2	P1_1	P5_1	P9_1	P13_1	P17_1	P21_1	P25_1	P29_1	P33_1	K1_1
F	S2_1	S2_2	P1_2	P5_2	P9_2	P13_2	P17_2	P21_2	P25_2	P29_2	P33_2	K1_2
G	S1_1	S1_2	P2_1	P6_1	P10_1	P14_1	P18_1	P22_1	P26_1	P30_1	P34_1	K2_1
H	S0_3	S0_4	P2_2	P6_2	P10_2	P14_2	P18_2	P22_2	P26_2	P30_2	P34_2	K2_2

**Abb. 12:** Pipettierschema des PAG-ELISA (S0-S6: Standardreihe, K1-K4: Kontrollen, P1-P36: Proben).

Am nächsten Tag wurde die Tracer-Verdünnungslösung (7µl TR-20 in 6000µl TP-1) vorbereitet. Mit einer 8-Mehrkanalpipette wurden je Vertiefung 50µl Tracerlösung zugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem

Schüttler (200 U/min) und anschließend zweimaligen Waschen wurden je 100µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung (40µl / 12ml TP-1) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte viermal gewaschen und umgehend 150µl Substratlösung je Vertiefung zugegeben. Nach einer anschließenden 45-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Reaktion der Peroxidase-Lösung durch die Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M) je Vertiefung beendet. Die Messung der Extinktion erfolgte mit dem SunRise® Photometer bei einer Wellenlänge von 450µm. Die Konzentrationsberechnungen und die Darstellung von Standardkurven erfolgte mittels des Tecan™ Programmpakets Magellan 4.0 unter Verwendung des von RODBARD (1974) beschriebenen Verfahrens der logit-log Transformation. Das vollständige Protokoll für die Durchführung des ELISA findet sich im Anhang.

### **Inkubations- und Reaktionszeiten des ELISA**

Zur Feststellung der optimalen Inkubationsdauer des 1. Antikörpers und der Proben im ELISA wurden PAG-Standardreihen mit einem Konzentrationsbereich von 0 bis 300µg erstellt. Mit Beschichtungsantikörpern vorbereitete Mikrotitrationsplatten wurden auf Raumtemperatur gebracht, bevor je Plattenvertiefung 100µl verdünnte 1. Antikörperlösung (1:200000 in TP-1) aufgetragen wurden. Standardproben (50µl) wurden entweder gemeinsam mit der Antikörperlösung (0 Stunden Vorinkubation) inkubiert oder bei 10 oder 20-stündiger Vorinkubation des 1. Antikörpers bei +4°C direkt nach dem Dekantieren desselben aufgetragen. Die Zugabe von 50µl verdünnter Tracerlösung (1:1000 in TP-1) erfolgte nach 0, 10 oder 20-stündiger Probeninkubationsdauer bei Raumtemperatur.

### **Kontrolle des ELISA**

Zur Überprüfung der Messgenauigkeit des ELISA wurde abzentrifugiertes Blutserum (10min bei 1500xg) von trächtigen und nicht trächtigen Kühen (n=16) gewonnen, auf 4 Reaktionsgefäße (1,5ml) aufgeteilt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Der PAG-Gehalt der Proben wurde zunächst in mehrfachen Analysen mittels ELISA und RIA bestimmt. Für die Bestimmung des PAG-Werts mittels RIA oder ELISA wurde von jedem Tier ein Reaktionsgefäß aufgetaut und analysiert. Die radioimmunologische Bestimmung der PAG-Konzentration erfolgte an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Lüttich (Belgien) in der Arbeitsgruppe

von Prof. J.F. Beckers mittels des von ZOLI et al. (1992b) beschriebenen RIA1 (anti-bPAG<sub>167</sub>). Bis zur endgültigen Etablierung des ELISA wurden weitere 171 Kontrollproben von verschiedenen Betrieben mittels RIA und ELISA analysiert.

### **3.2.2 Entwicklung des Milch-ELISA**

#### **Herstellung der Stammlösungen und Vorbereitung der Mikrotitrationsplatten**

Die für den Milchtest benötigten beschichteten Mikrotiterplatten, Pufferlösungen, Enzym und Substratlösungen, sowie Tracer, PAG-Stammlösung und der 1. Antikörper (Anti-bPAG) entsprechen in ihrer Herstellung beziehungsweise ihrer Vorbereitung den im Bluttest beschriebenen Verfahren.

#### **Gewinnung von PAG-freier Milch**

Zur Überprüfung der Verwendungseignung von haltbarer Magermilch im ELISA wurden der PAG-Gehalt in der Magermilchfraktion von Frischmilch sowie von handelsüblicher entfetteter (<0,3% Fett) H-Milch bestimmt. Hierzu wurden 5ml Frischmilch aus dem Gesamtgemelk von 15 nicht tragenden Kühen um den 80. Tag post partum entnommen. Die Frischmilchproben wurden bei +4°C transportiert, und innerhalb von 4 Stunden durch Zentrifugation (25min bei 620xg) entfettet und der PAG-Gehalt in der Magermilchfraktion der Frischmilch und der H-Milch bestimmt. Die verwendete H-Milch wird im folgenden als Milchpuffer (TP-M) bezeichnet

#### **Einfluss der Lagerung auf die PAG-Konzentration**

Von 20 zufällig ausgewählten Kühen mit unbekanntem Trächtigkeitsstatus wurden aus dem Nachgemelk 12ml Frischmilch entnommen, gekühlt transportiert und umgehend mittels 30-minütiger Zentrifugation bei 620xg entfettet. Die so gewonnene Magermilch wurde auf je 3 Reaktionsgefäße (5ml) aufgeteilt und bei Raumtemperatur oder bei +4°C gelagert. Die PAG-Konzentration der Proben wurde am Tag der Entnahme (frisch) und nach 24 oder 96 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur oder bei +4°C bestimmt. Die gemessenen Werte der frisch analysierten Magermilch wurden als tatsächliche PAG-Konzentration angenommen und gleich 100% gesetzt. Die Abweichung in der Konzentration während der

Lagerung wurde als prozentuale Abweichung von der Konzentration der Frischmilch berechnet.

### **PAG-Konzentrationen in frischer oder konservierter Magermilch oder Molke**

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Lagerungsverfahren auf die nachweisbare Menge an PAG in der Milch wurden Proben mit hohen und niedrigen erwarteten PAG-Konzentrationen untersucht. Hierzu wurden 20ml Milch von 2 hoch trächtigen Einzeltieren mit erwarteter hoher PAG-Konzentration und eine Tankmilchprobe (40ml) genommen. Die Milch wurde jeweils auf je 2 Reaktionsgefäße (12ml) mit oder ohne Zusatz des Konservierungsmittels Kaliumdichromat (0,1%, nach MARTINEZ et al., 2003; MKU, 2004) aufgeteilt und anschließend bei +4°C transportiert. Die Tankmilchproben wurden nochmals aufgeteilt und der einen Hälfte wurde 6ng/ml gereinigtes PAG (SL-1) zugesetzt, der andere Teil wurde ohne Zusatz verarbeitet.

Im Anschluss an eine 30-minütige Homogenisation im Wasserbad (39°C) wurde die Magermilchfraktion der Proben durch 30-minütige Zentrifugation bei 620xg gewonnen (nach NIGGEMEYER, 1989). Anschließend wurden die so erstellten Magermilchproben gleichmäßig auf je 4 Reaktionsgefäße (5ml) aufgeteilt. Jeweils 2 der Gefäße wurden bei +4 bzw. -20°C gelagert.

Durch tropfenweise Zugabe von HCl (5M) wurde der pH-Wert der Magermilch bei den verbliebenen 2 Reaktionsgefäßen auf 4,6 abgesenkt und das Casein durch anschließende 25-minütige Zentrifugation bei 4000xg aus den Proben entfernt. Die abgenommenen Sauermolke wurde durch langsame Zugabe von NaOH (5M) wieder auf den Ausgangs-pH-Wert (6,9-7,2) gebracht. Die Molkeproben wurden ebenso wie die Magermilchproben anschließend 4 Stunden bei +4°C bzw. bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle wurden jeweils 5ml H-Milch (TP-M) den gleichen Behandlungen unterzogen. Für alle Proben ergaben sich folgende Behandlungskombinationen:

- A. homogenisiert und entfettet, +4°C
- B. homogenisiert und entfettet, -20°C
- C. homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, +4°C
- D. homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, -20°C
- E. Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, +4°C
- F. Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, -20°C

- G. Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, +4°C  
 H. Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, -20°C

### Herstellung der Milch-Standardkurve

Die Standardreihen des Milch-ELISA wurden jede Woche frisch hergestellt und nicht wie die Blutproben aliquotiert und tiefgefroren. Die Verdünnungsreihe für den Milch-ELISA enthielt die gleichen Konzentrationen wie die des Blut-ELISA.

Bezeichnung	PAG-Konzentration (ng/ml)
Standard 6 (M <sub>6</sub> )	12,5
Standard 5 (M <sub>5</sub> )	6,25
Standard 4 (M <sub>4</sub> )	3,125
Standard 3 (M <sub>3</sub> )	1,56
Standard 2 (M <sub>2</sub> )	0,78
Standard 1 (M <sub>1</sub> )	0,39
Standard 0 (M <sub>0</sub> )	0

Für die Herstellung des Milchstandards wurde eine separate PAG-Stammlösung (SL-2) aus der Stammlösung-1 (SL-1) vorbereitet. Hierzu wurden 100µl SL-1 in ein Reaktionsgefäß mit 900µl TP-M gegeben. Der Standard M<sub>6</sub> wurde durch Zugabe von 6,25µl PAG-Stammlösung-2 (SL-2) pro 500µl TP-M für jeden Test frisch vorbereitet und bis zum Verbrauch, längstens aber für 4 Tage, bei +4°C gelagert. Die Erstellung der übrigen Standards erfolgte aus Standard M<sub>6</sub> direkt vor Testbeginn mittels einer 1:2 Verdünnungsreihe durch Zugabe von 250µl M<sub>6</sub> in ein Reaktionsgefäß mit 250µl TP-M (M<sub>5</sub>). Die übrigen Standardproben wurden durch Weiterverdünnung des M<sub>5</sub>-Standards erstellt, bis die oben angegebene Standardreihe komplett war. Als 0-Standard (M<sub>0</sub>) wurde unverdünnter TP-M verwendet.

### Durchführung des Milch-ELISA

Der Milch-ELISA wurde analog dem oben beschriebenen Blut-ELISA durchgeführt. Anstelle des für den Blut-ELISA verwendeten TP-B wurde im Milch-ELISA als Testpuffer TP-M verwendet. Das Protokoll für die Durchführung des ELISA mit den verwendeten Antikörper- und Tracerkonzentrationen ist im Anhang zu finden.

Für die Bestimmung der PAG-Konzentration einer Milchprobe wurden mindestens 5ml Milch aus dem Nachgemelk einer Kuh entnommen und in 12ml Reaktionsgefäßen bis zur Weiterverarbeitung bei +4°C gelagert (Frischmilch) oder direkt nach der Entnahme bei -20°C tiefgefroren (Gefriermilch). Die Gefriermilch wurde vor der Analyse bei Raumtemperatur langsam aufgetaut homogenisiert bevor sie, genau wie die Frischmilch, durch 30-minütige Zentrifugation bei 620xg zu Magermilch weiterverarbeitet wurde. Die so hergestellten Magermilchproben wurden bis zur Analyse bei +4°C gelagert.

### **PAG-Konzentrationen in der Magermilch trächtiger Kühe**

An zwei Terminen wurden jeweils mindestens 3ml Frischmilch aus dem Gesamtgemelk von jeweils 75 Kühen genommen. Die Proben wurden sofort bei +4°C gelagert, transportiert und innerhalb von 6 Stunden durch 30-minütige Zentrifugation bei 620xg zu Magermilch weiterverarbeitet. Die Proben wurden je nach Trächtigkeitsstatus der Tiere in 5 Gruppen eingeteilt: *nicht-trächtig* (NT), *36-46 Tage trächtig* (d40), *53-67 Tage trächtig* (d60), *72-88 Tage trächtig* (d80) oder *93-107 Tage trächtig* (d100). Die Bestätigung des Trächtigkeitsstatus der Tiere erfolgte per rektaler Untersuchung durch den Betriebstierarzt. Die Analyse der Milchproben wurde am Tag der Entnahme durchgeführt. Die Verteilung der Proben auf die einzelnen Trächtigkeitsgruppen ist in Tabelle 5 zu sehen.

**Tab. 5:** Verteilung von Frischmilchproben (n=75) trächtiger und nicht trächtiger Kühe auf verschiedene Versuchsgruppen.

Gruppe	Anzahl Proben	Tage nach KB	
		Mittel	SD
Nicht trächtig (NT)	15	-	
d40	15	40,3	2,8
d60	15	60,7	3,9
d80	15	79,5	4,4
d100	15	100,7	4,1

### 3.2.3 Qualitätskriterien des ELISA

Die für die Bestimmung der Qualitätskriterien erforderlichen Kontrollproben wurden für den Blut-ELISA in PAG-freiem Blutserum (TP-B) und für den Milch-ELISA in PAG-freier Milch (TP-M) erstellt.

#### **Empfindlichkeit (Sensitivität)**

Die untere Nachweisgrenze ist das Maß für die Empfindlichkeit des Testsystems. Die PAG-Konzentration in 50µl PAG-freiem Blutserum (Standard  $S_0$ ) bzw. PAG-freier Milch (Standard  $M_0$ ) wurde bei 10 Analysen in 4-facher Wiederholung mittels Blut- bzw. Milch-ELISA bestimmt. Aus den ermittelten Konzentrationen wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Als untere Nachweisgrenze wird der Mittelwert PAG-freier Proben zuzüglich der zweifachen Standardabweichung angegeben.

#### **Wiederfindung und Variationskoeffizienten**

Zur Bestimmung der Genauigkeit des ELISA wurden Wiederfindungsraten sowie Interassay- und Intraassay-Variationskoeffizienten (CV) für Proben mit bekannten Mengen an bPAG ermittelt.

Die Berechnung der mittleren Intraassay-Variationskoeffizienten des Blut-ELISA erfolgte unter der Verwendung von Proben mit erwarteten Konzentrationen von 16, 8, 4, 2 und 1ng/ml. Die Proben wurden aus PAG-freiem Blutserum mit Zugabe von gereinigtem PAG hergestellt und in 16-facher Wiederholung auf drei Mikrotiterplatte analysiert.

Die Ermittlung des Interassay-Variationskoeffizienten des Blut-ELISA erfolgte anhand der wiederholten Bestimmung von Proben mit einer erwarteten Konzentration von 10, 6,5, 0,8 oder 0,4ng/ml. Die Proben wurden bei 20 Tests als Kontrollen in Doppelbestimmung mitgeführt.

Für den Milch-ELISA wurden Kontrollproben mit definierten Konzentrationen von 6,25 und 0,78ng/ml PAG zur Berechnung der Qualitätskriterien verwendet. Diese wurden in 20-facher Wiederholung auf einer Mikrotiterplatte (Intraassay-CV) sowie in 4-fach Bestimmung als Kontrolle bei 10 Tests zur Bestimmung des Interassay-CV mitgeführt.

Anhand gemessenen Konzentrationen der Proben wurden die prozentuale Wiederfindung der erwarteten Konzentration sowie Interassay- und Intraassay-Variationskoeffizienten berechnet.

### **Parallelität der Standardkurven**

Die Parallelität der Standardkurven dient der Überprüfung der Messgenauigkeit der Standardkurve im Vergleich zu einer natürlich vorkommenden Menge an PAG in einer Serumprobe. Von einer mehrfach analysierten Serumprobe mit einer mittleren Konzentration von  $9,9 \pm 0,8 \text{ ng/ml}$  PAG wurde eine 1:2 Verdünnungsreihen mit TP-B erstellt, so dass Proben mit den erwarteten Konzentrationen von 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,625 ng/ml vorlagen. Durch Zugabe von TP-1 wurden aus den Verdünnungsreihen Proben mit einem Serumanteil von 25, 40, 50, 60 und 75% des Probenvolumens erstellt und mittels Blut-ELISA analysiert.

### 3.3 PAG-Konzentrationen in Blut und Milch während der Trächtigkeit

Beginnend zwei Wochen nach der Besamung wurden auf einem Milchviehbetrieb (Holstein Frisian) in der Nähe von Einbeck, zunächst wöchentlich und ab dem 70. Tag nach der Besamung 14-tägig Blut- und Milchproben von 12 Kühen genommen. Bei allen Tieren wurde eine freiwillige Wartezeit von mindestens 60 Tagen bis zur 1. Besamung eingehalten. Im Verlauf des Versuchs zeigten vier Tiere wiederholt Brunstsymptome und wurden erneut besamt, bei zwei Tieren traten bis zum 70. Tag regelmäßig erneute Brunstsymptome auf und eine rektale Untersuchung erbrachte keinerlei Anzeichen einer Trächtigkeit. Die Probenentnahme dieser Tiere wurde daher nach dem 60. Tag eingestellt. Ein trächtiges Tier schied aus dem Versuch aus. Angaben zu den unterschiedlichen Tieren sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tab. 6:** Abkalbe- und Besamungsdaten der Versuchstiere.

<b>Tier</b>	<b>letzte Abkalbung</b>	<b>Besamung</b>	<b>Abkalbung</b>	<b>Bemerkung</b>
355	03.02.2004	09.06.2004		nicht aufgenommen
362	06.11.2003	15.06.2004	18.03.2005	
368	15.12.2003	12.06.2004		Abgang 30.12.05
373	26.12.2003	20.06.2004	28.03.2005	
375	10.05.2004	18.09.2004	19.06.2004	
378	24.03.2004	11.06.2004	19.03.2005	
389	12.03.2004	19.06.2004	28.03.2005	
394	29.06.2004	13.09.2004	07.08.2005	
395	12.04.2004	14.06.2004		nicht aufgenommen
398	15.08.2004	17.10.2004	28.07.2005	
412	02.03.2004	12.06.2004	21.03.2005	
428	28.08.2004	30.10.2004	10.08.2005	

Von den verbliebenen 9 trächtigen Tieren wurden bis 14 Tage nach der Geburt regelmäßig Blut- und, abgesehen von der Trockensteherzeit der Kühe, Milchproben genommen. Die Milchproben der Tiere wurden nach dem Melken aus dem Nachgemelk eines klinisch gesunden Viertels entnommen und direkt nach der Entnahme bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Blutproben wurden im Laufe desselben Tages

genommen, 12 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend 10min bei 1500xg zentrifugiert. Das so gewonnene Blutserum wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse gelagert.

Zur Bestimmung der PAG-Konzentration wurden die Proben aufgetaut und die Blutproben direkt und die Milchproben erst nach einer 30-minütigen Homogenisation im Wasserbad ( $39^{\circ}\text{C}$ ) und anschließender 30-minütiger Zentrifugation (620xg) zur Gewinnung der Magermilch analysiert. Der PAG-Gehalt der Proben wurde in Doppelbestimmung mittels Blut- bzw. Milch-ELISA bestimmt. Serumproben mit einer Konzentration von mehr als 12,5ng/ml, die also oberhalb des messbaren Bereichs der im ELISA verwendeten Standardreihe lagen wurden durch Zugabe von TP-B 10- bzw. 20- oder bei Bedarf 100-fach verdünnt und umgehend erneut analysiert. Milchproben mit Werten oberhalb des messbaren Bereichs wurden, aufgrund möglicher Konzentrationsänderungen nach dem Auftauen nicht verdünnt und erneut analysiert, sondern werden mit 15ng/ml angegeben.

Aus den gemessenen PAG-Konzentrationen wurden Verlaufskurven für die PAG-Konzentration in Milch und Blut von der Besamung bis zur Abkalbung erstellt. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Geburt, endete die Probenentnahme spätestens 310 Tage nach der letzten Besamung.

### 3. 4 Eignung des PAG-Tests zur Trächtigkeitsfeststellung

#### 3.4.1 PAG-Konzentrationen bei trächtigen und nicht trächtigen Kühen

Zwischen dem 20. und 50. Tag nach der Besamung wurde von 422 Kühen der Rasse Holstein Frisian eine Serumprobe gewonnen. Diese wurde bis zur Analyse, längstens jedoch 4 Tage, bei +4°C gelagert. Eine Trächtigkeitsuntersuchung (TU) erfolgte bei 274 Tieren rektal durch den jeweiligen Bestandstierarzt oder den Besamungstechniker ab dem 50. Tag. Bei 38 Tieren wurde am 28. Tag nach der Besamung (d.h. 21 Tage nach ET) eine ultrasonographische Untersuchung (Amiscan 45L, Echo-Contol, Frankreich) auf der ET-Station der Nordrind GmbH (Nückel, Niedersachsen) durch einen geschulten Fachmann durchgeführt. Nach BREUKELMANN et al. (2005a) ist der Nachweis von PAG auch nach ET von in vivo und in vitro produzierten Embryonen möglich ist und kann zur Trächtigkeitsuntersuchung genutzt werden. Die Entnahme der Blutprobe erfolgte im Anschluss an die Untersuchung. Bei 110 Tieren, bei denen kein eindeutiges Ergebnis einer frühzeitigen rektalen Trächtigkeitsuntersuchung vorlag, wurde 4 Wochen nach der ersten Blutprobe eine weitere Serumprobe gewonnen und analysiert.

Von den untersuchten Kühe wurden neben der PAG-Konzentration folgende Daten erfasst:

- Stall- oder Ohrmarkennummer
- Datum der letzten Kalbung
- Tag der Probenentnahme
- Zeit zwischen letzter Kalbung und 1. Besamung (Freiwillige Wartezeit)
- Besamungsdatum
- Tage nach der Besamung
- Anzahl und Datum vorangegangener Besamungen
- Trächtigkeitsstatus nach rektaler oder ultrasonographischer Untersuchung
- Datum der Abkalbung (soweit möglich)

Die analysierten Proben wurden entsprechend ihrer PAG-Konzentration einer von vier Gruppen zugeordnet: *Mit Sicherheit nicht-trächtig* (<1,5ng/ml), *Wahrscheinlich*

*nicht-trächtig* (1,5 bis <2,0ng/ml), *Wahrscheinlich trächtig* (2,0 bis <2,5ng/ml) und *Mit Sicherheit trächtig* ( $\geq 2,5$ ng/ml). Die Einteilung dieser Gruppen basierte auf den Ergebnissen einer vorangegangenen Untersuchung (nicht publiziert), in welcher die PAG-Konzentration am 28. Tag bei fast allen trächtigen Tiere über 2,5ng/ml lag, während bei den nicht trächtigen Tieren mit einer Ausnahme weniger als 1,5ng/ml PAG nachgewiesen wurden. Neben der Einteilung in unterschiedliche Konzentrationsgruppen wurden die Kühe, abhängig vom Tag nach der Belegung, in folgenden Zeitgruppen eingeteilt: bis 25. Tag (*d25*), 26. bis 30. Tag (*d30*), 31. bis 35. Tag (*d35*) und 35. bis 50. Tag nach der Belegung (*>d35*).

Der Anteil korrekt und falsch erkannter Trächtigkeiten wurde in Abhängigkeit von der Konzentration und vom Tag nach der Besamung für die rektale und ultrasonographische Untersuchung, sowie für die 2. PAG-Diagnose ermittelt und graphisch oder tabellarisch aufgearbeitet.

#### 3.4.2 Aussagesicherheit des PAG-Tests

Für die Bestimmung der Sicherheit und Verlässlichkeit des PAG-Tests ist eine eindeutige Einteilung in trächtige und nicht trächtige Tiere anhand der PAG-Konzentration erforderlich. Tiere mit PAG-Konzentration unterhalb des jeweiligen Grenzwertes wurden als nicht trächtig, Tiere mit Werten gleich oder oberhalb des Grenzwertes als trächtig eingestuft. Als Grenzwerte für die verschiedenen Zeiten nach Belegung (26-30, 31-35, 36-40 und >40 Tage nach KB) wurden 1,5ng/ml, 2,0ng/ml und 2,5ng/ml festgelegt. Korrekt oder richtig positiv waren PAG-Diagnosen, wenn die PAG-Konzentration gleich oder größer als der definierte Grenzwert war und sichere Anzeichen einer Trächtigkeit von der 2. Trächtigkeitsuntersuchung bestätigt worden waren oder die PAG-Konzentration einer zweiten Blutprobe über 2,5ng/ml lag. Falsch positiv waren Diagnosen, bei denen der Grenzwert überschritten wurde, die 2. TU jedoch negativ ausfiel. Als korrekt negativ wurden Diagnosen eingestuft, bei denen die PAG-Konzentration unterhalb der Grenzwerte lag und durch die 2. TU ebenfalls keine Trächtigkeit festgestellt werden konnte. Falsch negativ waren PAG-Diagnosen, wenn die Konzentration unter den Grenzwerten lag und in der 2. TU sichere Anzeichen einer vorliegenden Trächtigkeit feststellbar waren.

Anhand der Anzahl richtig und falsch gestellter Diagnosen wurde für jeden Grenzwert die Sicherheit und die Verlässlichkeit des PAG-Tests ermittelt. Die

Sicherheit des PAG-Tests wird angegeben durch den Anteil der korrekt als trächtig bzw. als nicht trächtig erkannten Tiere (Sensitivität bzw. Spezifität). Die Verlässlichkeit des Tests wurde anhand des positiv (PPV) und negativ prädiktiven (NPV) Werts zu verschiedenen Zeiten nach der Besamung bestimmt und gibt an, wie viele der PAG-Diagnosen korrekt waren. Die Berechnung der einzelnen Kriterien ist Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tab. 7:** Berechnung der Qualitätskriterien Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Werte anhand der Anzahl von im PAG-Test trächtig und nicht trächtiger Tiere (PAG) sowie der Anzahl korrekt gestellter Diagnosen basierend auf den Ergebnissen einer 2. Trächtigkeitsuntersuchung (2. TU).

Kriterium	Berechnung
Sensitivität	$100 \times \frac{\text{Anzahl trächtige Tiere (PAG)}}{\text{trächtige Tiere (2. TU)}}$
Spezifität	$100 \times \frac{\text{Anzahl nicht trächtige Tiere (PAG)}}{\text{nicht trächtige Tiere (2. TU)}}$
positiv prädiktiver Wert	$100 \times \frac{\text{korrekt trächtige Tiere (PAG)}}{\text{Anzahl trächtige Tiere (PAG)}}$
negativ prädiktiver Wert	$100 \times \frac{\text{korrekt nicht trächtige Tiere (PAG)}}{\text{Anzahl nicht trächtige Tiere (PAG)}}$
Genauigkeit	$100 \times \frac{\text{korrekt trächtige und korrekt nicht trächtige Tiere}}{\text{Anzahl untersuchte Tiere}}$

Als Sensitivität wurde der Anteil trächtiger Tiere definiert, bei dem eine PAG-Konzentration oberhalb des Grenzwertes nachgewiesen werden konnte. Sie kennzeichnet die Wahrscheinlichkeit keine falsch negative Diagnose zu treffen, während die Spezifität den Anteil nicht trächtiger Tiere mit einer Konzentration unterhalb des Grenzwertes angibt, also die Wahrscheinlichkeit angibt, keine falsch positive Diagnose zu treffen.

Die Sicherheit einer positiven Trächtigkeitsdiagnose wird durch den PPV angegeben, bei 100% wurden alle Tiere mit Konzentrationen oberhalb des Grenzwertes auch in der 2. Untersuchung als trächtig erkannt. Der NPV gibt an, wie viel Prozent der Tiere mit Konzentrationen unterhalb des Grenzwertes in der 2. Untersuchung als nicht trächtig erkannt wurden.

Die Genauigkeit ergibt sich aus dem Anteil der Summe mittels PAG-Test korrekt gestellter Diagnosen von allen untersuchten Tieren und ist als Maß für die Sicherheit des Tests anzusehen.

### 3.5 Statistische Auswertung

Die Erfassung des Datenmaterials sowie die graphische Darstellung der Konzentrationsmittelwerte und -verläufe wurde mit dem Programm Microsoft Excel durchgeführt. Die statistische Auswertung des gewonnenen Datenmaterials erfolgte mit Hilfe der Programmpakete SPSS 11.5.1 (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606, USA) und "Statistical Analysis System" (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

#### 3.5.1 PAG-Konzentrationen im Verlauf der Trächtigkeit

Für ersten Wochen der Trächtigkeit (3. 4. und 5. Woche) wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der PAG-Konzentrationen mittels der Prozeduren „Deskriptive Statistiken“ und „Explorative Datenanalyse“ (SPSS) berechnet. Die gemessene PAG-Konzentration wurde hierbei als abhängige Variable, die Zeit nach der Besamung als fixer Effekt betrachtet. Für die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen trächtigen und nicht trächtigen Kühen wurde eine Kontrollgruppe aus den Proben (n=19) nicht trächtiger Kühe gebildet.

Eine Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede zwischen den PAG-Konzentrationen in den ersten Wochen der Trächtigkeit zu der PAG-Konzentration der Kontrollgruppe erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA. Bei statistisch bedeutsamen Unterschieden (Widerlegung der Null-Hypothese) erfolgte ein post hoc Mehrfachvergleich (Dunnnett-t-Test oder Scheffé-Test). Unterschiede zwischen verschiedenen Zeiten innerhalb eines Trächtigkeitsstatus wurden mittels post hoc Scheffé-Test (SCHEFFÉ, 1950), Unterschiede zwischen trächtigen Tiere verschiedener Zeiten zu einer Kontrollgruppe der nicht trächtigen Tieren mittels zweiseitigem post hoc Dunnnett-t-Test (SPSS) verglichen (DUNNETT, 1955).

Unter der Annahme eines exponentiellen Verlaufs der PAG-Konzentration wurde im Anschluss eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt, um die Abhängigkeit der Konzentration von Trächtigkeitstag zu ermitteln. Regressionskurven wurden für die PAG-Konzentration im Blut der ersten 100 Tage und für die Konzentration in der Milch für die gesamte Trächtigkeit berechnet. Die Regressionsanalyse erfolgte mittels nichtlinearer Kurvenanpassung (SAS, PROC

NLIN - Prozedur). Hierbei wird eine Modellfunktionen zur Ermittlung einer geschätzten PAG-Konzentration (y) in Blut und Milch trächtiger Tiere in Abhängigkeit der Zeit (t) ermittelt. Der Aufbau einer Polynomfunktion  $^q$ -ter Ordnung soll anhand des folgenden Modellbeispiels verdeutlicht werden:

$$y \approx x_0 + x_1t + x_2t^2 + \dots + x_qt^q$$

Hierbei wird die geschätzte PAG-Konzentration (y) eines bestimmten Tages (t) in Abhängigkeit mehrere Parameter ( $x_0, x_1, \dots, x_q$ ) und Polynomen bestimmt. Für die ermittelten Regressionsgleichungen wurde die Genauigkeit anhand des Bestimmtheitskoeffizienten ( $R^2$ ) ermittelt. Dieser ergibt sich aus dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten zwischen gemessener (x) und geschätzter PAG-Konzentration (y) und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei  $R^2=0$  bedeutet, dass x und y nicht miteinander korrelieren.

Abschließend wurde mit der Prozedur "CORR" des SAS-Programmpakets die Korrelation zwischen den gemessenen PAG-Konzentration in Blutserum und Milch trächtiger Kühe berechnet.

### 3.5.2 Eignung des PAG-Tests zur Trächtigkeitsfeststellung

#### **PAG-Konzentrationen bei trächtigen und nicht trächtigen Kühen**

Der PAG-Gehalt einer zwischen dem 20. und 50. Tag nach erfolgter Besamung entnommenen Blutprobe wurden in Abhängigkeit von der erwarteten Trächtigkeitsdauer (d) und der gemessenen PAG-Konzentration in verschiedenen Gruppen eingeteilt:

Zeit nach Besamung (d): <26, 26-30, 31-35 und >35

PAG-Konzentration (ng/ml): <1,5, 1,5 bis <2,0, 2,0 bis <2,5 und  $\geq 2,5$ .

Die Bestimmung des Trächtigkeitsstatus der Tiere erfolgte durch rektale oder ultrasonographische Untersuchung oder durch die Bestimmung der PAG-Konzentration einer weiteren Blutprobe. Für jedes Verfahren der Trächtigkeitsfeststellung wurde die Anzahl trächtiger Tiere in den einzelnen Konzentrationsgruppen und zu den unterschiedlichen Zeiten bestimmt.

Anhand der ermittelten PAG-Konzentrationen trächtiger und nicht trächtiger Kühe wurden Mittelwerte für den jeweiligen Tag nach der Besamung sowie für einen Zeitraum von 5 Tagen berechnet, um den Konzentrationsverlauf zwischen dem 20. und 50. Tag nach der Belegung darstellen zu können. Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch die PAG-Konzentration der vorangegangenen Trächtigkeit (ZOLI et al. 1992b) auszuschließen, wurden für die Bestimmung der Mittelwerte nur Kühe (n=399) berücksichtigt bei denen eine freiwillige Wartezeit (Tag nach der Abkalbung bis zur nächsten Besamung) von mindestens 60 Tagen eingehalten worden war.

### **Aussagesicherheit des PAG-Tests**

Anhand der Ergebnissen der Trächtigkeitsuntersuchung wurde die Anzahl korrekt und nicht korrekt (falsch) gestellter Diagnosen für unterschiedliche Zeiten und unterschiedliche Grenzwerte berechnet:

Zeit nach Besamung (d): 26-30, 31-35, 36-40 und >40

PAG-Grenzwerte (ng/ml): 1,5, 2,0 und 2,5ng/ml

Mittels der Prozeduren „Deskriptive Statistiken“ und „Explorative Datenanalyse“ (SPSS) wurden Tages- und 5-Tagemittelwerte, mit Standardabweichung und Standardfehler der PAG-Konzentrationen im Versuchszeitraum berechnet. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der PAG-Konzentration trächtiger Tiere zu verschiedenen Zeiten nach der Besamung und der Konzentration nicht trächtiger Tiere (Kontrolle) erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (SPSS) und zweiseitigem post hoc Dunnett-t-Test (SPSS) (DUNNETT, 1955). Die gemessene PAG-Konzentration wurde hierbei als abhängige Variable, die Zeit nach der Besamung sowie der Trächtigkeitsstatus als fixe Effekte betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 PAG-Bestimmung im Blut

Bei dem für den Nachweis von bovinem "pregnancy-associated glycoprotein" entwickelten ELISA handelt es sich um einen kompetitiven heterogen Assay.

#### 4.1.1 Optimale Kombination von Antiserum und Tracer

Zur Feststellung der optimalen Kombination von Tracer und Anti-bPAG-Lösung (Antikörperlösung) wurden Verdünnungsreihen für Tracer- und Antikörperlösung erstellt und analysiert. Die gemessene optische Aktivität variierte zwischen den einzelnen Antiseren erheblich. Für den Antikörper mit den besten Eigenschaften im RIA (AK 805) und den AK mit der höchsten Bindungsaffinität zum biotinmarkiertem Tracer (AK 726) lagen die ermittelten Extinktionswerte zwischen 0,78 und 3,5 OD (AK 726) und zwischen 3,0 und 0,1 OD (AK 805). Die Verdünnungsreihen beider Antiseren sind im Anhang abgebildet. Im folgenden werden nur Merkmale für AK 726 beschrieben, der bei stärkeren Verdünnungen neben einer höheren Bindungsaffinität zum Tracer auch eine höhere Sensitivität aufwies. Die untere Nachweisgrenze bei der Verwendung von AS 805 lag bei 1,0ng/ml.

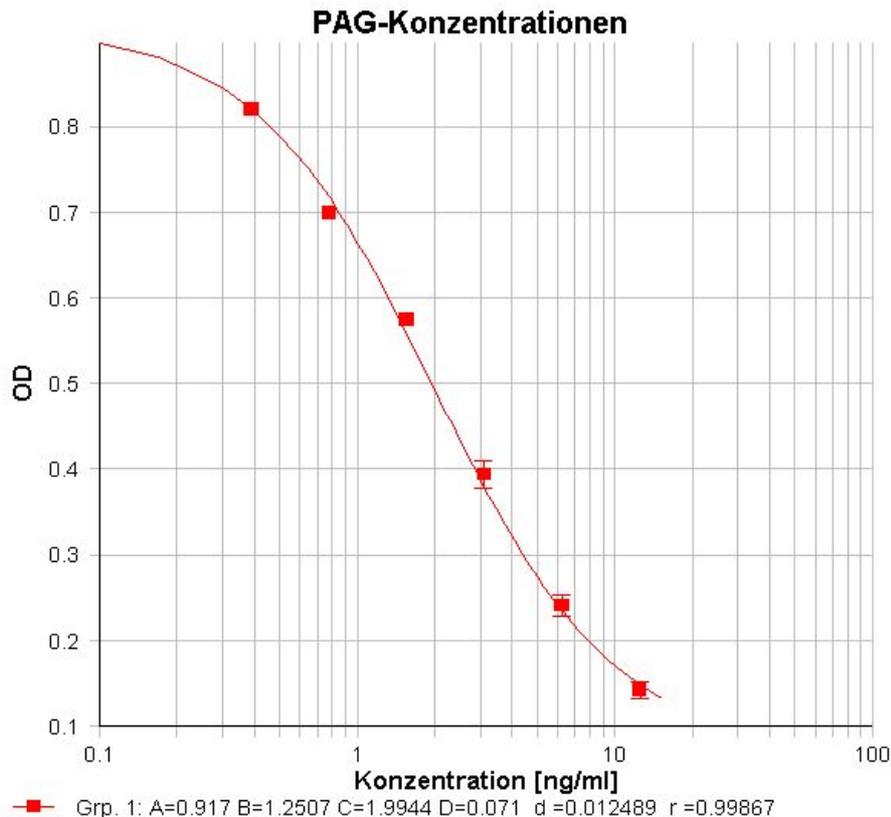
#### 4.1.2 Inkubations- und Reaktionszeiten des ELISA

Der Verlauf verschiedener Standardkurven wurden nach 0, 10 oder 20-stündiger Vorinkubation des 1. Antikörpers und 0, 10 oder 20 Stunden Probeninkubation ermittelt. Beste Verläufe wurden nach 20 Stunden Vorinkubation des 1. Antikörpers und mindestens 10-stündiger Probeninkubation ermittelt. Für 10ng/ml PAG wurden Wiederfindungsraten von 99,2% ( $\pm$  6,2% CV) gemessen. Der Verlauf einer exemplarischen Standardkurve des Blut-ELISA nach 20-stündiger Antikörper Vorinkubation und 20-stündiger Probeninkubation ist in Abbildung 13 dargestellt.

### 4.1.3 Qualitätskriterien des Blut-ELISA

#### Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze des ELISA betrug 0,4ng/ml, errechnet aus dem mittleren Konzentrationswert von PAG-freien Nullserum (0,12ng/ml) plus zwei Standardabweichungen (0,3ng/ml).



**Abb. 13:** Verlauf einer Standardkurve PAG-Blut-ELISA nach 20-stündiger Vorinkubation des 1. Antikörpers und einer Probeninkubation von 10 Stunden. Die gemittelten Messwerte wurden anhand einer Doppelbestimmung der Standardproben errechnet.

#### Wiederholbarkeit und Wiederfindung (Genauigkeit)

Die ermittelten Qualitätskriterien zur Bestimmung der Genauigkeit des ELISA sind in Tabelle 8 und 9 dargestellt. Ermittelt wurden neben der unteren Nachweisgrenze die Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizienten sowie die Wiederfindungsraten für verschiedene Konzentrationen. Die Wiederfindungsrate des Blut-ELISA betrug im Durchschnitt 104,7%. Die Intraassay-Variationskoeffizienten lagen zwischen 1,7 (16ng/ml) und 14,0% (1ng/ml), die Interassay-Variationskoeffizienten zwischen 8,3 (6,5ng/ml) und 23,9% (0,4ng/ml).

**Tab. 8:** Intraassay-Variationskoeffizient (CV) und Wiederfindungsraten (RR%) für Blutproben mit definierten bPAG-Konzentrationen.

Erwartete Menge [ng/ml]	Gemessene Menge [ng/ml]		Wiederfindungsraten $\pm$ CV (%)	
	Mittel	SD		
16	15,71	0,26	98,2	$\pm$ 1,7
8	8,03	0,54	100,4	$\pm$ 6,7
4	4,24	0,34	106,1	$\pm$ 7,7
2	2,10	0,24	105,2	$\pm$ 11,6
1	1,11	0,15	110,8	$\pm$ 14,0

**Tab. 9:** Interassay-Variationskoeffizient (CV) und Wiederfindungsraten (RR%) für Blutproben mit definierten bPAG-Konzentrationen.

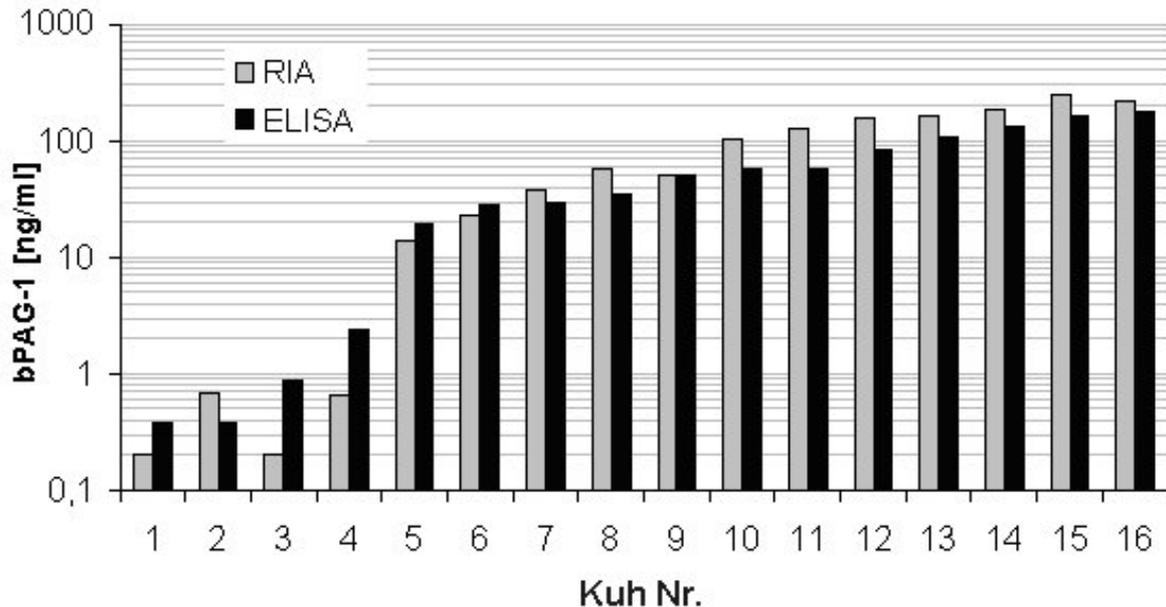
Erwartete Menge [ng/ml]	Gemessene Menge [ng/ml]		Wiederfindungsraten $\pm$ CV (%)	
	Mittel	SD		
10	10,41	0,26	104,1	$\pm$ 12,3
6,5	6,29	0,52	96,8	$\pm$ 8,3
0,8	0,79	0,17	98,35	$\pm$ 21,7
0,4	0,49	0,12	122,11	$\pm$ 23,9

### Parallelität der Standardkurven

Ausgehend von einer Serumprobe mit einer mittleren Konzentration von 9,9ng/ml ( $\pm$ 0,8) wurden Verdünnungsreihen mit unterschiedlichem Serumanteil der Proben erstellt. Bei der Verwendung von 50% Blutserum und 50% TP-1 zur Erstellung der Standardkurven lagen die gemessenen mittleren Konzentrationen bei 9,7 - 4,8 - 2,3 - 1,3 - 0,63 und 0,37ng/ml. Verdünnungsreihen mit einem Serumanteil von 60, 50, 40 und 25% zeigten einen parallelen Verlauf zu der verwendeten Standardkurve. Bei der Verwendung von Verdünnungsreihen mit einem geringeren Serumanteil war die Parallelität im unteren Konzentrationsbereich nicht mehr gegeben.

#### 4.1.4 Korrelation von RIA und ELISA

Für den Vergleich von RIA und ELISA wurden zunächst Blutproben von 16 Tieren in vierfacher Bestimmung mittels ELISA und mittels RIA analysiert. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Korrelation zwischen RIA und ELISA betrug  $r=0,977$  ( $p<0,01$ ).



**Abb. 14.:** PAG-Blut-Konzentrationen (RIA und ELISA) von 16 verschiedenen Kühen. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (ULG, Belgien) und mittels ELISA.

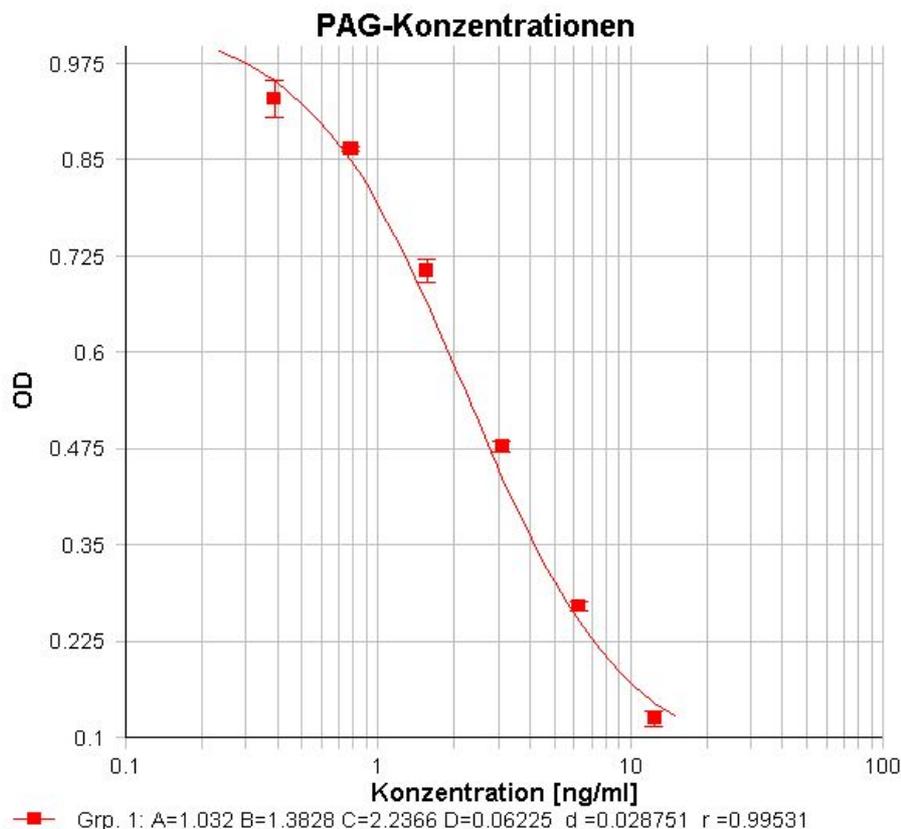
Zur späteren Validierung des ELISA wurden weitere 171 Blutproben mittels ELISA und RIA analysiert. Die Korrelation zwischen beiden Messverfahren aller Proben ( $n=187$ ) betrug  $r=0,964$  ( $p<0,01$ ). Aufgeteilt in Proben von trächtigen ( $n=120$ ) und nicht trächtigen ( $n=67$ ) Kühen ergaben sich Korrelationen von  $r=0,97$  ( $p<0,01$ ) für die trächtigen und  $r=0,65$  ( $p<0,01$ ) für die nicht trächtigen Tiere. Die Korrelation zwischen den Proben von nicht trächtigen Tieren wurde nur anhand der Tiere mit messbaren Konzentrationen ( $n=26$ ) ermittelt. Die PAG-Konzentrationen der verbliebenen Tiere ( $n=41$ ) lagen entweder beim RIA und/oder beim ELISA außerhalb des messbaren Bereichs.

## 4.2 PAG-Bestimmung in der Milch

### 4.2.1 Qualitätskriterien des Milch ELISA

Die Entwicklung des Milch-ELISA basierte auf den Ergebnissen des zuerst entwickelten Blut-ELISA.

Milchproben von 15 nicht-trächtigen Tieren wurden gesammelt und gemeinsam mit 15 Proben handelsüblicher H-Milch (TP-M) analysiert. Im TP-M wurden im Mittel 0,109ng/ml ( $\pm 0,156$ ng/ml), in den PAG-freien Frischmilchproben 0,22ng/ml ( $\pm 0,19$ ) PAG nachgewiesen. Für Proben mit Konzentrationen unterhalb des messbaren Bereichs wurde der geringste messbare Wert (0,1ng/ml) angenommen. Zwischen den Frischmilchproben und der pasteurisierten Milch wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Der Verlauf einer Standardkurve im Milch-ELISA ist in Abbildung 15 dargestellt.



**Abb. 15:** Verlauf einer Standardkurve im PAG-Milch-ELISA unter Verwendung von H-Milch als Puffer für die Herstellung der Standardreihen.

### Empfindlichkeit

Die untere Nachweisgrenze wurde anhand zwanzigfacher Messungen von PAG-freier Milch (TP-M) zuzüglich der doppelten Standardabweichung ermittelt. Der Mittelwert der TP-M Proben lag bei 0,11ng/ml, die doppelte Standardabweichung betrug 0,31ng/ml, so dass sich für den Milch-ELISA eine untere Nachweisgrenze von 0,42ng/ml ergab.

### Wiederholbarkeit und Wiederfindung (Genauigkeit)

Für die Ermittlung der Wiederfindungsraten und der Intrasassay-Variationskoeffizienten wurden Kontrollproben mit 6,25 und 0,78ng/ml hergestellt und in 20-facher Wiederholung analysiert. Die ermittelten Qualitätskriterien des ELISA sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Wiederfindungsrate lag im Durchschnitt bei 112,3%. Die Intraassay-Variationskoeffizienten für 6,25 und 0,78ng/ml lagen bei 9,8 und 11,8%. Für die Interassay-Variationskoeffizienten wurden 12,0% (6,25ng/ml) und 22,1% (0,78ng/ml) berechnet.

**Tab. 10:** Eigenschaften und Qualitätskriterien des Milch-ELISA.

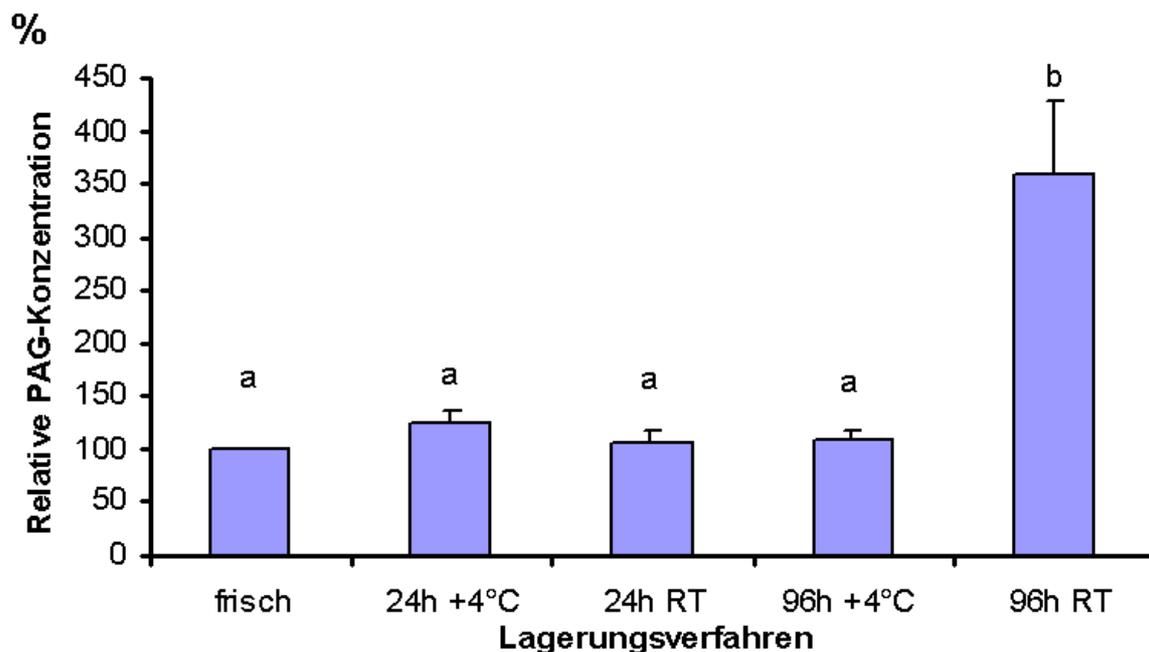
Kriterium	Konzentration (ng/ml)	Wert / Substanz
Antiserum-Verdünnung		1 : 200 000
Tracer		biotinisiertes bPAG
Standard		bPAG1
Probenvolumen (µl)		50
Messbereich (ng/ml)		0,4 – 15
50% Bindung (ng/ml)		3,2
mittlere Wiederfindung (%)		112,3
Variationskoeffizienten (%)		
Intraassay	0,78ng/ml	11,8
	6,25ng/ml	9,8
Interassay	0,78ng/ml	22,1
	6,25ng/ml	12,0

### Parallelität der Standardkurven

Ein paralleler Verlauf von Standardkurven und einer verdünnten Magermilchprobe war bei einem Probenvolumen von 25 bis 75 $\mu$ l gegeben. Bei der Zugabe größerer Probenmengen (100 und 150 $\mu$ l) war ein paralleler Verlauf der Kurven im unteren Konzentrationsbereich, ab 3,125ng/ml, nicht mehr gegeben.

#### 4.2.2 Einfluss der Lagerung auf die PAG-Konzentration

Von 20 zufällig ausgewählten Kühen wurden Magermilchproben gewonnen, bei +4°C oder bei Raumtemperatur gelagert und ihre PAG-Konzentration am Tag der Entnahme (frisch), nach 24 und nach 96 Stunden bestimmt. Die Veränderungen während der Lagerung wurden als prozentuale Abweichung von der frisch analysierten Milch angegeben (Abb. 16).



**Abb. 16:** Einfluss der Lagerungsdauer und -temperatur auf die PAG-Konzentration (+SD) in der Frischmilch von 20 Kühen (frisch = 100%) (a,b:  $p < 0,001$  Dunnett-t-Test).

Unter den analysierten Proben befanden sich 2 mit einer Konzentration von mehr als 10ng/ml, 3 Proben mit 1 bis 10ng/ml und 15 Proben mit Konzentrationen von weniger als 1,0ng/ml. Die relative Konzentrationsänderung war bei Proben mit geringerer Konzentration größer als bei Proben mit Konzentrationen von mehr als 1,0ng/ml. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ , Dunnett-t-Test) gegenüber der frisch

analysierten Magermilch wurden nach einer 96-stündigen Lagerung bei Raumtemperatur festgestellt.

#### 4.2.3 PAG-Konzentrationen in Frischmilch, Magermilch, konservierter Milch oder Molke

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Lagerungsverfahren auf die nachweisbare Menge an PAG in der Milch wurden Magermilch- und Molkeproben mit und ohne Zusatz von Kaliumdichromat von 2 trächtigen Kühen sowie einer Tankmilchprobe mit und ohne Zusatz von gereinigtem PAG für 4 Stunden bei +4°C oder -20°C gelagert. Es ergaben sich folgende Behandlungen:

Gruppe	Behandlung
A.	homogenisiert und entfettet, +4°C
B.	homogenisiert und entfettet, -20°C
C.	homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, +4°C
D.	homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, -20°C
E.	Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, +4°C
F.	Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, -20°C
G.	Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, +4°C
H.	Kaliumdichromat, homogenisiert und entfettet, entcaseinisiert, -20°C

Die Ergebnisse der PAG-Analyse für die einzelnen Proben und Behandlungen ist in Tabelle 11 dargestellt. Zwischen den Behandlungen A und B wurde kein signifikanter Unterschied in der PAG-Konzentration festgestellt ( $p > 0,05$ , LSD-Test). Die gemessene PAG-Konzentration der bei -20°C gelagerten Proben entsprach dem PAG-Gehalt der Frischmilch. Unterschiede in der Konzentration wurden bei den Sauermolkeproben (C, D) festgestellt, während die mit Kaliumdichromat behandelten Proben extrem hohe PAG-Konzentrationen mit erheblichen Standardabweichungen aufwiesen.

**Tab. 11:** Veränderung der PAG-Konzentration in Magermilch (A,B,E,F) oder Molke (C,D,G,H) während der Lagerung bei +4°C (A,C,E,G) oder –20°C (B,D,F,H). Die Lagerung der Proben erfolgte ohne (A-D) oder mit (E-H) Zugabe eines Konservierungsmittels.

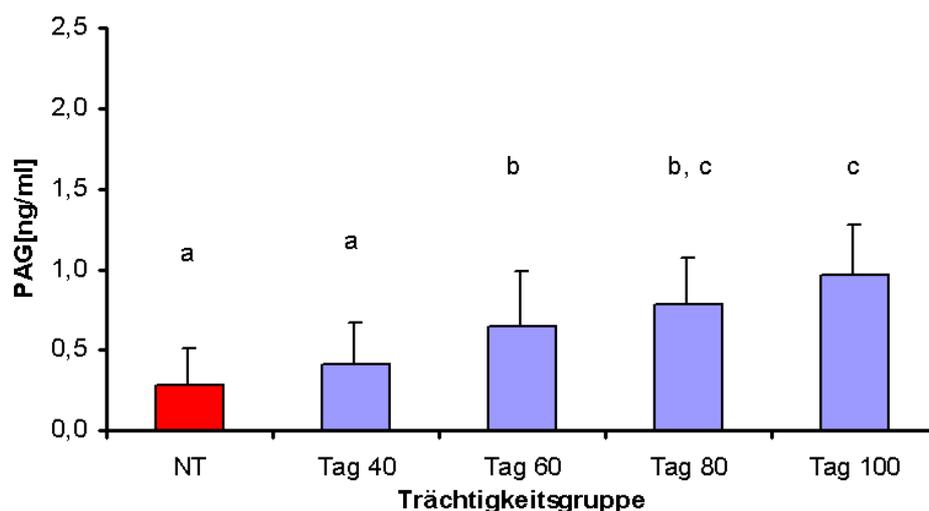
Behandlung	TP-M <sup>a</sup>	Tankmilch	Tankmilch <sup>b</sup>	Kuh 1	Kuh 2	Abweichung von A (%) Mittel	SD
A	0,34	0,8	5,2	7,2	5,6	100	0
B	0,4	0,5	6,1	8,2	6,2	101	21
C	1,2	4,0	9,6	6,0	1,0	121	115
D	4,2	9,1	10,1	9,5	7,3	398	512
E	11,6	14,4	18,6	18,3	13,9	665	1625
F	11,9	10,5	15,3	13,1	10,0	491	1299
G	9,6	8,9	12,1	13,3	9,9	426	1040
H	8,9	7,4	10,9	11,2	9,0	362	965

<sup>a</sup>) Handelsübliche H-Milch, ohne nachweisbare PAG-Konzentrationen

<sup>b</sup>) Milch aus dem Tagesgemelk mit Zusatz von 6ng/ml PAG.

#### 4.2.4 PAG-Konzentrationen in der Milch trächtiger Kühe

Frischmilchproben wurden aus dem Gesamtgemelk von nicht-trächtigen (n=15) und trächtigen Tieren (n=60) entnommen und analysiert. Die gemessenen mittleren Konzentrationen ( $\pm$ SD) der nicht trächtigen Tiere (NT) und der trächtigen Tiere (Tag 40, 60, 80, 100 nach KB) der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 17 dargestellt.



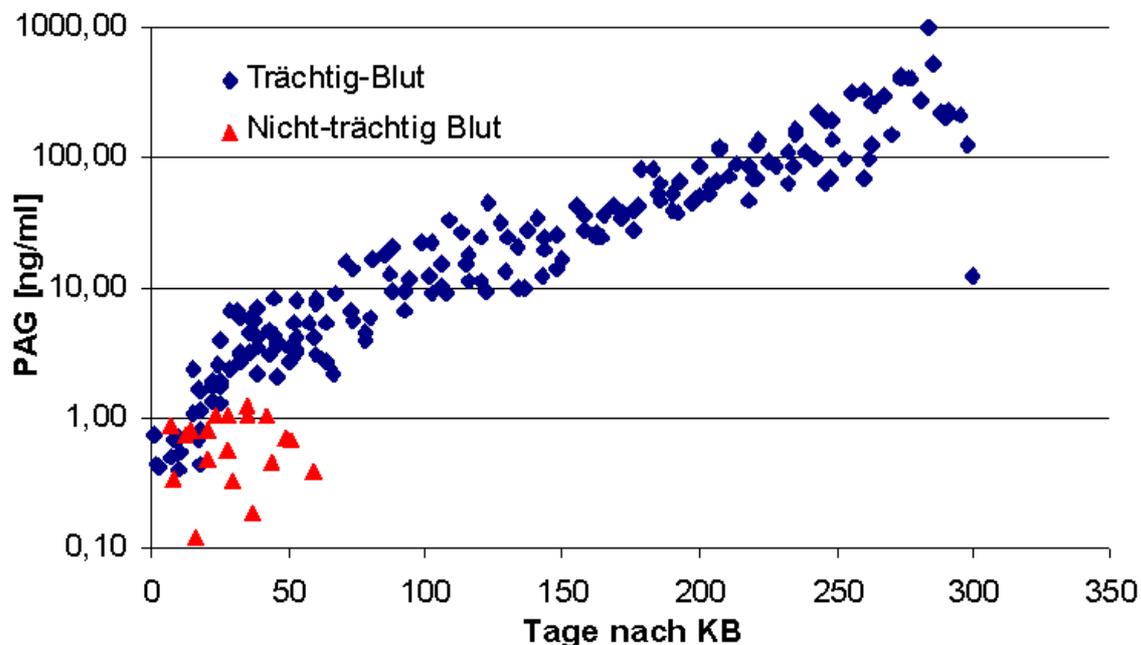
**Abb. 17:** Mittlere PAG-Konzentrationen ( $\pm$ SD) in frischer Magermilch bei nicht-trächtigen Tieren (NT) und 40, 60, 80 oder 100 Tage trächtigen Tieren (a,b b,c:  $p < 0,05$ ; a,c:  $p < 0,001$ , LSD-Test).

Mittlere PAG-Konzentrationen nicht-trächtiger Kühe lagen bei 0,25ng/ml ( $\pm 0,23$ ng/ml). Die PAG-Konzentrationen trächtiger Tiere lagen am 40. Tag bei 0,4  $\pm 0,3$ ng/ml, am 80. Tag bei 0,78  $\pm 0,3$ ng/ml und am 100. Tag der Trächtigkeit bei 0,96  $\pm 0,3$ ng/ml. Signifikante Unterschiede in den PAG-Konzentrationen zu den nicht trächtigen Tieren traten ab dem 60. Tag der Trächtigkeit (0,72  $\pm 0,34$ ng/ml) auf.

### 4.3 PAG-Konzentrationen im Verlauf der Trächtigkeit

#### 4.3.1 Blut-PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit

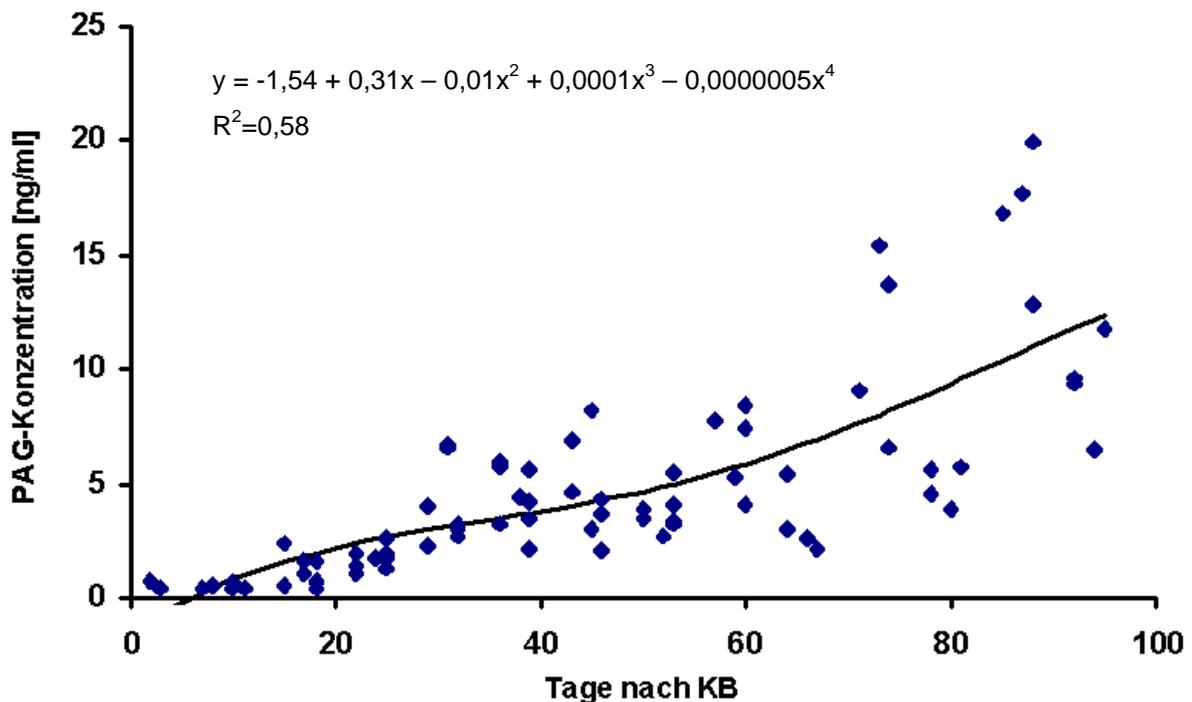
Die Entwicklung der PAG-Konzentration im Blut der untersuchten Kühe ist in Abbildung 18 dargestellt, unterteilt in trächtige (n=10) und nicht trächtige Tiere (n=2). Die Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte mittels rektaler Palpation ab der 8. Woche durch den Betriebstierarzt. Nicht trächtige Tiere wurden nicht über die gesamte Versuchsdauer beprobt, da sie bei Auftreten einer weiteren Brunst erneut besamt wurden.



**Abb. 18:** PAG-Konzentrationen im Blut trächtiger (◆) und nicht trächtiger (▲) Kühe zu verschiedenen Zeiten nach KB.

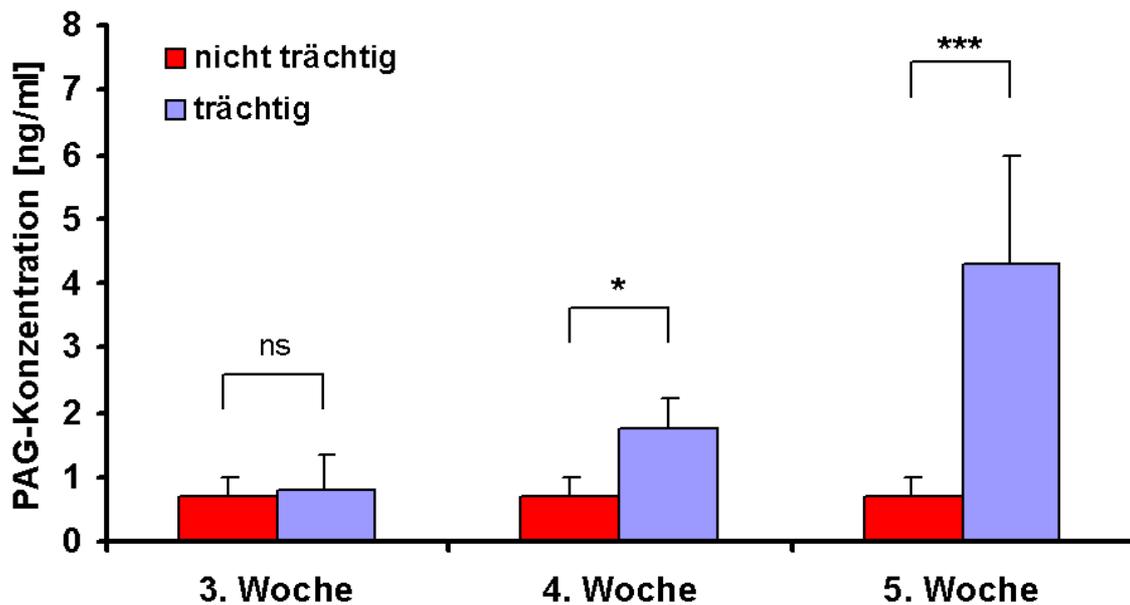
Die mittlere PAG-Konzentration ( $\pm$ SD) nicht trächtiger Kühe betrug  $0,6 \pm 0,3$  ng/ml, die Konzentration trächtiger Kühe  $62 \pm 115$  ng/ml. Die hohe Standardabweichung ist auf die maximalen Werte von bis über 1000 ng/ml zurückzuführen. Die maximale Konzentration von 1,2 ng/ml bei den nicht trächtigen Kühen wurde ab dem 25. Tag von keinem der trächtigen Tiere mehr unterschritten. Maximale Werte wurden in der letzten Probe vor oder direkt nach der Geburt erreicht. Anschließend fiel die Konzentration wieder ab. In Abhängigkeit vom Geburtstermin endete die Probenentnahme spätestens am 310. Tag nach der Belegung.

Für den Verlauf der PAG-Konzentration in den ersten 100 Tagen der Trächtigkeit wurde eine Polynom Regressionsanalyse durchgeführt. Die gemessenen PAG-Konzentrationen und die Regressionsgleichung sind in Abbildung 19 dargestellt. Bis zum 60. Tag wurde ein leichter Anstieg, ab dem 60. Tag ein stärkerer Anstieg der Konzentration beobachtet. Bei 3 Tieren wurde um den 60. Tag ein kurzzeitiges Absinken der Konzentration auf 2,2 bis 3,0ng/ml festgestellt. Die PAG-Konzentration stieg in der darauffolgenden Woche wieder deutlich an.



**Abb. 19:** Verlauf der PAG-Konzentration im Blut trächtiger Kühe. Dargestellt sind die gemessenen PAG-Konzentration bis zum 100. Tag nach KB ( $\blacklozenge$ ), sowie die zugehörige Regressionskurve ( $\text{—}$ ).

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Trächtigkeit wurden die Konzentrationen in folgende Gruppen eingeteilt: 3. Woche (d21, n=16), 4. Woche (d28, n=9) oder 5. Woche trächtig (d35, n=9). Die mittlere Konzentration der betrug  $0,81 \pm 0,5\text{ng/ml}$  in der 3. Woche,  $1,76 \pm 0,4\text{ng/ml}$  in der 4. Woche und  $4,3 \pm 1,7\text{ng/ml}$  in der 5. Woche. Für die Kontrollgruppe wurde die mittlere Konzentration aus den analysierten Proben der Tiere errechnet, bei denen bis zum 60. Tag nach der Belegung keinerlei Anzeichen einer Trächtigkeit festgestellt werden konnten (n=19). Sie lag bei  $0,67 \pm 0,3\text{ng/ml}$ . Die berechneten Gruppenmittelwerte ( $\pm\text{SD}$ ) sind in Abbildung 20 dargestellt.

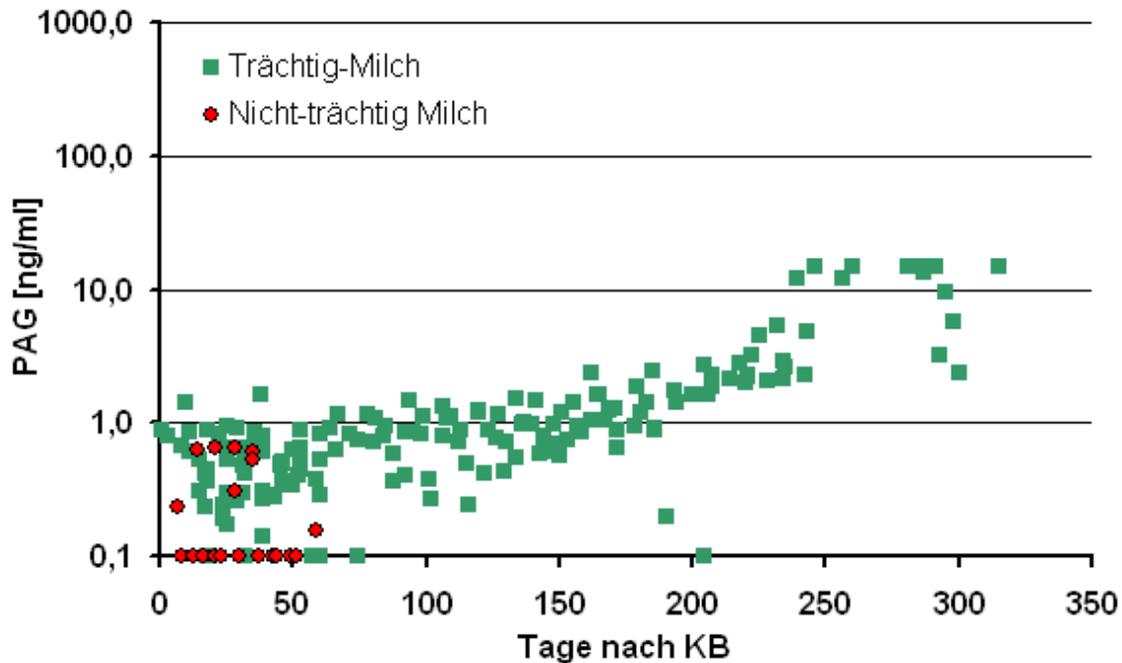


**Abb. 20:** PAG-Konzentrationen ( $\bar{x} \pm SD$ ) im Blut nicht trächtiger (NT) und trächtiger Kühe in der 3. (d21), 4. (d28) und 5. (d35) Trächtigkeitswoche. (ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; Dunnett-t-Test).

Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrollgruppe (NT) waren ab der 4. Woche, also 22 bis 28 Tage nach der Besamung, nachweisbar. Hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen den Gruppen konnten ab der 5. Woche belegt werden (Dunnett-t-Test).

#### 4.3.2 Milch-PAG-Konzentrationen während der Trächtigkeit

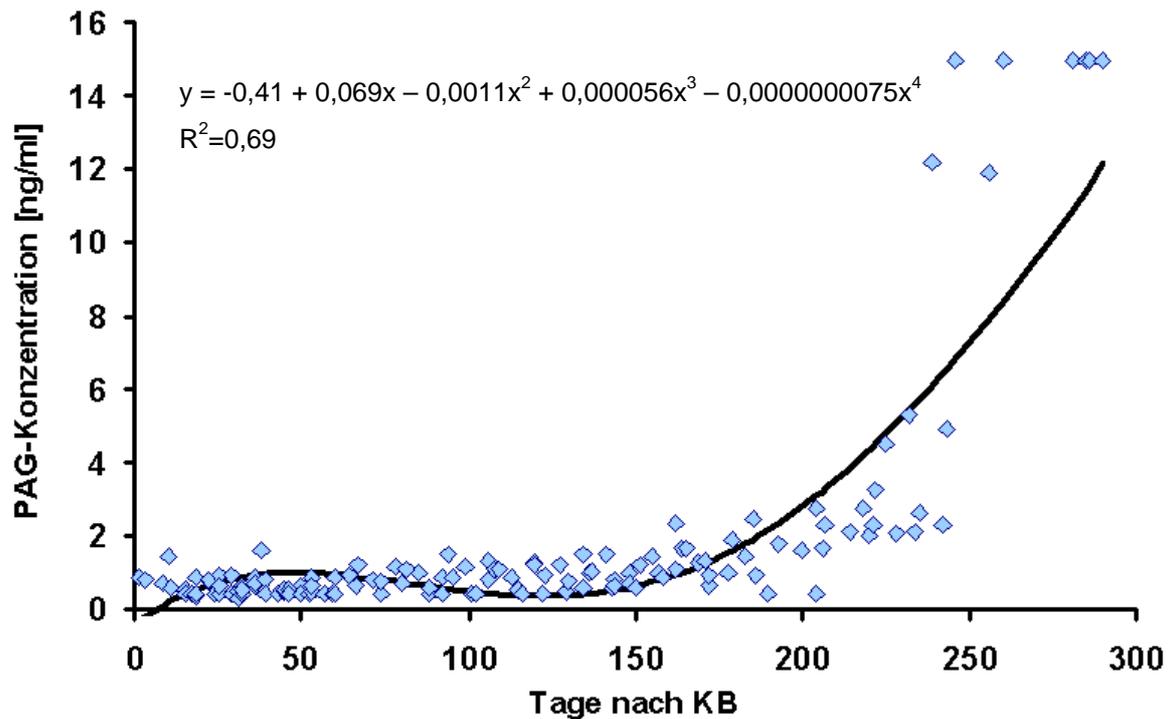
Parallel zu der Blutprobenentnahme wurden Milchproben von den in Kapitel 4.3.1 genannten trächtigen ( $n=10$ ) und nicht trächtigen ( $n=2$ ) Kühen genommen. Die Entwicklung der PAG-Konzentration in der Magermilch trächtiger Kühe ist in logarithmischer Skalierung in Abbildung 21, der Verlauf und die Gleichung der Regressionskurve in Abbildung 22 dargestellt. Die PAG-Konzentration nicht trächtiger Tiere erreichten maximale Werte von  $0,65 \text{ ng/ml}$ , die mittlere PAG-Konzentration lag bei  $0,46 \pm 0,1 \text{ ng/ml}$ . Hierbei wurden Proben mit Konzentrationen unterhalb des messbaren Bereichs mit  $0,1 \text{ ng/ml}$ , Proben mit Konzentrationen oberhalb des messbaren Bereichs mit  $15,0 \text{ ng/ml}$  angegeben.



**Abb. 21:** PAG-Konzentrationen in der Milch trächtiger (■) und nicht trächtiger (●) Kühe nach erfolgter KB.

Die mittlere Konzentration trächtiger Tiere lag bei  $0,67 \pm 0,34 \text{ ng/ml}$  bis zum 100. Tag, zwischen dem 100. und 150. Tag bei  $0,83 \pm 0,33 \text{ ng/ml}$  und zwischen dem 150. und 200. Tag bei  $1,28 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$ . Konzentrationen unterhalb des messbaren Bereichs wurden, mit einer Ausnahme am 204. Tag, bis zum 74. Tag der Trächtigkeit gemessen. Ab dem 60. Trächtigkeitstag ist in Abbildung 20 ein leichter Anstieg des Konzentrationsniveaus zu erkennen. Mit der Ausnahme von 4 Proben an den Tagen 102, 116, 190 und 204 wurde eine untere Konzentration von  $0,4 \text{ ng/ml}$  nicht mehr unterschritten und es traten vermehrt Proben mit mehr als  $1,0 \text{ ng/ml}$  auf. Vor dem 60. Tag wurden Konzentrationen mit mehr als  $1,0 \text{ ng/ml}$  nur in zwei Fällen ( $1,4 \text{ ng/ml}$  d10 und  $1,6 \text{ ng/ml}$  d38) nachgewiesen. In der Regressionskurve war ein leichter Konzentrationszuwachs bis zum 50. Tag, mit anschließendem Abfall erkennbar.

Ein in beiden Abbildungen erkennbarer deutlicher Anstieg der PAG-Konzentration trat ab dem 150. Tag auf. Abgesehen von zwei Proben mit niedrigen Konzentrationen um den 200. Trächtigkeitstag lag die Konzentration der übrigen Proben ab dem 186. Tag über  $1,0 \text{ ng/ml}$ . Nach der Abkalbung fiel die Konzentration in der Milch rasch ab. Nur bei einem Tier wurde auch 30 Tage nach der Abkalbung eine PAG-Konzentration von mehr als  $15 \text{ ng/ml}$  in der Milch nachgewiesen.



**Abb. 22:** Verlauf der PAG-Konzentrationen in der Milch trächtiger Kühe. Dargestellt sind die gemessenen PAG-Konzentrationen bis zum 100. Tag nach KB (♦), sowie die zugehörige Regressionskurve (—).

### Korrelation Blut und Milch

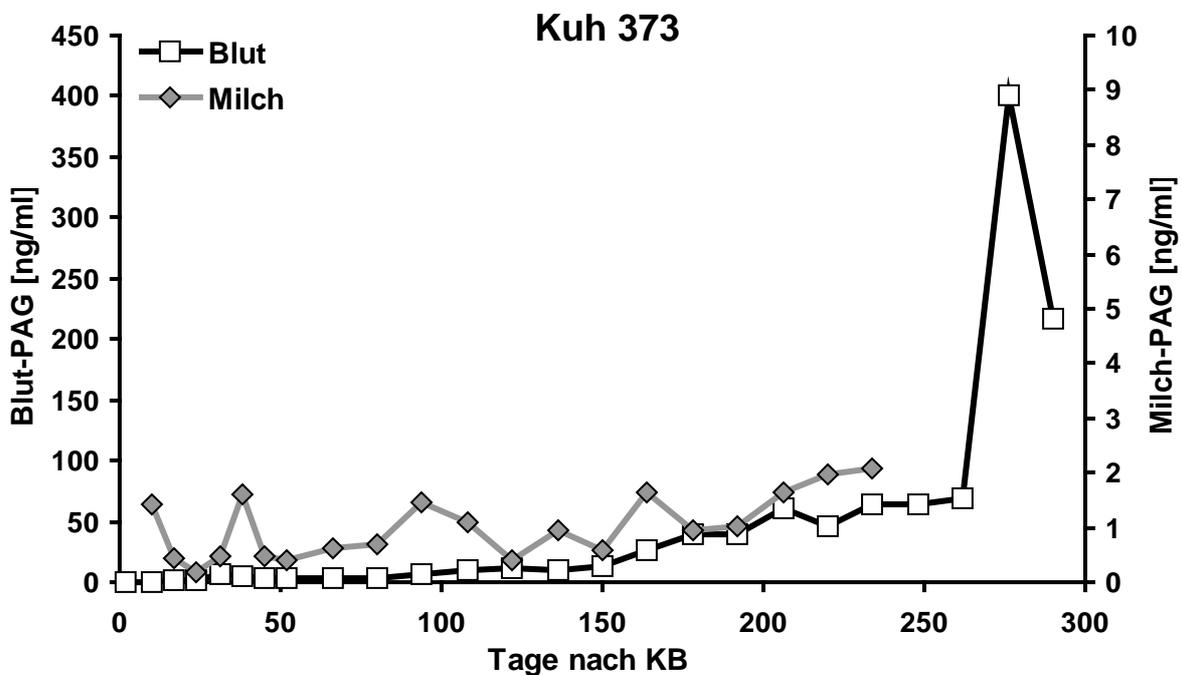
Die durchschnittlichen PAG-Mengen in Blut und Milch trächtiger Tiere sowie der prozentuale Anteil der Milch-Konzentration zu verschiedenen Trächtigkeitszeiten sind in Tabelle 12 dargestellt. Die in der Milch enthaltene Menge betrug zwischen 3 und 8,1% der im Blut nachgewiesenen Konzentration. Für alle analysierten Blut- und Milchproben mit Werten im messbaren Bereich (n=140) wurde eine signifikante Korrelationen ( $r=0,81$ ,  $p<0,01$ ) zwischen der Blut- und Milchkonzentration festgestellt.

**Tab. 12:** Mittlere PAG-Konzentrationen in Blut und Milch zu verschiedenen Zeiten der Trächtigkeit sowie der prozentuale Anteil der Milch-Konzentration an der im Blut nachgewiesenen PAG-Menge.

Tag der Trächtigkeit	Blut PAG (ng/ml)	Milch PAG (ng/ml)	%-Anteil
51 – 100	7,8	0,6	8,1
101 – 150	19,3	0,8	4,2
151 – 200	42,5	1,3	3,0
201 – 250	102,9	3,9	3,7
total	57,8	1,9	3,2

### 4.3.3 Exemplarische PAG-Verlaufskurven

Die Verlaufprofile der Einzeltiere unterlagen mitunter mehr oder weniger starken Schwankungen. Besonders in der Milchkurve traten zu Beginn der Trächtigkeit starke Konzentrationsfluktuationen auf. Exemplarisch sind in Abbildung 23 und 24 die PAG-Verläufe zweier Kühe dargestellt. Bei Kuh 373 (Abb. 23) wurden extrem starke Schwankungen in der Milchkurve festgestellt. Zu Beginn der Trächtigkeit traten Konzentrationen von bis zu 1,8ng/ml auf, die im späteren Verlauf immer wieder auf Werte am unteren messbaren Bereich abfielen. Erst ab dem 160. Tag der Trächtigkeit wurde eine Konzentration von 1ng/ml nicht mehr unterschritten. Die übrigen Verläufe finden sich im Anhang.

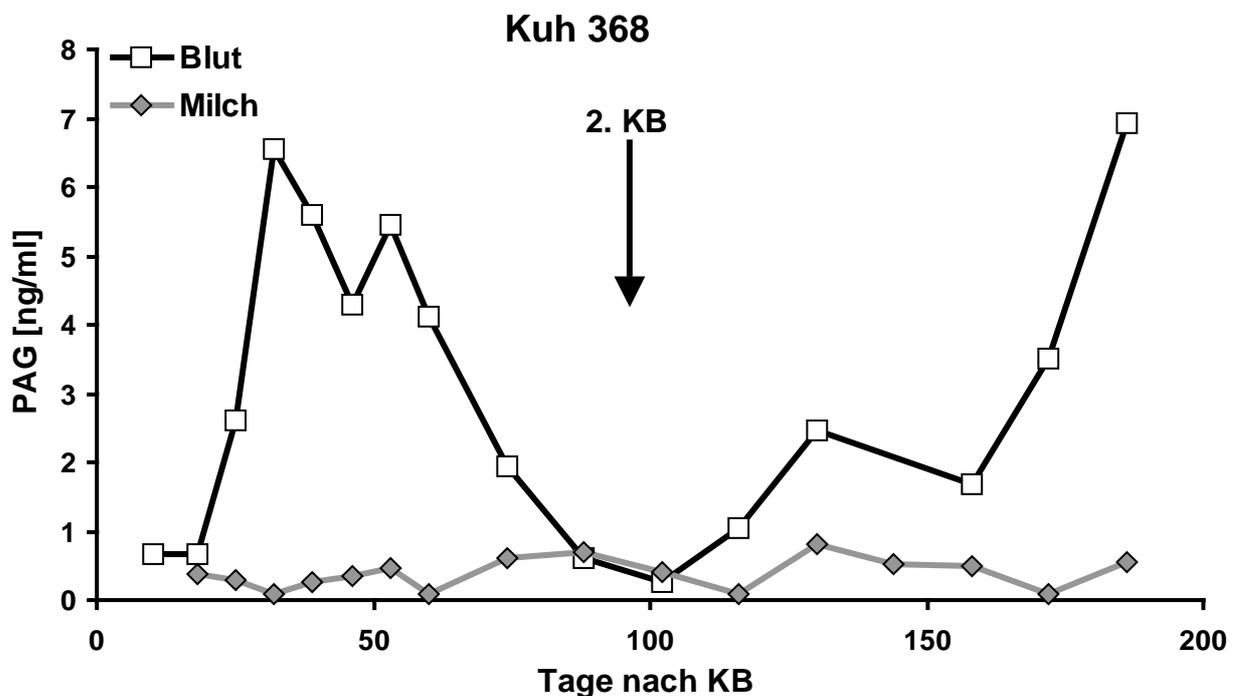


**Abb. 23:** Verlauf der PAG-Konzentration in Blut und Milch während der Trächtigkeit.

Die Profile der trächtigen Tiere zeigten insgesamt einen ähnlichen Verlauf wie in Abb. 23, mit einem zunächst flachen und zur Geburt starken Anstieg der Konzentration. Eine erste Erhöhung der PAG-Konzentration im Blut erfolgte um den 25. bis 30. Tag. Die zur Geburt erreichten maximalen Werte lagen zwischen 300 und 1200ng/ml. Die PAG-Konzentration in der Milch unterlag bis zum 200. Trächtigkeitstag mehr oder weniger ausgeprägten Schwankung zwischen 0 und 2,0ng/ml. Ein deutlich erkennbarer Anstieg wurde erst anschließend nachgewiesen.

Die höchsten Konzentrationen wurden in den Proben kurz vor und kurz nach der Abkalbung gemessen und erreichten mitunter mehr als 15ng/ml.

Einen Sonderfall in der Entwicklung der PAG-Konzentration stellte Kuh 368 dar (Abb. 24). Nach erfolgter Besamung stieg die PAG-Konzentration im Blut sehr steil an, erreichte am 32. Tag eine Konzentration von 6,6ng/ml und fiel dann bis zum 100. Tag wieder auf basales Niveau ab. Im Rahmen einer rektalen Untersuchung in der 7. Woche wurden deutliche Anzeichen einer Trächtigkeit festgestellt. Am 96. Tag nach der 1. Belegung zeigte das Tier Brunstzeichen und durch eine rektale Untersuchung konnten keine Anzeichen für das Vorliegen einer Trächtigkeit mehr festgestellt werden. Das Tier wurde erneut besamt. Nach der 2. Besamung stieg die PAG-Konzentration im Blut wieder an.



**Abb. 24:** PAG-Konzentrationen in Blut und Milch nach einem Abbruch der Trächtigkeit.

Eine weitere rektale Untersuchung am 140. Tag nach der 1. Belegung bestätigte das Vorliegen einer frühen Trächtigkeit. Leider wurde die Kuh jedoch vor Ende der Trächtigkeit verkauft, so dass die Probennahme abgebrochen werden musste. Die gemessenen Konzentrationen dieses Tieres wurden bei der Erstellung der PAG-Profile in Blut und Milch nicht berücksichtigt. Die PAG-Konzentration in der Milch des Tieres unterlag während des Versuchszeitraums leichten Schwankungen zwischen 0

und 1ng/ml. Ein deutlicher Anstieg der PAG-Konzentration in der Milch war bis zum Ende der Probennahme nicht zu erkennen. Die maximale Konzentration in der Milch betrug 0,8ng/ml.

## 4.4 Eignung des PAG-Tests zur Trächtigkeitsuntersuchung

### 4.4.1 PAG-Konzentrationen bei trächtigen und nicht trächtigen Kühen

Zwischen dem 10. und 50. Tag nach erfolgter künstlicher Besamung (KB) wurde von 422 Kühen eine Blutprobe entnommen. Die Verteilung der untersuchten Blutproben auf die unterschiedenen Zeiträume nach der Belegung und die verschiedenen Konzentrationsgruppen ist in Tabelle 13 dargestellt. Bei 58% der Proben (n=244) konnte eine PAG-Konzentration von >2,5ng/ml, bei 28% (n=120) von weniger als 1,5ng/ml nachgewiesen werden, 7,8% hatten eine Konzentration von 1,5-2,0ng/ml und 5,9% von 2,0-2,5ng/ml.

**Tab. 13:** Verteilung der untersuchten Blutproben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe (n=422) auf die vier unterschiedenen Konzentrations- (1,5ng/ml, 1,5-2,0ng/ml, 2,0-2,5ng/ml und >2,5ng/ml) und Zeitgruppen (<25., 26.-30., 31.-35. und >35. Tag nach KB).

PAG-Konzentration (ng/ml)	Anzahl Proben	Zeit nach KB (d)	Anzahl Proben
<1,5	120	<25	70
1,5 – 2,0	33	26-30	117
2,0 – 2,5	25	31-35	90
>2,5	244	>35	145

Von den untersuchten Proben stammten 17,7% (n=70) bis 25 Tage, 27,7% (n=117) 26 bis 30, 21,3% (n=90) 31 bis 35 und 34,4% (n=145) mehr als 35 Tage nach der Belegung.

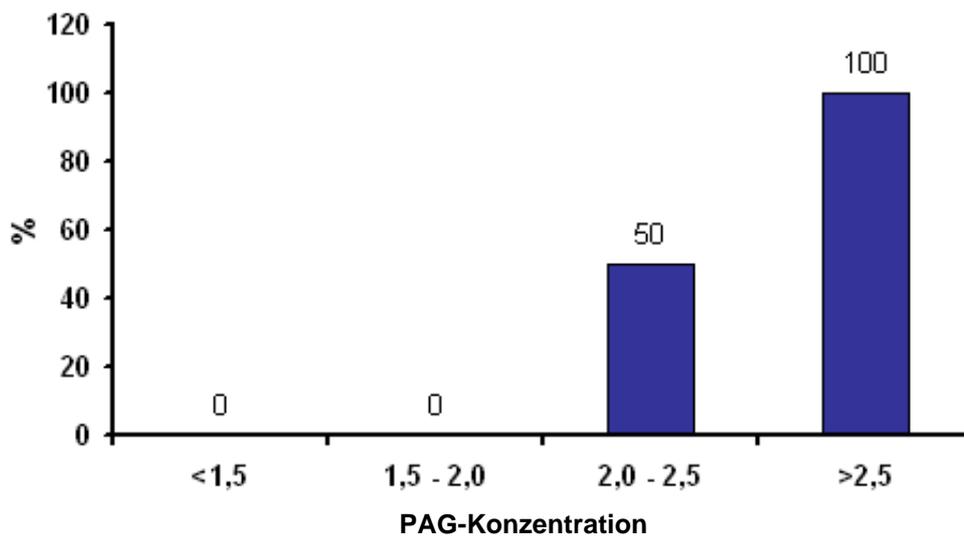
### Vergleich mit ultrasonographischer Untersuchung

Von 38 ultrasonographisch untersuchten Tieren, wurde bei 24 eine Trächtigkeit festgestellt. Die mittlere PAG-Konzentration ( $\bar{x} \pm SD$ ) der trächtigen Tiere betrug am 28. Tag  $4,0 \pm 1,8$ ng/ml, bei nicht trächtigen Tieren (n=14) lag sie bei  $1,1 \pm 0,6$ ng/ml. Die Verteilung der untersuchten Tiere auf die 4 Konzentrationsgruppen ist in Tabelle 14 und in Abbildung 25 dargestellt. Bei 23 trächtigen Tieren wurde eine PAG-Konzentration von mehr als 2,5ng/ml nachgewiesen. Von den nicht trächtigen Tieren (n=14) wurde bei 13 Tieren eine Konzentration von weniger als 2,0ng/ml festgestellt.

**Tab. 14:** Verteilung nach ultrasonographischer Untersuchung (d28) trächtiger und nicht-trächtiger Tiere auf vier PAG-Konzentrationsgruppen.

PAG (ng/ml)	Anzahl Kühe	Anteil trächtiger Kühe (%)
<1,5	11	0
1,5 – 2,0	2	0
2,0 – 2,5	2	50
>2,5	23	100

In 2 Fällen lag die PAG-Konzentration zwischen 2,0 und 2,5ng/ml. Von diesen ist eine Kuh (2,48ng/ml) mittels Ultraschall als trächtig, die andere (2,24ng/ml) als nicht trächtig erkannt worden.



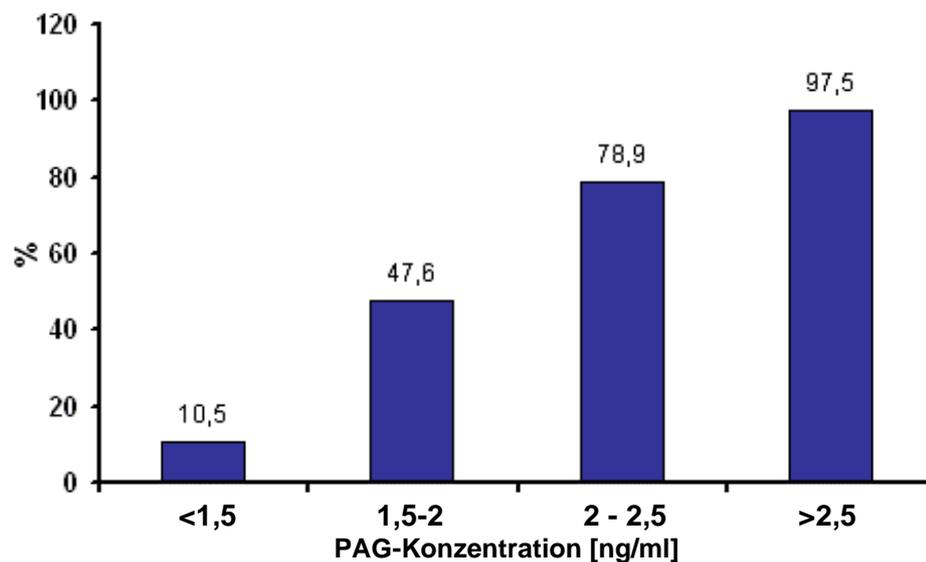
**Abb. 25:** Anteil trächtiger Kühe innerhalb der unterschiedenen PAG-Konzentrationsgruppen. Die Trächtigkeitsdiagnose wurde mittels ultrasonographischer Untersuchung (d28) gestellt.

### Vergleich mit rektaler Untersuchung

Die Verteilung der als trächtig und nicht trächtig erkannten Tiere auf die Konzentrationsgruppen erfolgte nach einer rektalen Untersuchung und ist in Tabelle 15 und Abbildung 26 dargestellt. Bei 158 Tieren wurden mehr als 2,5ng/ml PAG, bei 40 Tieren zwischen 1,5 und 2,5ng/ml und bei 76 Tieren weniger als 1,5ng/ml nachgewiesen.

**Tab. 15:** Verteilung der nach rektaler Untersuchung (ab d50) als trächtig erkannter Kühe auf verschiedene PAG-Konzentrationsgruppen.

PAG (ng/ml)	Anzahl Kühe	Davon trächtig Anzahl	(%)
<1,5	76	8	10,5
1,5 – 2,0	21	10	47,6
2,0 – 2,5	19	15	78,9
>2,5	158	154	97,5



**Abb. 26:** Prozentualer Anteil trächtiger Kühe innerhalb verschiedener PAG-Konzentrationsgruppen. Die Trächtigkeitsdiagnose wurde mittels rektaler Untersuchung (>d50) gestellt.

In 97,5% der Fälle wurden bei den Kühen mit mehr als 2,5ng/ml PAG bei der rektalen Untersuchung deutliche Anzeichen einer Trächtigkeit festgestellt. Bei PAG-Konzentrationen zwischen 2,0 und 2,5ng/ml lag der Anteil trächtiger Tiere bei 80%, bei 1,5-2,0ng/ml PAG bei 47,6%. In der Gruppe mit weniger als 1,5ng/ml PAG waren 8 Tiere (10,5%) trächtig.

In Tabelle 16 sind Anzahl und Anteil trächtiger (n=187) und nicht trächtiger Tiere (n=87) bei unterschiedlichen PAG-Grenzwerten zu verschiedenen Zeiten nach der KB dargestellt. Bis zum 25. Tag konnte bei 55% der trächtigen Tiere eine erhöhte Konzentration ( $\geq 2,0$ ng/ml) nachgewiesen werden. Mit zunehmender Zeit nach der KB

stieg dieser Anteil deutlich an. In der Gruppe 31. - 35. Tag wurden bei 97% mehr als 2,0ng/ml nachgewiesen, während bei 99% der trächtigen Tiere nach dem 35. Tag eine erhöhte PAG-Konzentration im Blut festgestellt wurde.

**Tab. 16:** Sicherheit der PAG-Trächtigkeitsdiagnose zu verschiedenen Zeiten nach KB bei Annahme verschiedener Grenzwerte. Eine Trächtigkeit wurde angenommen, wenn die Konzentration einer Blutprobe über dem jeweiligen Grenzwert lag. Die Überprüfung der Diagnosen erfolgte mittels rektaler Untersuchung.

Tage nach KB	PAG- Grenzwert (ng/ml)	Tragende Kühe richtig erkannt		Nicht trächtige Kühe richtig erkannt	
		Anzahl	%	Anzahl	%
<b>Bis 25</b> (n=43)	1,5	16	73	17	81
	2,0	12	55	20	95
	2,5	10	46	21	100
<b>26 – 30</b> (n=60)	1,5	40	98	13	68
	2,0	35	85	16	84
	2,5	32	78	18	95
<b>31 - 35</b> (n=62)	1,5	39	100	18	78
	2,0	38	97	21	91
	2,5	34	87	21	91
<b>&gt;35</b> (n=109)	1,5	84	99	20	83
	2,0	84	99	22	92
	2,5	77	91	23	96

Im Gegensatz zur PAG-Konzentration trächtiger Tiere, veränderte sich die Konzentration nicht trächtiger Tiere mit zunehmender Zeit nach der KB nur gering. Bis zu 100% der nicht trächtigen Kühe (bis d25) wiesen Konzentrationen von weniger als 2,5ng/ml auf, 84 bis 95% weniger als 2,0ng/ml und 68 bis 83% der Tiere weniger als 1,5ng/ml auf.

Im gesamten Versuchszeitraum wurde bei 18 trächtigen Tieren (9,6%) eine PAG-Konzentration von weniger als 2,0ng/ml, bei 8 (4,3%) weniger als 1,5ng/ml nachgewiesen. Der Anteil daraus resultierender falsch negativer Diagnosen reduzierte sich mit zunehmender Zeit nach der KB von 27,3% (d20-25) auf 1,2% (>d35).

Der Anteil nach rektaler Untersuchung als nicht trächtig erkannter Kühe mit niedrigen PAG-Konzentrationen (<2,0 ng/ml) lag bis zum 25. Tag nach KB bei

95,2%, für d26-30 bei 84,2%, für d31-35 bei 91,3% und für Kühe nach dem 35. Tag bei 91,7%. Bei 8 nicht trächtigen Kühen (9,2%) wurde zuvor eine PAG-Konzentration von mehr als 1,5ng/ml nachgewiesen, bei 4 Tieren (4,6%) betrug sie mehr als 2,5ng/ml.

### Kontrolle durch 2. PAG Probe

Bei 110 Kühen wurde zur Überprüfung der Trächtigkeitsdiagnose 4 bis 6 Wochen nach der 1. Probe (Probe A) eine weitere Blutprobe (Probe B) entnommen und ihr PAG-Gehalt bestimmt. Tiere mit Konzentrationen von mehr als 2,5 ng/ml in Probe B wurden als trächtig eingestuft. In Tabelle 17 ist die Verteilung der Proben, unabhängig vom Tag der Trächtigkeit, auf die Konzentrationsgruppen dargestellt.

Bei 30% der untersuchten Tiere (n=33) lag die Konzentration der 1. Probe unter 1,5ng/ml, bei 9,1% (n=10) zwischen 1,5 bis 2,0ng/ml, bei 3,6% (n=4) zwischen 2,0 bis 2,5ng/ml und bei 57,3% (n=63) bei mehr als 2,5ng/ml.

**Tab. 17:** Verteilung der PAG-Konzentrationen von 1. und 2. Blutprobe (n=110) auf die Konzentrationsgruppen.

PAG		2. Probe (n=110)				
		<1,5	1,5-2,0	2,0-2,5	>2,5	
	<b>Tiere</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>73</b>	
<b>1. Probe (n=110)</b>	<1,5	33	17	5	4	7
	1,5-2,0	10	0	2	2	6
	2,0-2,5	4	0	1	1	2
	>2,5	63	3	1	1	58

Die in der 2. Blutprobe gemessenen Werte waren bei 65% der Tiere (n=78) in der gleichen Konzentrationsgruppe wie zuvor. Bei 4,5% (n=5) war die PAG-Konzentration niedriger und bei 24,5% (n=27) war sie höher als in der ersten Probe. Tiere mit einer hohen PAG-Konzentration (>2,5ng/ml) in der 1. Probe (n=63) wiesen in 92% der Fälle auch in der 2. Probe eine erhöhte PAG-Konzentration auf, während bei 5 Tieren eine geringere Konzentration als zuvor gemessen wurde. Niedrige Konzentrationen (<1,5ng/ml) wurden bei 33 Kühen in der 1. Probe und bei 17 Tieren (51,5%) davon auch in der 2. Probe nachgewiesen, während ein Anstieg auf mehr als 2,5ng/ml in der 2. Probe bei 7 Tieren nachgewiesen werden konnte.

Die Verteilung der untersuchten Proben auf unterschiedliche Zeiten nach der Belegung ist Tabelle 18 zu entnehmen. Für die verschiedenen Zeiten der 1. Probeentnahme (Tage nach KB) wurden die Anzahl an Kühen mit Konzentrationen bis zu den angegebenen Grenzwerten und die Konzentrationsentwicklung anhand einer 2. Probe ermittelt.

**Tab. 18:** Entwicklung der PAG-Konzentration zweier aufeinanderfolgender Blutproben (n=110) in Abhängigkeit von verschiedenen Zeiten (<25, 26-30, 31-35 und >35) nach KB und verschiedenen Konzentrationsgruppen (bis 1,5, bis 2,0, bis 2,5 und >2,5ng/ml).

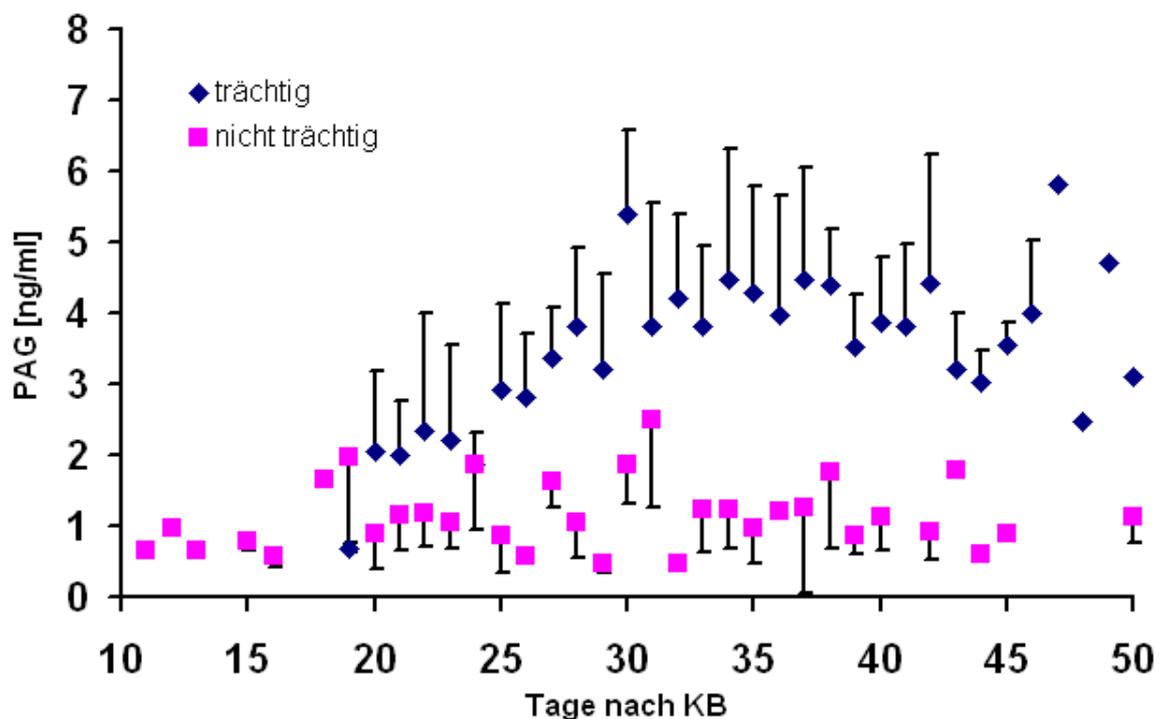
	Tage nach KB	PAG (ng/ml)	Anzahl	PAG Konz. der 2. Probe (ng/ml)			
				Bis 1,5 (in %)	Bis 2,0 (in %)	Bis 2,5 (in %)	>2,5 (in %)
1. Probe	<25	Bis 1,5	16	38	56	69	31
		Bis 2,0	20	30	50	65	35
		Bis 2,5	20	30	50	65	35
		>2,5	7	29	29	29	71
	26 - 30	Bis 1,5	4	25	50	75	25
		Bis 2,0	8	13	25	50	50
		Bis 2,5	9	11	33	56	44
		>2,5	10	0	0	0	100
	31 - 35	Bis 1,5	7	71	86	86	14
		Bis 2,0	9	56	78	78	22
		Bis 2,5	10	50	70	70	30
		>2,5	18	6	11	0	89
	>35	Bis 1,5	6	67	83	100	0
		Bis 2,0	6	67	83	100	0
		Bis 2,5	8	50	63	88	12
		>2,5	28	0	0	4	96

Mit zunehmender Zeit nach der KB stieg der Anteil von Tieren mit hohen Konzentrationen in der 1. Probe an, während sich der Anteil von Kühen bei denen erst in der 2. Probe eine erhöhte Konzentration nachgewiesen werden konnte reduzierte. Ein Anstieg auf mehr als 2,5ng/ml von der 1. zur 2. Probe wurde 31-35 Tage nach KB noch in einem (14,3%) und nach dem 35. Tag in keinem der Fälle mehr nachgewiesen. Ein Absinken der PAG-Konzentration von >2,5ng/ml in der 1. auf weniger als 1,5ng/ml in der 2. Probe wurde bei 3 Tieren gemessen.

#### 4.4.2 Entwicklung der PAG-Konzentration in der frühen Trächtigkeit

##### Tagesmittelwerte

Anhand der ermittelten PAG-Konzentrationen und der vorgenommenen Trächtigkeitsuntersuchungen wurden PAG-Tagesmittelwerte ( $\pm$ SD) für trächtige ( $n=267$ ) und nicht trächtige ( $n=130$ ) Kühe bis zum 50. Tag nach der Belegung berechnet. Der Verlauf der mittleren PAG-Tageskonzentrationen ist in Abbildung 27 dargestellt.



**Abb. 27:** Verlauf der PAG-Konzentration trächtiger ( $n=267$ ) und nicht-trächtiger ( $n=130$ ) Kühe zwischen dem 10. und 50. Tag nach der Belegung (Mittelwert  $\pm$ SD).

Die Entwicklung der Konzentration im Versuchszeitraum zeigte bei nicht trächtigen Kühen einen konstanten Verlauf auf niedrigem Niveau, mit einzelnen hohen Standardabweichungen. Die mittlere PAG-Konzentration betrug  $1,1 \pm 0,5$  ng/ml. Erhöhte Konzentrationen mit bis zu  $2,4$  ng/ml wurden in Einzelfällen (Tag 30, 34, 38 und 43) gemessen. Die PAG-Konzentration im Blutserum trächtiger Tiere stieg ab dem 25. Tag deutlich an. Der Verlauf der Tagesmittelwerte trächtiger Tiere zeigte ebenfalls hohe individuelle Schwankungen. Im Versuchszeitraum wurden Konzentrationen zwischen  $2,0$  bis  $7,1$  ng/ml gemessen. Die mittlere PAG-Konzentration trächtiger Tiere lag bei  $3,81 \pm 1,66$  ng/ml.

### 5-Tagemittelwerte

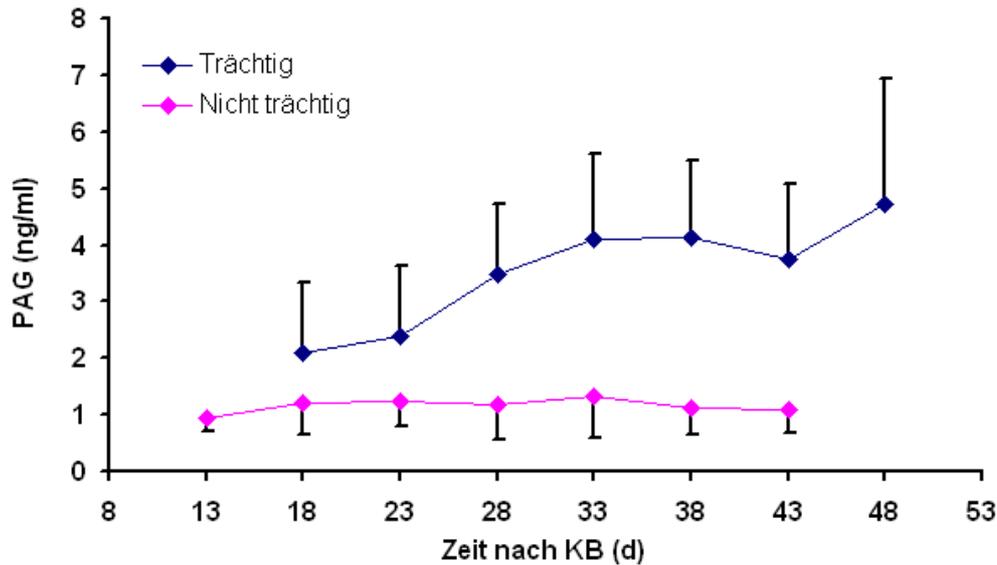
Von den 267 trächtigen und 130 nicht trächtigen Kühen wurden 5-Tagemittelwerte der PAG-Konzentration in der Zeit vom 11. bis 50. Tag nach erfolgter Besamung berechnet. Die Mittelwerte ( $\pm$ SD) der Tiere sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tab. 19:** 5-Tagemittelwerte ( $\pm$ SD) der PAG-Konzentration trächtiger und nicht-trächtiger Tiere zu verschiedenen Zeiten nach KB.

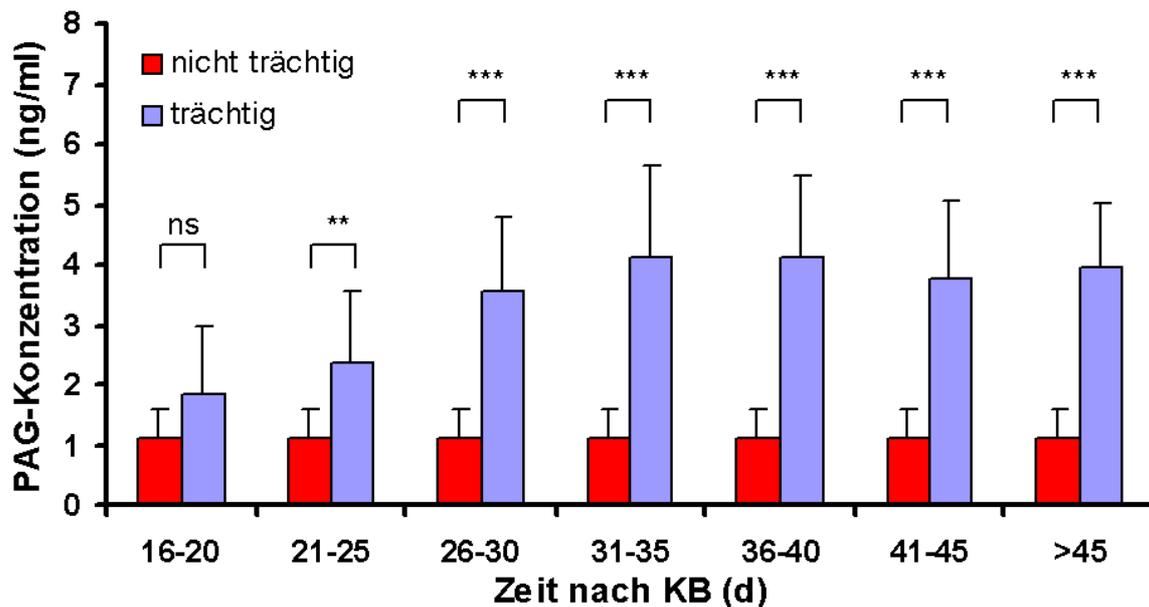
Zeit nach KB (d)	Trächtige Kühe			Nicht trächtige Kühe		
	Anzahl	Mittel	SD	Anzahl	Mittel	SD
<15 (13)	-	-	-	6	0,9	0,2
16-20 (18)	7	2,1	1,2	10	1,2	0,6
21-25 (23)	21	2,4	1,2	18	1,2	0,4
26-30 (28)	69	3,5	1,2	37	1,2	0,6
31-35 (33)	57	4,1	1,5	31	1,3	0,7
36-40 (38)	41	4,1	1,3	16	1,1	0,5
41-45 (43)	23	3,7	1,3	12	1,1	0,4
>45 (48)	49	4,7	2,2	-	-	-

Die mittlere PAG-Konzentration nicht trächtiger Tiere der 5-Tagemittelwerte blieb auf konstantem Niveau und schwankte zwischen 0,9 und 1,3ng/ml, während die Konzentration trächtiger Tiere ab dem 18. Tag von 2,1ng/ml auf 2,4ng/ml (Tag 23) anstieg. Die Konzentration trächtiger Tiere stieg bis zum 33. Tag kontinuierlich auf 4,1ng/ml an und lag im weiteren Verlauf zwischen 3,7 und 4,7ng/ml, zeigte mitunter jedoch Standardabweichungen von bis zu 2,2ng/ml. Der Verlauf der PAG-Konzentration vom 13. bis 48. Tag nach der Belegung ist in Abbildung 28 zu sehen. Ein hochsignifikanter Konzentrationsunterschied ( $p \leq 0,001$ ; Dunnett-t-Test) im Verlauf der PAG-Konzentration zwischen trächtigen und nicht trächtigen Tieren war ab dem 28. Tag nachweisbar.

Die mittlere Konzentration nicht trächtiger Tiere blieb im Versuchszeitraum weitestgehend konstant. Signifikante Unterschiede zu verschiedenen Zeiten nach der Belegung konnten nicht festgestellt werden ( $p=1,0$ ; Scheffé-Test). Im Folgenden wurde die mittlere Konzentration aller nicht trächtigen Tiere (NT) als Kontrollgruppe verwendet.



**Abb. 28:** Verlauf der PAG-Konzentrationen trächtiger (n=267) und nicht trächtiger (n=130) Kühe zwischen dem 10. und 50. Tag nach KB. Dargestellt anhand von 5-Tagemittelwerte (Mittel  $\pm$ SD).



**Abb. 29:** Mittlere PAG-Konzentrationen ( $\bar{x} \pm$ SD) im Blut 16 bis 50 Tage trächtiger und einer Kontrollgruppe nicht trächtiger Tiere (NT) (ns = nicht signifikant; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001; Dunnett-t-Test).

Signifikante Unterschiede (p<0,01; Dunnett-t-Test) zwischen der Kontrollgruppe (NT) und den trächtigen Kühen waren ab 23 Tage (d21-26), hochsignifikante Unterschiede (p<0,001; Dunnett-t-Test) ab 28 Tage (d26-30) nach der Belegung nachweisbar (Abb. 29).

#### 4.4.3 Aussagesicherheit des PAG-Tests

Anhand der gestellten Trächtigkeitsdiagnosen der 2. Untersuchung wurde für alle trächtigen und nicht trächtigen Kühe die Anzahl richtiger und falscher Diagnosen des PAG-Tests ermittelt. Als Grenzwerte für die verschiedenen Zeiträume (26-30, 31-35, 36-40 und >40 Tage nach KB) wurden 1,5ng/ml, 2,0ng/ml und 2,5ng/ml festgelegt. Die Anzahl korrekter und nicht korrekter Diagnosen, sowie Sensitivität, Spezifität und positiv und negativ Vorhersagewerte (NPV, PPV) sind im Anhang aufgeführt. In Tabelle 20 ist der Anteil nach PAG-Bestimmung korrekt und nicht korrekt gestellter Diagnosen in Abhängigkeit von den unterschiedenen Grenzwerten zu den verschiedenen Zeiten dargestellt.

**Tab. 20:** Genauigkeit der nach PAG-Bestimmung gestellten Trächtigkeitsdiagnosen unter Annahme verschiedener PAG-Grenzwerte zu verschiedenen Zeiten nach KB. Die Bestätigung der Diagnose erfolgte mittels ultrasonographischer oder rektaler Untersuchung oder der PAG-Bestimmung einer 2. Blutprobe.

Tage nach KB	PAG-Grenzwert (ng/ml)	PAG - trächtig (> Grenzwert)		PAG - nicht trächtig (< Grenzwert)		Genauigkeit <sup>1</sup> (%)
		Anzahl	davon korrekt (%)	Anzahl	davon korrekt (%)	
<b>26 – 30</b> (n=106)	1,5	77	87	29	93	89
	2,0	63	94	43	77	87
	2,5	56	100	50	74	88
<b>31 – 35</b> (n=88)	1,5	63	89	25	96	91
	2,0	58	95	30	93	94
	2,5	54	94	34	82	90
<b>36 – 40</b> (n=57)	1,5	42	95	15	93	95
	2,0	42	95	15	93	95
	2,5	39	100	18	89	96
<b>&gt;40</b> (n=84)	1,5	73	97	11	91	96
	2,0	71	100	13	92	99
	2,5	65	100	19	63	92

<sup>1</sup>) Anteil korrekt gestellter Diagnosen von allen gestellten Diagnosen

Wie in Tabelle 20 zu erkennen ist, ist die Genauigkeit des PAG-Tests abhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme und den gesetzten Grenzwerten. Mit zunehmender

Zeit nach der KB verbesserte sich der Anteil korrekt gestellter positiver Trächtigkeitsdiagnosen, während der Anteil korrekter negativer Diagnosen weitestgehend konstant blieb. Bis zum 30. Tag lag die Genauigkeit unter 90%, danach deutlich darüber. Die höchste Genauigkeit von 99% wurde bei einem Grenzwert von 2,0ng/ml ab dem 40. Tag erreicht, wobei der Anteil korrekt positiver Diagnosen mit steigendem Grenzwert zu- und der Anteil korrekt negativer Diagnosen abnahm, was auf eine höhere Anzahl falsch negativer Diagnosen bei steigendem Grenzwert zurückzuführen war. Erreichte die PAG-Konzentration einer Blutprobe 2,5ng/ml wurden in fast allen Fällen in der 2. Untersuchung sichere Anzeichen für das Vorliegen einer Trächtigkeit festgestellt. Lag die Konzentration unter 1,5ng/ml, waren nur in Einzelfällen in der 2. Untersuchung Anzeichen einer Trächtigkeit feststellbar. Demnach wurden höchste Spezifitäten und positiv prädiktive Werte (PPV) bei einem Grenzwert von 2,5ng/ml erreicht, höchste negative prädiktive Werte (NPV) und Sensitivitäten bei unterschreiten des Grenzwertes von 1,5ng/ml.

## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein enzymimmunologisches Verfahren (ELISA) zu etablieren, welches den Nachweis des von ZOLI et al. (1991) isolierten "pregnancy-associated glycoprotein" (PAG) im Blut und in der Milch trächtiger Kühe ermöglicht. Die daraus resultierende Möglichkeit, eine vorliegende Trächtigkeit frühzeitig anhand einer Blut- oder Milchprobe zu erkennen, wäre für die Milchviehhaltung von großem Interesse. Neben der Entwicklung des Assays sollte der Verlauf der PAG-Konzentration anhand von regelmäßig genommenen Blut- und Milchproben während der Trächtigkeit dargestellt werden. In einem umfangreichen Feldversuch wurde die Sicherheit einer frühestmöglichen PAG-Trächtigkeitsdiagnose im Vergleich zu den üblichen Methoden der Trächtigkeitsfeststellung ermittelt.

### 5.1 ELISA-Entwicklung

Die Entwicklung des ELISAs zur Bestimmung der Konzentration von bovinem "pregnancy-associated glycoprotein" basierte auf den Erfahrungen des von Prof. J.F. Beckers (ULG, Belgien) etablierten RIA und den im Hormonlabor des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik entwickelten ELISAs zur Bestimmung verschiedenster Steroidhormone und Proteine beim Nutztier (NIGGEMEYER, 1989; MÖLLER, 1991; HENNIES, 1994; MANN, 1996).

Vor der Entwicklung des Assays stellte sich die Frage, welche der verschiedenen ELISA-Techniken für den PAG-Nachweis geeignet sind. Da in den nicht kompetitiven Verfahren Antikörper und Tracer in viel höheren Konzentrationen verwendet werden müssen und somit die Gefahr einer erhöhten Unspezifität durch mögliche kreuzreagierende Antikörper besteht (TIJSSEN, 1985), kam nur ein kompetitives Verfahren mit einer Vorinkubation des Antikörpers in Frage, in dem geringe Mengen Tracer mit dem in der Serumprobe enthaltenen PAG um Antikörperbindungsplätze konkurrieren und einen sensitiven Nachweis ermöglichen. Die Vorinkubation des spezifischen Antikörpers sollte eine Verbesserung der Sensitivität des Assays bewirken (OELLERICH, 1984). Das von MIYAI et al. (1976) erstmals beschriebene Doppelantikörperverfahren wurde aufgrund seiner hohen Sensitivität bei geringen Konzentrationen und den vielseitigen Einsatzmöglichkeiten verwendet. Grundlage bildet hierbei eine mit einem Beschichtungs- oder Fangantikörper versehene

Mikrotiterplatte. Der Beschichtungsantikörper besitzt eine hohe Affinität zu im Kaninchen gewonnenen Antikörpern und erzielt daher auch bei hoher Antiserumverdünnung oder bei der Verwendung von Antiseren mit einer geringen Konzentration von spezifischen Antikörpern hohe Sensitivitäten (CROWTHER, 2000). Für die Testetablierung standen 10 vom Kaninchen gewonnene Antiseren mit unbekanntem Konzentrationen spezifischer Antikörper zur Verfügung. Um die in begrenzten Mengen zur Verfügung stehenden Antiseren am effektivsten nutzen zu können, wurde ein Doppelantikörper-ELISA (nach MIYAI et al., 1976) entwickelt, der auch bei hohen Antiserum-Verdünnungen eine hohe Testsensitivität aufweist.

Für die Herstellung des Tracers wurde gereinigtes bPAG-1 biotiniert. Biotin ist nicht nur kostengünstiger als eine direkte Peroxidase-Markierung, sondern bewirkt aufgrund des niedrigeren Molekulargewichts eine geringe sterische Behinderung der Tracer-Antikörperbindung (HENNIES, 1994). Der optimale Biotinisierungsgrad ist nach BIEBER (1990) stark abhängig von der Art und Beschaffenheit des Analyts. Von den getesteten Biotinkonzentrationen zeigte der Tracer mit 20-facher Überschusslösung die höchste Sensitivität. Die Lagerfähigkeit des Tracers in Glycerol war bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens 1 Jahr ohne größeren Aktivitätsverlust gegeben.

Die Bindungsaffinität des Tracers wurde zu 10 unterschiedlichen Antiseren ermittelt. Die Antikörper zeigten, wie erwartet (HENNIES, 1994), eine hohe Variabilität in ihrer Immunantwort zum Tracer. Die Bindungsaffinitäten der im ELISA verwendeten AS 726 und dem im RIA verwendeten AS 805 sind im Anhang dargestellt. Für die Etablierung des ELISA wurde AS 726 verwendet, das neben einer besonders hohen Affinität zum Tracer auch bessere Sensitivitäten im unteren Konzentrationsbereich zeigte die übrigen Antiseren. Optimale Extinktionswerte von 1,0 bis 1,5 optischen Einheiten (MÖLLER, 1991) wurden bei AS 726 bei einer Antikörperverdünnung von 1:200000 und einer Tracerverdünnung von 1:1000 in Testpuffer (TP-1) erzielt. Durch die hohe Verdünnungsmöglichkeit des Antiserums wird zusätzlich ein negativer Effekt durch andere im Antiserum enthaltene Antikörper und deren mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen oder Hormonen erheblich reduziert (HENNIES, 1994). Die Vorinkubation der Antiserumlösung bewirkt zudem eine optimale Belegung der freien Bindungsstellen des Beschichtungsantikörpers und verringert den Störeffekt durch im Probenmaterial

enthaltenen Substanzen, die bei einer gleichzeitigen Inkubation von Probe und Antiserum an freie Bindungsstellen koppeln könnten. Dies ist notwendig, da in der Analyse 50µl TP-1 und 50µl Standard bzw. Serumprobe aufgetragen werden mussten, um eine Parallelität der Standardkurven zu gewährleisten.

Für die Optimierung der Testgenauigkeit ELISA spielen die Inkubationszeiten der einzelnen reaktiven Komponenten, wie Antiserum, Proben oder Tracer, eine große Rolle. Während es bei einer zu kurzen Inkubationszeit nur eine reduzierte Bindung von Probe bzw. Tracer an den Antikörper gibt, mit der keine ausreichende Enzymaktivität für eine Konzentrationsbestimmung erfolgen kann, wirkt sich eine zu lange Inkubationszeit oft negativ auf die Genauigkeit des Testsystems aus (MÖLLER, 1991). Der PAG-ELISA zeigte optimale Standardkurvenverläufe im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100ng/ml bei einer Antikörper-Vorinkubation von 20 Stunden bei +4°C und einer Probeninkubation von mindestens 10 Stunden bei Raumtemperatur. Oberhalb von 100ng/ml war eine konzentrationsproportionale Zunahme der Farbstärke nicht mehr gegeben (FRIEDRICH und HOLTZ, 2004). Die optimale Inkubationszeit und -temperatur für die Bindung der Proben an den 1. Antikörper im Radioimmunoassay wird von ZOLI et al. (1992b) mit 16 Stunden bei 37°C oder bei Raumtemperatur angegeben und ist identisch mit den im ELISA verwendeten Inkubationsbedingungen. Die Inkubationszeiten und die Zusammensetzung der Enzym- (Streptavidin-Peroxidase) und der Substratlösung (TMB) wurden den von MÖLLER (1991) und HENNIES (1994) beschriebenen Testabläufen für den Nachweis von Progesteron bzw. Somatotropin entnommen und erwiesen sich auch für den PAG-ELISA als gut geeignet. Die Kreuzreaktivitäten des im RIA und im ELISA verwendeten spezifischen Antikörpers wurden von ZOLI et al. (1992b) zu verschiedenen Hormonen der Hypophyse (LH, FSH), der Plazenta (bPL, SP<sub>1</sub>) oder des Fetus (AFP) untersucht. PERÉNYI (2002) untersuchte mögliche Kreuzreaktionen zu verschiedenen Verdauungsenzymen, wie Pepsinogen, Pepsin oder Chymosin. Diese traten nur bei Konzentrationen auf, die weit oberhalb der im Blut enthaltenen Mengen lagen. Aufgrund der von ZOLI et al. (1992b) und PERÉNYI (2002) durchgeführten Untersuchungen, die keine beeinträchtigenden Kreuzreaktionen zu den im RIA getesteten Antikörpern festgestellt haben, wurde auf eine eingehende Prüfung der Kreuzreaktion des Antikörpers im ELISA verzichtet.

Die Qualitätskriterien des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Blut-ELISA sind mit denen des RIA (ZOLI et al., 1992b) und des von GREEN et al. (2005) beschriebenen Sandwich-ELISA vergleichbar. Wiederfindungsraten ( $\pm$ CV) für 2 und 8ng/ml wurden im RIA mit  $96,15 \pm 5,41$  und  $97,39 \pm 2,87\%$  angegeben. Im ELISA lagen sie für die gleichen Konzentrationen bei  $105,2 \pm 11,6$  und  $100,4 \pm 6,7\%$ . Für den auf monoklonalen Antikörpern basierenden Sandwich-ELISA wurden Intraassay-Variationskoeffizienten von 3,7 und 8,3% für den Nachweis von 42 und 1,7ng/ml angegeben (GREEN et al., 2005).

Der Messbereich des RIA ist mit 0,5 bis 250ng/ml angegeben (ZOLI et al., 1992b). Der Messbereich des ELISA war abhängig von der eingesetzten Standardkurve und lag zwischen 0,4 und 100ng/ml (FRIEDRICH und HOLTZ, 2004). Für die Bestimmung geringer PAG-Konzentrationen wurde eine Standardreihe mit den Konzentrationen 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,56 – 0,78 und 0,39ng/ml verwendet, wobei 0,4ng/ml als untere Nachweisgrenze des Blut-ELISA ermittelt wurde. Serumproben mit höheren Konzentrationen wurden mit PAG-freiem Blutserum entsprechend vorverdünnt. Eine signifikante Korrelation ( $r=0,964$ ,  $p<0,01$ ) wurde für mittels RIA und ELISA analysierte Blutproben nachgewiesen, so dass die Messgenauigkeit des ELISA gegeben war.

Der Milch-Assay wurde auf der Basis des Blut-Assays entwickelt. Anstelle des verwendeten PAG-freien Blutserums wurde im Milch-ELISA handelsübliche Magermilch (<0,3% Fett) zur Erstellung der Standardreihen und der Bestimmung der Qualitätskriterien verwendet. Unbehandelte Frischmilchproben von nicht trächtigen Tieren, bzw. die daraus gewonnene Magermilch, zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den gemessenen Konzentrationen handelsüblicher H-Milch (<0,3% Fett), besaßen jedoch nur eine begrenzte Verwendungsdauer von weniger als 96 Stunden. Da die PAG-Konzentration in Frischmilch teilweise starken individuellen Variationen unterlag, schien die Verwendung der handelsüblichen H-Milch für die Erstellung von Standardreihen besser geeignet. Dies wurde auch im Rahmen der Entwicklung des RIA-Tests für den Nachweis von PAG in Ziegenmilch (GONZÁLES et al., 2001) bestätigt (SULON, persönl. Mitteilung). Pasteurisierte H-Milch wurde bei gekühlter Lagerung (+4°C) bis zu 20 Tage verwendet.

Die untere Nachweisgrenze des Milch-ELISA ist mit 0,4ng/ml identisch zu der des Blut-ELISA. Intraassay- und Interassay-Variationskoeffizienten für 0,8ng/ml waren mit 11 und 22% gegenüber dem Blut-ELISA leicht erhöht. Dies kann nach MEYER (1989) mit der Anfälligkeit der im ELISA verwendeten Peroxidase gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur, Inkubationszeit, Volumen, oder ähnlichem zusammenhängen, aber auch auf die Zusammensetzung des Analyts, in diesem Fall der Milch, zurückzuführen sein.

Bei der Entwicklung des Milch-ELISA wurde zunächst geprüft, welchen Einfluss Lagerungsart und -dauer auf die PAG-Konzentration einer Magermilchprobe hatten. Signifikante Unterschiede zwischen den PAG-Konzentrationen traten nach einer 96-stündigen Lagerung bei Raumtemperatur auf, während gekühlt gelagerte Milch (+4°C) nur leichte, tiefgefrorene (-20°C) Magermilch minimale Konzentrationschwankungen aufwies. Die gemessenen Konzentrationsänderungen in der Milch können auf organische aber auch bakterielle Enzyme zurückzuführen sein, die in der Regel bei Raumtemperatur, aber auch bei +4°C, aktiv sein können und in der Milch enthaltene Proteine verstoffwechseln (MA et al., 2003). PERÉNYI (2002) zeigte, dass ein hoher Anteil von Pepsinogen, Pepsin oder Chymosin in einer Probe zu Bindungsverlusten der PAG-Antikörper und einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Die hier verwendete Molke wurde daher durch Zugabe von HCl (5M) zur Absenkung des pH-Werts auf 4,6 und anschließende 25-minütige Zentrifugation bei 4000xg hergestellt (Sauermolke). Die Verwendung des Konservierungsstoffes Kaliumdichromat sowie die Verwendung von Sauermolke führte im ELISA zu erheblichen Konzentrationsschwankungen, so dass beides für die Aufarbeitung der Milchproben nicht geeignet war. Die beobachteten Konzentrationsschwankungen können durch einen Effekt des Kaliumdichromats auf das Reaktionsvermögen der Enzymlösung oder auf eine Beschädigung des PAG durch die Absenkung des pH-Werts zurückzuführen sein. Für die Analyse von Frischmilch ist daher eine rasche Verarbeitung nach gekühlter oder tiefgefrorener Lagerung der Proben zu Magermilch erforderlich.

## 5.2 Verlaufskurven der PAG-Konzentration bei trächtigen Tieren

Um die Entwicklung der PAG-Konzentration in Blut und Milch während der Trächtigkeit beim Rind darstellen zu können, wurden bis zum 70. Tag nach der Besamung wöchentlich, danach 14-tägig Blut- und Milchproben gesammelt. Der ermittelte Verlauf der PAG-Konzentration im Blut ist mit dem von ZOLI et al. (1992b) beschriebenen Verlauf weitestgehend identisch. Vom 20. Tag der Trächtigkeit an konnte ein leichter Anstieg der Konzentration erkannt werden. Zwischen dem 30. und 60. Tag blieb die Konzentration auf einheitlichem, leicht erhöhtem Niveau, mit starken tierindividuellen Unterschieden, und stieg erst nach dem 70. Tag weiter an. Bei Tier 368 wurde ein starker Anstieg der PAG-Konzentration bereits ab dem 25. Tag gemessen. MIALON et al. (1994) und PERÉNYI (2002) wiesen ebenfalls einen ersten PAG-Peak bei einzelnen Tieren um den 30. Tag nach, während SASSER et al. (1986) keinen derartigen Anstieg beobachteten. Laut PERÉNYI (2002) kann der starke Anstieg und der darauf folgende Abfall der Konzentration auf die unterschiedliche plazentale Entwicklung einzelner Tiere zurückzuführen sein. Ein weiteres Konzentrations-Plateau war zwischen dem 80. und 150. Tag zu erkennen, bevor die Konzentration bis zur Geburt erst kontinuierlich und dann stark anstieg. Das stufenweise Ansteigen der Konzentration könnte zum einen durch die von GREEN et al. (2000) beschriebene Expression unterschiedlicher PAG während der Trächtigkeit hervorgerufen werden, die möglicherweise eine veränderte Affinität zum verwendeten Antikörper besitzen, zum anderen auch mit der abgeschlossenen plazentaren Verankerung im 3. Monat und der ab dem 5. Monat verstärkter zunehmender Größe der Plazentome (MICHEL, 1986) zusammenhängen, durch die ein stärkerer Stoffaustausch zwischen maternaler und fetaler Seite erfolgt.

Die Konzentration in der Milch trächtiger Tiere blieb bei allen Tieren bis zum 50. Tag mit Konzentrationen von weniger als 1,0ng/ml auf nahezu basalem Niveau. Ein leichter Konzentrationsanstieg war bei vier Einzeltieren um den 50. Tag der Trächtigkeit zu erkennen. Ein erster deutlicher Anstieg der Konzentration in der Milch fiel mit dem beim Blut beobachteten Anstieg um den 150. Tag zusammen, ab diesem Zeitpunkt erreichte die Mehrzahl der analysierten Milchproben eine PAG-Konzentration von mehr als 1,0ng/ml. Im Verlauf der Trächtigkeit wurde ein messbarer mittlerer Konzentrationsanstieg in der Milch trächtiger Tiere

nachgewiesen. Aufgrund der beobachteten starken individuellen Variation war eine eindeutige Trennung zwischen trächtigen und nicht trächtigen Tieren erst nach dem 200. Tag bei Überschreiten einer Konzentration von 1,2ng/ml möglich.

Die Entwicklung der PAG-Konzentration in der Milch trächtiger Kühe zeigte einen der Blutkonzentration ähnlichen Verlauf, jedoch auf deutlich geringerem Niveau. Die gemessenen Konzentrationen in der Milch stimmen mit den von METELO et al. (2004) und GAJEWSKI et al. (2005) mittels RIA nachgewiesenen Konzentrationen überein. Zwischen den PAG-Konzentrationen in Milch und Blut wurde eine signifikante positive Korrelation ( $r=0,81$ ;  $p<0,01$ ) nachgewiesen.

Um die für die Milchbildung erforderliche Menge an Proteinen synthetisieren zu können, verfügen die Epithelzellen der Milchdrüse über einen sehr effizienten Proteinmetabolismus. Aus den meisten von den Zellen aufgenommenen Serumproteinen werden in Milchproteine umgewandelt. Etwa 92% der Milchproteine werden von den Epithelzellen der Milchdrüse synthetisiert, während die verbleibende Menge hauptsächlich aus bovinem Serumalbumin (BSA) und Immunglobulinen (IgG) besteht, die durch transzelluläre Mechanismen in die Milch gelangen (BEQUETTE et al., 1998). Da höhere PAG-Konzentrationen in der Milch erst kurz vor der Geburt auftreten, wenn auch die "tight junctions" zwischen den Drüsenepithelzellen für die Passage verschiedener Plasmaproteine geöffnet sind (PEAKER, 1974), liegt die Vermutung nahe, dass der Großteil des aufgenommenen PAG von den Milchdrüsenepithelzellen verstoffwechselt wird und nur geringe Mengen auf transzellulärem Weg in die Milch gelangen. Dies wird auch durch den geringen PAG-Anteil in der Milch von etwa 3% der Blutkonzentration bestätigt.

Auffällig bei dem Konzentrationsverlauf in der Milch waren zwei Proben mit minimalen Konzentrationen um den 200. Tag und zwei Proben mit deutlich erhöhten Konzentrationen vor dem 50. Tag der Trächtigkeit. Die niedrigen Konzentrationen in der Milch sowie die bei der Betrachtung der Einzelprofile erkennbare Fluktuation in der Konzentration könnte auf mögliche Verunreinigungen während der Probennahme oder eine fehlerhafte Lagerung zurückzuführen sein. In einer der Proben (d40) war nach der Zentrifugation eine deutliche Kontamination mit Schmutz zu erkennen, was sich trotz der Bemühung Milchproben nur aus sauberen und klinisch gesunden Vierteln zu entnehmen, nicht vollständig ausschließen ließ. Die Proben wurden nach

der Entnahme zwar schnellstmöglichst bei +4°C gelagert und nach Beendigung des Melkens bei -20°C tiefgefroren, doch ein Effekt der Tagestemperaturen während des Transports vom Melkraum bis zur Lagerung konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Inwieweit auch die Milchleistung der Tiere sowie die konkrete Zusammensetzung der Milch einen Einfluss auf die PAG-Konzentration haben kann, wurde nicht untersucht.

### **5.3 Trächtigkeitsdiagnose mittels PAG-Nachweis**

Die Bestimmung der PAG-Konzentration als diagnostisches Hilfsmittel für den Nachweis einer Trächtigkeit ist bei Rind (SASSER et al., 1986; MIALON et al., 1994; ZOLI et al., 1992b; GREEN et al., 2005), Schaf (ZOLI et al., 1990) und Ziege (GONZÁLES et al., 1999) beschrieben. Die Sicherheit des PAG-Tests wurde von SZENCI et al. (1998) mit verschiedenen Verfahren der Trächtigkeitsbestimmung verglichen. Im Vergleich zu den Ergebnissen einer späteren rektalen Untersuchung wurden anhand der PAG-Konzentration bis zu 30% falsch positive Diagnosen gestellt. Die Ursachen der fehlerhaften Diagnosen sind zum einen auf die lange Halbwertszeit des PAG und zum anderen auf das Auftreten von embryonalem Fruchttod zurückzuführen.

Um die Aussagesicherheit des PAG-ELISA zu ermitteln wurde ein Vergleich mit zwei anderen Methoden der Trächtigkeitsbestimmung vorgenommen, der rektalen manuellen und ultrasonographischen Untersuchung. Diese wurden entweder zeitgleich mit der Blutentnahme oder zu einem späteren Termin durchgeführt. Die Bestimmung der PAG-Konzentration erfolgte anhand einer aus der Schwanzvene entnommenen Blutprobe. Nach KIRACOFÉ et al. (1993) besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der PAG-Konzentration mehrmals täglich entnommener Blutproben. Der Wert einer einzelnen Probe wurde als repräsentativ für die PAG-Konzentration im Blut am Tag der Entnahme angenommen.

#### **Ultrasonographische Untersuchung**

Bei 38 Tieren erfolgte die Entnahme einer Blutprobe im Anschluss an eine ultrasonographische Untersuchung am 28. Tag nach der Besamung. Tiere mit einem erkennbaren fetalem Herzschlag wurden als trächtig eingestuft (GIGER, 1995). Die

durchschnittliche PAG-Konzentration im Blut 24 trächtiger Kühe lag bei  $4,0 \pm 1,8$  ng/ml, die 14 nicht trächtiger Tiere bei  $1,1 \pm 0,6$  ng/ml. Nur bei einem nicht trächtigen Tier wurde mit 2,24 ng/ml der Grenzwert von 2,0 ng/ml überschritten. Die erhöhte Konzentration kann auf einen frühen embryonalen Fruchttod zurückzuführen sein, nach welchem die PAG-Konzentration innerhalb von 4-8 Tagen auf basales Niveau abfällt (SZENCI et al., 2003) oder durch eine erhöhte Basalkonzentration erklärt werden, die bei bis zu 20% der nicht trächtigen Tiere auftritt. Laut ZOLI et al. (1992b) erreichen nichtträchtige Rinder maximale Basalkonzentrationen von 0,5 ng/ml, Bullen bis zu 3,0 ng/ml. Demnach ist der erhöhte Wert eher auf einen Fruchttod als auf eine erhöhte Basalkonzentration zurückzuführen. Der geringste gemessene Wert eines trächtigen Tieres betrug 2,48 ng/ml, lag also deutlich über den von ZOLI et al. (1992b) und SZENCI et al. (2003) angegebenen Grenzwerten von 0,5 ng/ml bzw. 0,8 ng/ml. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass eine Trächtigkeit vorliegt, wenn die PAG-Konzentration am 28. Tag einen Wert von mindestens 2,5 ng/ml erreicht.

### **Rektale Untersuchung**

Bei 274 Tieren wurde zwischen dem 20. und 50. Tag nach KB eine Blutprobe entnommen. Die anhand der nachgewiesenen PAG-Menge gestellte Trächtigkeitsdiagnose wurde mit den Ergebnissen einer rektalen Untersuchung verglichen, die nicht vor dem 50. Tag der Trächtigkeit durchgeführt wurde. Nach AHLERS und ANDRESEN (1997) ist eine sichere Trächtigkeitsdiagnose auch bei älteren Tieren anhand einer Asymmetrie der Uterushörner, einer fühlbaren Fluktuation, sowie dem Gegenstoßen der Frucht ab der 9. Woche möglich. Sichere Anzeichen einer Trächtigkeit wurden bei 187 der Kühe festgestellt, während bei 87 Tieren die rektale Untersuchung keinerlei Zeichen einer Trächtigkeit ergab. Bei 177 Kühen mit einer PAG-Konzentration von 2,0 ng/ml oder mehr wurden in 95,5% der Fälle bei der rektalen Untersuchung sichere Anzeichen einer Trächtigkeit festgestellt. Bei 18,5% der Tiere ( $n=18$ ) mit einer Konzentration von weniger als 2,0 ng/ml ( $n=97$ ) wurden in der rektalen Untersuchung deutliche Anzeichen für das Vorliegen einer Trächtigkeit festgestellt. Die Konzentration dieser Tiere lag in 10 Fällen zwischen 1,5 und 2,0 ng/ml und bei 8 Tieren sogar unter 1,5 ng/ml. Die Entnahme der Blutprobe erfolgte bei 14 Tieren vor dem 30. Tag, bei 3 Tieren bis zum 34. Tag und bei einem Tier am 48. Tag nach der KB. Dies stimmt mit den in der Literatur (SASSER et al.,

1986; ZOLI et al., 1992b; SZENCI et al., 1998) beschriebenen Konzentrationsverläufen überein, nach welchen messbare PAG-Konzentrationen mitunter erst nach dem 34. Tag der Trächtigkeit auftreten.

### **Abermaliger PAG-Test**

Bei 110 Tieren wurde im Anschluss an die 1. PAG-Bestimmung im Abstand von 4 Wochen eine weitere Analyse durchgeführt. In dieser musste auch bei trächtigen Tieren mit verzögertem PAG-Anstieg eine erhöhte Konzentration festzustellen sein (ZOLI et al., 1992b; SZENCI et al., 1998). In 92% der Fälle mit erhöhter PAG-Konzentration ( $>2,5\text{ng/ml}$ ) in der ersten Probe ließ sich auch in der nachfolgenden Probe eine erhöhte Konzentration nachweisen. Wurde die 1. Probe vor dem 30. Tag der Trächtigkeit gezogen, wurde bei 50% der Tiere mit einer PAG-Konzentration von bis zu  $2,0\text{ng/ml}$  in der ersten Probe wurde in der 2. Probe eine Trächtigkeit, also eine erhöhte Konzentration festgestellt. Erfolgte die 1. Probe zwischen dem 31. und 35. Tag wurde bei zwei Tieren in der späteren Probe ein Anstieg in der PAG-Konzentration festgestellt. Obwohl in der 2. Probe die PAG-Konzentration dieser Tiere deutlich erhöht war ( $>2,5\text{ng/ml}$ ), wiesen sie in der ersten Probe nur eine niedrige Konzentration ( $<2,0\text{ng/ml}$ ) auf. Die Erklärung für die falsch negativ erkannten Tiere kann in dem von SZENCI et al. (1998) beobachteten verzögerten PAG-Anstieg einiger Tiere liegen, welche erst nach dem 34. Tag nachweisbare PAG-Konzentrationen im Blut aufwiesen.

Ein Absinken der PAG-Konzentration von der 1. zur 2. Blutprobe wurde bei insgesamt 17 Kühen festgestellt. Bei 5 Tieren fiel die Konzentration der 2. Probe auf weniger als  $2,5\text{ng/ml}$ . Die übrigen 12 Tiere hatten zwar eine deutlich geringere Konzentration in der 2. Probe, doch der gemessene Wert lag noch oberhalb des Grenzwerts ( $2,5\text{ng/ml}$ ). Das Absinken der Konzentration zu Beginn der Trächtigkeit kann auf eine Restkonzentration der vorangegangenen Trächtigkeit (ZOLI et al., 1992b) zurückzuführen sein oder durch einen embryonalen Fruchttod (HUMBLOT, 1988b) ausgelöst werden, der zwischen der Entnahme der beiden Proben eingetreten ist. BREUKELMANN et al. (2005b) beobachteten bereits wenige Stunden nach einem induzierten Fruchttod ein Absinken der PAG-Konzentration. Nach spätestens 7 Tagen erreichte diese wieder basales Niveau. Eine weitere Erklärung für das Absinken der PAG-Konzentration stellt der von PERÉNYI (2002) beschriebene PAG-Peak um den 30. Tag der Trächtigkeit dar. Bei Einzeltieren

wurden Konzentrationen von bis zu 17ng/ml gemessen, die anschließend wieder auf Werte von knapp über 2ng/ml abfielen.

Ein Abfall in der Konzentration nach dem 30. Tag der Trächtigkeit kann in jedem Fall erst beim Erreichen des basalen Niveaus als sicheres Zeichen für einen tatsächlich erfolgten Abbruch der Trächtigkeit interpretiert werden.

### **Zusammenfassung der unterschiedlichen Methoden**

Der Verlauf der PAG-Konzentration zwischen dem 20. und 50. Tag der Trächtigkeit ist identisch zu dem von ZOLI et al. (1992b) beschriebenen. Ein erster Anstieg der Konzentration war ab dem 20. Tag der Trächtigkeit zu erkennen. Die mittlere Konzentration nicht trächtiger Kühe (n=130) lag bei  $1,1 \pm 0,5$ ng/ml und ist deutlich höher als die in der Literatur angegebenen Werte von  $0,1 \pm 0,4$ ng/ml (GREEN et al., 2005) und  $0,5 \pm 0,2$ ng/ml (ZOLI et al., 1992b). Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Wert wurde aus den Konzentrationen der Tiere errechnet, bei denen in einer zweiten Untersuchung keine Anzeichen einer Trächtigkeit feststellbar waren. Da die 2. Untersuchung bei einem Großteil der Tiere bis zu 4 Wochen nach der Blutentnahme erfolgte, ist es sehr wahrscheinlich, dass bei der Berechnung des Mittelwertes auch trächtige Tiere mit einem nach der Blutentnahme erfolgtem embryonalem Fruchttod berücksichtigt wurden. Die erkennbaren Unterschiede der mittleren Konzentration zwischen trächtigen und nicht trächtigen Tieren am 18. und 23. Tag nach der KB gehen auf zwei Einzeltiere mit stark erhöhten Konzentrationen zurück.

Als Grenzwerte für die Trächtigkeitsdiagnose des PAG-RIA werden in der Literatur 0,5ng/ml (ZOLI et al., 1992b) und 0,8ng/ml (SZENCI et al., 1998) angegeben. SZENCI et al. (1998) geben für dem erhöhten Grenzwert eine Sicherheit der Trächtigkeitsbestimmung (Sensitivität) ab dem 30. Tag von 95% an, während nicht trächtige Tiere nur in 70 bis 79% der Fälle korrekt erkannt wurden. Die Aussagesicherheit des RIA für die Diagnose *Trächtig* lag bei 77%, die der Diagnose *Nicht trächtig* bei 95%. Für den Sandwich-ELISA (GREEN et al., 2005) wurde ein Grenzwert von 0,9ng/ml angegeben. Die Festsetzung dieses Grenzwertes beruht auf den gemessenen PAG-Konzentrationen von 42 trächtigen Tieren, von denen der angegebene Grenzwert ab dem 28. Trächtigkeitstag nicht mehr unterschritten wurde.

Sensitivität und Verlässlichkeit der Trächtigkeitsdiagnose mittels Sandwich-ELISA wurden nicht angegeben.

Die in der Literatur beschriebene nur mäßig verlässliche Erkennungsrate nicht trächtiger Tiere bei einem festgesetzten Grenzwert stellte uns vor die Frage, ob die Einführung eines weiteren Grenzwertes die Aussagesicherheit des ELISA erhöhen könnte. Aus diesem Grund wurden Sicherheit und Verlässlichkeit bei verschiedenen Grenzwerten zu verschiedenen Zeiten der Trächtigkeit getestet.

Lag die PAG-Konzentration über 2,0ng/ml, wurde, unabhängig von der Zeit nach der Besamung, in mehr als 94% der Fälle eine Trächtigkeit durch die nachfolgende Untersuchung bestätigt, während bei Konzentrationen von mehr als 1,5ng/ml bis zu 13% falsch positive Diagnosen gestellt wurden. Ab dem 31. Tag nach KB wurde bei 97% der Tiere eine Trächtigkeit festgestellt, wenn im Blutserum mindestens 2,0ng/ml nachgewiesen worden waren. Dieser Anteil stieg bei einem Grenzwert von 2,5ng/ml auf 98,1% an. Dies entsprach einem Anteil falsch positiver Diagnosen von 3 bzw. 1,9%. In der von ZOLI et al. (1992b) durchgeführten Untersuchung betrug der Anteil falsch positiver Diagnosen bei einem Grenzwert von 0,5ng/ml 6,9%. SZENCI et al. (1998) wiesen in der Zeit vom 30. bis 50. Tag nach der Besamung einen Anteil falsch positiver Diagnosen von 20 bis 30% nach. Führen dies aber auf einen hohen Anteil frühzeitig wiederbelegter Tiere und das Auftreten von embryonalem Fruchttod zurück.

Der Anteil korrekt negativ gestellter Diagnosen dagegen nahm mit zunehmendem Grenzwert ab. Lag die Konzentration ab dem 31. Tag der Trächtigkeit unter 1,5ng/ml bzw. 2,0ng/ml wurden bei 94% bzw. 93% der Tiere auch in der späteren Untersuchung keine Anzeichen einer Trächtigkeit festgestellt, sank der Anteil bei einem Grenzwert von 2,5ng/ml auf 79% ab, was einem Anteil falsch negativer Diagnosen von 21% entsprach. Sichere Anzeichen einer Trächtigkeit liegen demnach vor, wenn die PAG-Konzentration einer Serumprobe einen Wert von 2,0ng/ml erreicht. Da die PAG-Konzentration vom 26. bis zum 50. Tag auf ähnlichem Niveau bleibt und teilweise sogar wieder absinkt, kann in diesem Zeitraum keine Aussage über die Dauer der vorliegenden Trächtigkeit anhand der Konzentration getroffen werden.

Der für den ELISA ermittelte optimale Grenzwert von 2,0ng/ml lag über den von ZOLI et al. (1992b) und SZENCI et al. (1998) angegebenen Werten von 0,5 bzw. 0,8ng/ml. Dies könnte zum einen auf unterschiedliche Bindungseigenschaften des ELISA, zum anderen auf nicht erkannte frühembryonale Verluste zurückgehen, deren Konzentration bei der Berechnung der Sensitivität mit eingeflossen sind. HENNIES (1994) beschrieb eine Reduzierung von Störeffekten bei der Verwendung geringerer Mengen an Blutserum im Probenvolumen. Anhand der erstellten Verdünnungsreihen von Serum und Testpuffer wurden optimale Verläufe bei der Verwendung von 50% Blutserum im Probenvolumen beobachtet. Verschiedene im Blutserum enthaltene Substanzen wie Antikörper oder Hormone könnten durch Kreuzreaktion mit den spezifischen Antikörpern Störeffekte im unteren Messbereich verursachen. Da ZOLI et al. (1992b) allerdings nur geringe Kreuzreaktionen mit anderen im Blutserum enthaltenen Stoffen nachweisen konnten, ist dies nur bedingt als Erklärung des höheren Grenzwertes anzusehen.

Die konkreten Ursachen für die falsch positiven Diagnosen im Rahmen dieser Arbeit konnten nicht ermittelt werden, da bei den Tieren keine kontinuierliche Überwachung der Trächtigkeit, beispielsweise durch regelmäßige Ermittlung der Progesteronkonzentration oder ultrasonographische Untersuchungen, erfolgte und zwischen der Entnahme der Blutprobe für den PAG-Test und der späteren Trächtigkeitsuntersuchung ein Zeitraum von mindestens 3 Wochen lag, die ultrasonographische Untersuchung ausgenommen. Ein embryonaler Fruchttod zwischen dem 24. und 50. Tag tritt laut HUMBLLOT (2001) bei 17% der befruchteten Tiere auf. Es wird vermutet, dass die erhöhte PAG-Konzentration der falsch positiv erkannter Tiere entweder auf einen embryonalen Fruchttod zurückzuführen ist, der mit einem verzögerten Absinken der PAG-Konzentration (SZENCI et al., 2000ab, BREUKELMANN, 2005b) einhergeht oder mit dem bis zu 100 Tage post partum dauernden Abfall der PAG-Konzentration (ZOLI et al., 1992b) zusammenhängt, bevor diese wieder basales Niveau erreicht.

Eine Überprüfung dieser Ursachen wäre nur bei täglicher Blutentnahme und der Bestimmung von Progesteron und PAG bis zum Zeitpunkt der Trächtigkeitsuntersuchung möglich (HUMBLLOT, 2001). Nach TAVERNE et al. (2002) liegt der

Anteil an erkannten Trächtigkeitsverlusten anhand eines signifikanten Abfalls der Progesteronkonzentration mit 56 - 77% deutlich höher als der durch ein Absinken der PAG-Konzentration (14-32%). Eine Kombination der beiden Methoden würde bei einer kontinuierlichen Probenentnahme zu Erkennungsraten zwischen 70 und 99% führen.

Das Auftreten falsch negativer Diagnosen bei unterschreiten einer Konzentration von 2,0ng/ml trat ab dem 31. Tag nach der Besamung in 7% der Fälle auf. Die mittlere PAG-Konzentration ( $\pm$ SD) der nach dem 31. Tag falsch negativ erkannten Tiere lag bei  $1,25 \pm 0,14$ ng/ml. Ein Absinken auf 0% konnte erst ab dem 44. Tag beobachtet werden. Eine höhere Sicherheit der Aussage *Nicht trächtig* würde sich demnach bei einem Grenzwert von 1,5ng/ml ergeben, wodurch sich der Anteil falsch positiv erkannter Tiere erhöhen würde. Bei ZOLI et al. (1992b) lag der Anteil falsch negativer Diagnosen bei einem Grenzwert von 0,5ng/ml lediglich bei 2,1%, während SZENCI et al. (1998) bis zu 5% (Tag 34) falsch negative Diagnosen nachwiesen. Eine Erklärung für das Auftreten falsch negativer Diagnosen ist auf einen verzögerten Anstieg der PAG-Konzentration zurückzuführen, der bei bis zu 3,5% der Tiere erst nach dem 30. Tag und mitunter auch bis zum 42. Tag erfolgt (SZENCI et al., 1998; PERÉNYI, 2002). Der Anteil Tiere mit einem Anstieg nach dem 34. Tag wird in der Literatur mit etwa 1% angegeben (SZENCI et al., 1998). Aufgrund dieser geringen Anzahl ist der Einsatz des PAG-Tests zur Trächtigkeitsdiagnose ab dem 30. Tag nach erfolgter Belegung gerechtfertigt.

Die Anzahl der tatsächlichen Abkalbungen als finaler Trächtigkeitsbeweis konnte nicht für alle Tiere ermittelt werden, da viele bei Fertigstellung der statistischen Auswertung noch nicht abgekalbt hatten. Da mögliche Aborte, Frühgeburten oder abgegangene Tiere das Ergebnis außerdem verfälschen könnten, wurden die vorliegenden Abkalbedaten in der Auswertung nur zur Bestätigung der erfolgten Trächtigkeitsuntersuchung verwendet und in der statistischen Auswertung nicht separat betrachtet.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und den Erfahrungen der PAG-Bestimmung mittels Radioimmunoassay muss schlussgefolgert werden, dass eine verlässliche Trächtigkeitsdiagnose oft nicht an einem einzelnen Grenzwert festgemacht werden

kann. Sichere Diagnosen für trächtige Tiere können mittels PAG-ELISA ab dem 30. Tag gestellt werden, wenn die gemessene Konzentration einer Serumprobe mehr als 2,0ng/ml beträgt. Bei Konzentrationen von weniger als 1,0ng/ml ist die Verlässlichkeit der Aussage *Nicht-trächtig* am höchsten. Liegt die Konzentration einer Probe zwischen 1,0 und 2,0ng/ml kann der Trächtigkeitsstatus des Tieres nicht eindeutig bestimmt werden, wobei Kühe mit mehr als 1,5ng/ml in den meisten Fällen trächtig und Kühe mit weniger als 1,5ng/ml eher nicht trächtig sind.

Die Vergleiche mit ultrasonographischer oder rektaler Untersuchung in der vorliegenden Arbeit zeigten deutlich, dass es für den entwickelten ELISA keinen eindeutigen Grenzwert zur Unterscheidung zwischen trächtigen und nicht trächtigen Tieren gibt und die Verwendung eines Bereichs mit fraglichen Diagnosen empfehlenswert ist.

## 6. Zusammenfassung

Während der Trächtigkeit beim Rind werden in der Plazenta verschiedene Stoffe synthetisiert und durch komplexe Mechanismen an die Mutter abgegeben. Zu diesen Stoffen zählt auch eine Gruppe von sauren Glykoproteinen, den "pregnancy-associated glycoproteins" (PAGs), die in derart großen Mengen gebildet werden, dass sie im Blut und auch in der Milch der Mutter nachweisbar sind und als Indikator für das Vorliegen einer Trächtigkeit genutzt werden können.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein quantitatives enzymimmunologisches Nachweisverfahren für das bovine PAG-1 zu etablieren und zu prüfen, ob und ab wann sein Nachweis als sicheres Zeichen einer Trächtigkeit angesehen werden kann. Bei dem enzymimmunologischen Verfahren handelte es sich um einen kompetitiven Test auf der Basis der Doppelantikörpermethode (ELISA). Die Entwicklung des Nachweisverfahrens wurde in folgende Schritte unterteilt:

- Etablierung eines ELISA zu Bestimmung von PAG im Blut
- Adaption des ELISA für den Nachweis von PAG in der Milch
- Erstellung von PAG-Profilen in Blut und Milch trächtiger Kühe
- Prüfung des PAG-ELISA auf Eignung zur Trächtigkeitsdiagnose.

Mit der Etablierung eines spezifischen PAG-ELISA sollte eine Alternative zu den bislang verwendeten radioimmunologischen Nachweisverfahren (RIA) geschaffen werden. Die im ELISA verwendeten PAG-Antiseren, sowie das für die Herstellung eines biotinmarkierten Tracers erforderliche gereinigte PAG waren identisch zu den im RIA verwendeten Stoffen und wurden uns von Prof. Beckers (ULG, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Korrelation von ELISA und RIA wurde anhand 187 Proben ermittelt und lag betrug  $r=0,96$  ( $p<0,01$ ). Variationskoeffizienten (CV) und Wiederfindungsraten (RR) des ELISA wurden für den Messbereich von 0,4 bis 12,5ng/ml errechnet, nach welchen der ELISA geeignet ist, minimale PAG-Konzentration in einer Milch- oder Serumprobe während der Trächtigkeit nachzuweisen. Der Intraassay-CV des ELISA betrug in Abhängigkeit von der Konzentration 2-14% für Blutserum und 10-12% für Magermilch, der entsprechende

Interassay-CV betrug zwischen 8-22% (Serum) und 12-22% (Milch). Die untere Nachweisgrenze beider Assays lag bei 0,4ng/ml.

Zur Darstellung von PAG-Verlaufsprofilen während der Trächtigkeit wurde in regelmäßigen Abständen Blut- und Milchproben von 10 trächtigen Kühen entnommen und ihr PAG-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Die erstellten PAG-Profile zeigten den in der Literatur beschriebenen typischen Verlauf, mit einer zunächst stufenweise ansteigenden Konzentration während der frühen Trächtigkeit und einem massiven Anstieg in den letzten Tagen vor der Geburt. Die Konzentration in der Milch wies eine signifikante Korrelation ( $r=0,81$ ;  $p<0,01$ ) zu den im Blut gemessenen Werten auf, verlief insgesamt jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau, lediglich zwischen 3 und 8% der ermittelten Serum-Konzentration, wonach ein Trächtigkeitsnachweis anhand einer Milchprobe nicht vor dem 150. Tag möglich ist.

Nach der abgeschlossenen Entwicklung des Assays, sollte untersucht werden, ab wann und mit welcher Sicherheit der PAG-ELISA als Trächtigkeitstest beim Rind genutzt werden kann. Hierzu wurden von 400 Kühen eine Blutprobe zwischen dem 20. und 50. Tag nach der Besamung genommen und mittels ELISA analysiert. Der Trächtigkeitsstatus der Tiere wurde anschließend durch rektale oder ultrasonographische Untersuchung oder eine weitere PAG-Probe festgestellt. Für die gemessene PAG-Konzentrationen wurden Tages- und Wochenmittelwerte der untersuchten Tiere berechnet. Ein signifikanter Unterschied ( $p<0,01$ ; Dunnett-t-Test) in der PAG-Konzentration trächtiger und nicht trächtiger Tiere wurde ab dem 23. Tag, ein hochsignifikanter Unterschied ( $p<0,001$ ; Dunnett-t-Test) ab dem 28. Tag nach der Besamung nachgewiesen. Nach dem 30. Tag nach der Belegung wurden 94%, ab dem 40. Tag sogar 99% aller Tiere mittels PAG-Test als korrekt trächtig oder nicht trächtig erkannt. Eine mögliche Erklärung für falsch gestellte Diagnosen könnte das Auftreten eines embryonalem Fruchttodes zwischen dem Tag der PAG-Analyse und der späteren Trächtigkeitsuntersuchung der Tiere sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der bPAG-1 ELISA eine sichere und verlässliche Möglichkeit zur Messung der PAG-Konzentration einer Milch- oder Serumprobe darstellt und eine Trächtigkeitsdiagnose bei Kühen und Färsen ab dem 30. Tag nach der Besamung anhand einer Serumprobe gestattet.

## 7. Summary

In ruminants during pregnancy various substances are expressed by the placenta and delivered to the maternal side. A group of aspartic proteinases, called "pregnancy associated glycoprotein" (PAG), synthesized primarily by giant trophoblast cells, may be detected in maternal blood serum and milk. The occurrence of PAG in the blood serum of cows can be utilised to diagnose pregnancy.

The aim of the present study was to develop a reliable quantitative enzyme immunoassay for bovine PAG (bPAG1) and test its applicability for early pregnancy diagnosis in cattle. Based on earlier experience with enzyme double antibody immunoassays (ELISA) established in our laboratory, the development proceeded in four steps:

- Establishment of an ELISA for measuring bPAG1 in maternal blood serum
- Adaptation of the assay for measuring PAG in milk
- PAG-profiles during pregnancy in blood serum and milk of pregnant cows
- Suitability of the PAG-ELISA for early pregnancy diagnosis.

The PAG-ELISA established in our laboratory proved to be a satisfactory alternative to the radioimmuno assay (RIA) developed by Prof. JF Beckers (ULG, Belgium) used so far. An ELISA may be performed in almost any laboratory without the necessity of radioactive markers and costly special equipment. The required antisera and purified bPAG1 were donated by Prof. Beckers.

The ELISA was validated by comparison with an established RIA. In serum the correlation between RIA and ELISA amounted to  $r=0,97$  ( $p<0,01$ ). Determination of the coefficient of variation (CV) and recovery rates was done in the range of 0,4 to 12,5ng/ml. The detection limit for both assays was 0.4ng/ml. The intraassay coefficients of variation were 2-14% for serum and 10-12% for milk, the corresponding interassay CV's were 8-22% and 12-22%, respectively.

PAG profiles in blood and milk from 10 pregnant cows were established. Serum profiles were in close agreement with those monitored by RIA. In the course of pregnancy the serum concentration of PAG increased steadily to reach maximum

levels around parturition. In case of embryonic or foetal mortality the serum PAG concentration decreased rapidly. The correlation between the PAG concentration in milk and serum amounted to  $r=0,81$  ( $p<0,01$ ), though the concentration in milk was only 3 to 8% of that measured in serum. Due to the low concentration a reliable pregnancy diagnosis in milk is only feasible from 150 days after insemination onward.

To assess the reliability of a pregnancy diagnosis based on serum PAG, blood samples were collected from 400 cows between days 20 and 50 after insemination. Pregnancy was also diagnosed by manual or ultrasonographic rectal examination or by a second PAG sample taken 4 weeks later. For all pregnant and non-pregnant animals one- and 5-day PAG means were calculated from day 20 to 50. A significant difference ( $p<0,01$ ; Dunnett-t-Test) between pregnant and non pregnant animals was recorded at 23 days of pregnancy, a highly significant difference ( $p<0,001$ ; Dunnett-t-Test) at 28 days. Thirty days after insemination, 94% and after 40 days 99% of all cows were reliably classified as either pregnant or non pregnant. A possible explanation for incorrect diagnoses could be embryonic mortality occurring between PAG testing and the subsequent second pregnancy examination.

In summary, the bPAG-1 ELISA proved to be a viable alternative to the RIA as a means of measuring PAG concentrations in serum and may also be used for measuring PAG in milk. The serum PAG concentration may serve as a reliable means of pregnancy detection in cows and heifers from day 30 after insemination onward.

## 8. Literaturverzeichnis

- ABBITT, B., BALL, L., KITTO, G.P., SITZMAN C.G., WILGENBURG B., RAIM L.W. SEIDEL G.E. (1978): Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 973 - 977.
- AHLERS, D. (1999): Forensik. In: Grunert, E. und A. de Kruif (Hrsg.): *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. 3. Aufl. Parey Buchverlag, Berlin, 397 - 416.
- AHLERS, D., ANDRESEN, P. (1997): Trächtigkeit. In: Grunert, E. (Hrsg.): *Buiatrik, Band 1, Euterkrankheiten, Geburtshilfe und Gynäkologie, Andrologie und Besamung*. 5. Aufl. Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 99 - 127.
- ALICHANIDIS, E., WRATHALL, J.H., ANDREWS, A.T. (1986): Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. *J. Dairy Res.* 53 (2), 259 - 269.
- AURICH, J.E. (1999): Embryonale Mortalität. In: Grunert, E. und A. de Kruif (Hrsg.): *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. 3. Aufl. Parey Buchverlag, Berlin, 255 - 262.
- AUSTIN K.J., KING C.P., VIERK J.E., SASSER R.G., HANSEN T.R. (1999): Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. *Endocrinology* 140 (1), 542 - 545.
- AYALON, N. (1978): A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54, 483 - 493.
- BALL, L., CAROLL E.J., (1963): Induction of fetal death in cattle by manual rupture of the amniotic vesicle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 142, 373 - 374.
- BAXTER, S.J., WARD, W.R. (1997): Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. *Vet. Rec.* 140, 287 - 288.
- BAZER, F.W., GEISERT, R.D., ZAVY, M.T. (1993): Fertilization, Cleavage and Implantation. In: HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. (2000): *Reproduction in farm animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
- BAZER, F.W., SPENCER T.E., OTT, T.L. (1997): Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am. J. Reprod. Immunol.* 37 (6), 412 - 420.
- BEAL, W.E., PERRY, R.C., CORAH, L.R. (1992): The Use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 924-929
- BECKERS, J.F., WOUTERS-BALLMAN, P., ECTORS, F. (1988): Isolation and radioimmunoassay of a bovine pregnancy specific protein. *Theriogenology* 29 (1), 219.

- BECKERS, J.F., ZARROUK, A., BATLHA, E.S., GARBAYO, J.M., SZENCI, O., MESTER, L. (1998): Endocrinology of pregnancy: chorionic somatomammotropins and pregnancy-associated glycoproteins: Review. *Acta. Vet. Hung.*, 46 (2), 175 - 189.
- BECKERS, J.F., DRION, P.V., GARBAYO, J.M., PERENYI, Z., ZARROUK, A., SULON, J., REMY, B., SZENCI, O. (1999): Pregnancy associated glycoproteins in ruminants: inactive members of the aspartic proteinase family. *Acta. Vet. Hung.*, 47 (4), 461 - 469.
- BELLOWS, R. A., RUMSEY, T. S., KASSON, C. W., BOND J., WARWICK, E.J., PAHNISH, O.F. (1975): Effects of organic phosphorus systemic insecticides on bovine embryonic survival and development. *Am. J. Vet. Res.* 36, 1133 - 1140.
- BEQUETTE B.J., BACKWELL F.R., CROMPTON L.A. (1998): Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. Review. *J. Dairy Sci.* 81 (9), 2540 - 2559.
- BIEBER, F. (1990): Biotinylierung monoklonaler Antikörper. In: *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*. Peters, J.H. und Baumgarten, H. (Hrsg.), 2. Aufl. Springer - Verlag Berlin, 299 - 302.
- BOISGARD, R., CHANAT, E., LAVIALLE, F., PAULOIN, A., OLLIVIER-BOUSQUET, M. (2001): Roads taken by milk proteins in mammary epithelial cells. *Livestock Prod. Sci.* 70, 49 - 61.
- BREUKELMAN, S.P., PERÉNYI, Z., DE RUIGH, L. VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M., JONKER, F.H., VERNOOIJ, J., BECKERS, J.F., VAN DER WEIJDEN, G.C., VOS, P., DIELEMAN S.J., TAVERNE, M.A.M. (2005a): Plasma concentrations of bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG) do not differ during the first 119 days between ongoing pregnancies derived by transfer of in vivo and in vitro produced embryos. *Theriogenology* 63 (5), 1378 - 1389.
- BREUKELMAN, S.P., SZENCI, O., BECKERS, J.F., KINDAHL, H., MULDER, E.J., JONKER, F.H., VAN DER WEIJDEN, B., REVY, D., POGANY, K., SULON, J., NEMEDI, I., TAVERNE, M.A.M. (2005b): Ultrasonographic appearance of the conceptus, fetal heart rate and profiles of pregnancy-associated glycoproteins (PAG) and prostaglandin F<sub>2</sub>α-metabolite (PGF<sub>2</sub>α-metabolite) after induction of fetal death with aglepristone during early gestation in cattle. *Theriogenology* 64 (4), 917 - 933.
- BUTLER, J.E., HAMILTON, W.C., SASSER, R.G., RUDER, C.A., HASS, G.M., WILLIAMS, R.J. (1982): Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.* 26 (5), 925 - 933.
- CHARD, T. (1989): *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*. 3rd. Edn., Elsevier, Amsterdam.

- CHEN, X., ROSENFELD, C.S., ROBERTS, R.M., GREEN, J.A. (2001): An aspartic proteinase expressed in the yolk sac and neonatal stomach of the mouse. *Biol. Reprod.* 65(4), 1092 - 1100.
- CROWTHER, J.R. (2000): The ELISA guidebook. *Methods Mol. Biol.* 149, III-IV. Humana Press Totrowa, New Jersey, USA.
- CURRAN, S., PIERSON R.A., GINTHER, O.J. (1986): Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189 (10), 1295 - 1302.
- DAS, M., MUKHOPADHYAY, P.K., CHOWDHURY, M. (1994): Carbohydrate-binding profile of a pregnancy-associated rat uterine glycoprotein. *Mol. Cell Biochem.* 137, 91-99.
- DEL VECCHIO, R.P., SASSER, R.G., RANDEL, R.D. (1990): Effect of pregnancy-specific protein B on prostaglandin F2 alpha and prostaglandin E2 release by day 16-perfused bovine endometrial tissue. *Prostaglandins* 40 (3), 271 - 282.
- DEL VECCHIO R.P., SUTHERLAND W.D., SASSER R.G. (1995a): Effect of pregnancy-specific protein B on luteal cell progesterone, prostaglandin, and oxytocin production during two stages of the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 73 (9), 2662 - 2668.
- DEL VECCHIO, R.P., SUTHERLAND, W.D., SASSER, R.G. (1995b): Prostaglandin F2 alpha, progesterone and oxytocin production by cultured bovine luteal cells treated with prostaglandin E2 and pregnancy-specific protein B. *Prostaglandins* 50 (3), 137 - 150.
- DEMMERS, K.J., DERECKA, K., FLINT, A. (2001): Trophoblast Interferon and pregnancy. *Reprod.* 121, 41-49.
- DOSOGNE, H., BURVENICH, C., FREEMAN, A.E., KEHRLI, M.E. Jr., 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 (1), 47 - 54.
- DOSOGNE, H., MASSART-LEEN, A.M., BURVENICH, C. (2000): Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480, 295 - 305.
- DREW, M.L., ALEXANDER, B.M., SASSER, R.G. (1995): Pregnancy determination by use of pregnancy-specific protein B radioimmunoassay in llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207 (2), 217 - 219.
- DUELLO, T.M., BYATT, J.C., BREMEL, R.D. (1986): Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology* 119(3), 1351 - 1355.

- DUNBAR, M.M., WONG, T.S., RUDER-MONTGOMERY, C.A., CHEW, B.P., SASSER, R.G. (1990): Partial characterization of the immunosuppressive properties of pregnancy-specific protein B (PSPB). *Theriogenology* 33 (suppl.1), 220.
- DUNNETT C. W. (1955): A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Am. Stat. Assoc.*, 50, 1096 - 1121.
- FRICKE, P.M. (2002): Scanning the future -- ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85 (8), 1918 - 1926.
- FRIEDRICH, M., HOLTZ, W. (2004): Establishment of an ELISA to assess PAG-concentrations in blood and milk of dairy cows. *Reprod. Abstract Ser.* 31, 21.
- GAJEWSKI, Z., KONOPKA, A., BECKERS, J. F., MELO DE SOUSA, N., SULON J., THUN, R. (2005): Determination of bPAG and cPAG in milk and blood of cows in comparison to sonographic and rectal examination for pregnancy diagnosis. *Swiss Vet.*, 147 (2), 47 – 87.
- 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.
- 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.
- GEISERT, R.D., MALAYER, J.R. (2000): Implantation. In: HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E.: *Reproduction in farm animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
- GIGER, R. (1995): Die Ultraschalluntersuchung des Geschlechtsapparates beim weiblichen Rind. *Swiss Vet.* 12, 13 - 18.
- GONZÁLEZ, F., SULON, J., GARBAYO, J.M., BATISTA, M., CABRERA, F., CALERO, P.O., GARCIA, A., BECKERS, J.F. (1999): Early pregnancy diagnosis in goats by determination of pregnancy-associated glycoprotein concentrations in plasma samples. *Theriogenology* 52, 717 - 725.
- GONZÁLEZ, F., SULON, J., CALERO, P., BATISTA, M., GRACIA, A., BECKERS, J.F. (2001): Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats. *Theriogenology* 56 (4), 671-676.
- GOOTWINE, E. (2004): Placental hormones and fetal-placental development. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 551 - 566.
- 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.

- GREEN, J.A., XIE, S., ROBERTS, M. (1998): Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Rev. Reprod.* 3: 62-69.
- GREEN J.A., XIE S, SZAFRANSKA B, GAN X, NEWMAN AG, MCDOWELL K, ROBERTS RM. (1999): Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta. *Biol. Reprod.* 60 (5), 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., PARKS, T.E., AVALLE, M.P., TELUGU, B.P., MCLAIN, A.L., PETERSON, A.J., MCMILLAN, W., MATHIALAGAN, N., HOOK, R.R., XIE, S., ROBERTS, R.M. (2005): The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology* 63 (5), 1481 - 1503.
- GREEN J.A., ROBERTS R.M. (2006): Establishment of an ELISA for the detection of native bovine pregnancy-associated glycoproteins secreted by trophoblast binucleate cells. *Methods Mol. Med.*122:321-30.
- 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.
- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. (2000): *Reproduction in farm animals.* 7<sup>th</sup> Ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
- HANSEN, P.J. (2002): Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *J. Anim. Sci.* 80 (E. Suppl..2), 33 - 44.
- HAYES, K.D., NIELSEN, S.S. (2000): Plasmin Levels in Fresh Milk Whey and Commercial Whey Protein Products. *J. Dairy Sci.* 83, 387 - 394.
- HENNIES, M. (1994): *Enzymimmunologische Untersuchungen am Somatotropin bei Fleischziegen.* Dissertation, Göttingen.
- HOFFMANN, B., SCHULER, G. (2002): The bovine placenta - a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23 (1-2), 309 - 320.
- HOLTZ, W., BRACKEL, A. v., KÜSTER, J. (1986): Der Milchprogesterontest: Instrument zur Fruchtbarkeitspflege beim Rind. *Zentralbl. Veterinärmed.* 33, 321 - 336.

- HUGHES, A.L., GREEN, J.A., PIONTKIVSKA, H., ROBERTS, R.M. (2003): Aspartic proteinase phylogeny and the origin of pregnancy-associated glycoproteins. *Mol. Biol. Evol.* 20 (11), 1940 - 1945.
- HUMBLOT, F., CAMOUS, S., MARTAL, J., CHARLERY, J., JEANGUYOT, N., THIBIER, M., SASSER, R.G. (1988a): Diagnosis of Pregnancy by Radioimmunoassay of an Pregnancy-specific Protein in the Plasma of Dairy Cows. *Theriogenology* 30, 257 - 267.
- HUMBLOT, F., CAMOUS, S., MARTAL, J., CHARLERY, J., JEANGUYOT, N., THIBIER, M., SASSER, R.G. (1988b): Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 83 (1), 215 - 223.
- HUMBLOT, P. (2001): Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56 (9), 1417 - 1433.
- KÄHN, W., LEIDL, W., RIENMÜLLER, R. (1989): Die Kammerung des Rinderuterus während der Frühgravidität. Ein Vergleich morphologischer, sonographischer und kernspintomographischer Befunde. *J. Vet. Med. A.* 36, 641 - 652.
- KASTELIC, J. P., CURRAN, S., PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. (1988): Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology* 29, 39 – 54.
- KASTELIC, J. P., GINTHER, O.J. (1989): Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194, 922 - 928.
- KASTELIC, J.P., NORTHEY, D.L., GINTHER, O.J. (1991): Spontaneous embryonic death on Days 20 to 40 in heifers. *Theriogenology* 35 (2), 351 – 363.
- KEUSGEN, M. (2002): Biosensors: New approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften.* 89 (10), 433 - 444.
- KINDAHL, H., KORNMATITSUK, B., GUSTAFSSON, H. (2004): The Cow in Endocrine Focus Before and After Calving. *Reprod. Dom. Anim.* 39 (4), 217 – 221.
- KIRACOFÉ, G.H., WRIGHT, J.M., SCHALLES, R.R., RUDER, C.A., PARISH, S., SASSER, R.G. (1993): Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 71 (8), 2199 - 2205.
- KLINDT, J., DAVIS, S.L., OHLSON, D.L. (1979): Estimation of half-life and metabolic clearance rate of thyrotropin-releasing hormone in sheep using a double antibody radioimmunoassay. *J. Anim. Sci.* 48 (5), 1165 – 1171.
- KLISCH, K., LEISER, R. (2003): In bovine binucleate trophoblast giant cells, pregnancy-associated glycoproteins and placental prolactin-related protein-I are conjugated to asparagine-linked N-acetylgalactosaminyl glycans. *Histochem. Cell Biol.* 119 (3), 211 - 217.

- KLISCH, K., DE SOUSA, N.M., BECKERS, J.F., LEISER, R., PICH, A. (2005): Pregnancy associated glycoprotein-1, -6, -7, and -17 are major products of bovine binucleate trophoblast giant cells at midpregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 71 (4), 453 - 460.
- LEA, R.G., BOLTON, A.E. (1988): An immunochemical demonstration of a pregnancy-specific protein in the horse and its use in the serological detection of early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 84 (2), 431 - 436.
- LEE, K.Y., DEMAYO, F.J. (2004): Animal models of implantation. *Reprod.* 128 (6), 679 - 695.
- LIEBIG, H.G. (2003): *Funktionelle Histologie*. 4. Aufl. Schattauer Verlag, Stuttgart New York.
- LKV (2005): Jahresbericht – Landeskontrollverband für Milchwirtschaft e. V. Verden.
- LÓPEZ-GATIUS, F., GARBAYO, J.M., SANTOLARIA, P., YANIZ, J., AYAD, A., SOUSA, N.M., BECKERS, J.F. (2006): Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domest. Anim. Endocrinol.* Article in press. DOI-Nr.:10.1016/j.domaniend.2005.12.007
- LUCY, M.C. (2001): Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where will it End? *J. Dairy Sci.* 84: 1277 - 1293.
- 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), 89.
- MA, Y., BARBANO, D.M., SANTOS, M. (2003): Effect of CO<sub>2</sub> addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4 degrees C. *J. Dairy Sci.* 86 (5), 1616 - 1631.
- MANN, E. (1996): Enzymimmunologisch ermittelte Hormonprofile, Ovarreaktion und Embryonenqualität bei mit PMSG superovulierten präpuberalen Jungsaunen. Dissertation, Göttingen.
- MARTINEZ, J.R., GONZALO, C., CARRIEDO, J.A., SAN PRIMITIVO, F. (2003): Effect of freezing on Fossomatic cell counting in ewe milk. *J. Dairy Sci.* 86 (8), 2583 - 2587.
- MEERMANN, A. (1983): Zur Verwendung sogenannter "Automatik-Spritzen" bei der Reihen-Blutproben-Entnahme aus der Schwanzvene (V. caudalis mediana) des Rindes. *Dt. Tierärztl. Wochenschrift*, 12, 503-509.
- METELO, R., SILVA, S., BECKERS, J.F., MOREIRA, D.A., SILVA, F. (2004): Determination of pregnancy-associated glycoproteins (bPAG) in cow's milk. 23<sup>rd</sup> World Buiatrics Congress 75.
- MEYER, H. (1989): *Enzymimmunologische Meßverfahren zur Hormonanalytik*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

- MIALON, M.M., RENAND, G., CAMOUS, S., MARTAL, J., MENISSIER, F. (1994): Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy serum protein (PSP60) in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 34 (1), 65 - 72.
- MICHEL, G. (1986): *Kompendium der Embryologie der Haustiere*. 4. Aufl. Verlag Gustav Fischer, Jena.
- MIYAI, K., ISHIBASHI, K., KUMAHARA, Y. (1976): Enzyme-linked immunoassay of thyrotropin. *Clin. Chim. Acta.* 67, 263 - 268.
- MKU (2004): *GLP - Gute Laborpraxis (OECD)*. Milchwirtschaftlicher Kontroll- und Untersuchungsverband Uelzen e.V. (MKU)
- MÖLLER, R. (1991): *Enzymimmunoassays mit zweitem Antikörper für Progesteron und porcinem LH*. Dissertation, Göttingen.
- MÜLLER, K. (2000): *Genauigkeit und Wirtschaftlichkeit einer Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall zwischen dem 20. und 34. Tag nach der künstlichen Besamung bei Kühen und Färsen*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- MUTAYOBA, B.M., MEYER, H.H.D., SCHAMS, D., SCHALLENBERGER, E. (1990): Development of a sensitive enzyme immunoassay for LH determination in bovine plasma using a streptavidin-biotin technique. *Acta Endocrinol.* 122, 227 - 232.
- NAKANE, P.K., PIERCE, G.B. Jr. (1967): Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.* 33 (2), 307 - 318.
- NEVILLE, M.C. (1999): Physiology of lactation. *Clin. Perinatol.* 26 (2), 251 – 279.
- NIGGEMEYER, H. (1989): *Verfahren zur Erkennung von Brunst und Trächtigkeit beim Rind. Milchprogesterontest und Peroxidasegehalt im Zervikalschleim*. Dissertation, Göttingen.
- OELLERICH, M. (1984): Enzyme-immunoassay: a review. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22, 895 - 904.
- OLLIVIER-BOUSQUET, M. (2002): Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (2), 149 - 162.
- 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.

- 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.
- PATEL, O.V., TAKAHASHI, T., IMAI, K., HASHIZUME, K. (2004): Generation and purification of recombinant bovine pregnancy associated glycoprotein. *Vet. J.* 168 (3), 328 - 335.
- PEAKER, M. (1974): Recent advances in the study of monovalent movements across the mammary epithelium: relation to the onset of lactation. *J. Dairy Sci.* 58, 1042 - 1047.
- PERÉNYI, Z. (2002): Investigations on Pregnancy-Associated Glycoproteins in the Cow. Dissertation, University of Liège, Belgium.
- PERÉNYI, Z., SZENCI, O., DRION, P.V., BECKERS J-F. (2002): Comparison of the Ability of three Radioimmunoassay to Detect Glycoproteins in Bovine Plasma. *Reprod. Dom. Anim.*, 37:100-104.
- PIERSON, R. A., GINTHER, O.J. (1988): Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 29, 21 – 37.
- PIETERSE, M. C., SZENCI, O., WILLEMSE, A.H., BAJCSY, C.S.A., DIELEMAN, S.J., TAVERNE, M.A.M. (1990): Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. *Theriogenology* 33, 697 - 708.
- PITCHER, P.M., GALLIGAN. D.T. (1990): Decision analysis and economic evaluation of the use of the rapid milk progesterone assay for early detection of pregnancy status of cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 1586 - 1590.
- PORSTMANN, T., KIESSIG, S.T. (1992): Enzyme immunoassay techniques. *J. Immunol. Methods* 150, 5 - 21.
- REIMERS, T.J., ULLMANN, M.B., HANSEL, W. (1985): Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* 33 (5), 1227 - 1236.
- ROBERTS, G.P., PARKER, J.M. (1976): Fractionation and comparison of proteins from bovine uterine fluid and bovine allantoic fluid. *Biochim. Biophys. Acta.* 446 (1), 69 - 76.
- 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.
- ROBERTS, R.M., XIE, S., MATHIALAGAN, N. (1996): Maternal Recognition of Pregnancy. *Biol. Reprod.* 54 (2), 294 - 302.

- RODBARD, D. (1974): Statistical and quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 10, 1255 - 1270.
- ROPSTAD, E., VEIBERG, V., SAKKINEN, H., DAHL, E., KINDAHL, H., HOLAND, O., BECKERS, J.F., ELORANTA, E. (2005): Endocrinology of pregnancy and early pregnancy detection by reproductive hormones in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Theriogenology*. 63 (6), 1775 - 1788.
- ROSENBERGER, G., (1990): *Klinische Untersuchung des Rindes*, 3. Aufl. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- ROWSON, L.E.A., DOTT, H.M. (1963): A hazard of pregnancy diagnosis in cattle: Early foetal size. *Vet. Rec.* 75, 865 - 866.
- SANTOS, J.E., THATCHER, W.W., CHEBEL, R.C., CERRI, R.L., GALVAO, K.N. (2004): The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 513 - 535.
- SASSER, R.G., RUDER, C.A., IVANI, K.A., BUTLER, J.E., HAMILTON, W.C. (1986): Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.* 35 (4), 936 - 942.
- SCHAMS, D., BERISHA, B. (2004): Regulation of corpus luteum function in cattle - an overview. *Reprod. Domest. Anim.* 39 (4), 241 - 251.
- SCHEFFÉ, H. (1950): Statistical methods for evaluation of several sets of constants and several sources of variability. *Chem. Eng. Prog.* 50, 200 - 205.
- SCHNEIDER, F. (1982): Trächtigkeitsuntersuchung. In: Grunert, E. und Berchthold M. (Hrsg.) *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*, 2. Auflage, Verlag Paul Parey Hamburg und Berlin, 258 - 284.
- SCHNORR, B. KRESSIN, M. (2001): *Embryologie der Haustiere*. 4. Aufl. Enke Verlag, Stuttgart.
- SENYK, G.F., BARBANO, D., SHIPE, W. (1985): Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 68 (9), 2189 - 2194.
- SHAHANI, K.M., HERPER, W.J., JENSEN, R.G., PARRY, R.M. Jr., ZITTLE, C.A. (1973): Enzymes in bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.* 56 (5), 531 - 543.
- SHELDON, I.M., DOBSON, H. (2003): Reproductive challenges facing the cattle industry at the beginning of the 21<sup>st</sup> century. *Reprod. Suppl.* 61, 1 - 13.
- SOUSA, N.M., GARBAYO, J.M., FIGUEIREDO, J.R., SULON, J., GONCALVES, 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.* 32, 127 - 147.

- SOUSA, N.M., ZONGO, M., PITALA, W., BOLY, H., SAWADOGO, L., SANON, M., FIGUEIREDO, J.R., GONCALVES P.B., EL AMIRI B., PERENYI Z., BECKERS J.F. (2003): Pregnancy-associated glycoprotein concentrations during pregnancy and the postpartum period in Azawak Zebu cattle. *Theriogenology* 59 (5-6), 1131 - 1142.
- SPENCER, T.E., BAZER, F.W. (2004): Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 49.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, (1989): SAS/STAT User's Guide. Release 6.08 TS407, SAS Institute, Cary, NC USA.
- STRYER, L. (1994): *Biochemie*. 2. Nachdruck der 4. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg.
- 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.
- SZAFRANSKA, B., MIURA, R., GHOSH, D., EZASHI, T., XIE, S., ROBERTS, R.M., GREEN, J.A. (2001a): Gene for porcine pregnancy-associated glycoprotein 2 (poPAG2): its structural organization and analysis of its promoter. *Mol. Reprod. Dev.* 60 (2), 137 - 146.
- SZAFRANSKA, B., PANASIEWICZ, G., WACLAWIK, A. (2001b): Length polymorphism of PCR-amplified genomic fragments of the Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) gene family in the pig and some other domestic and wild mammals. *J. Appl. Genet.* 42 (3), 335 - 349.
- SZAFRANSKA, B., PANASIEWICZ, G. (2002): The placental expression of the porcine pregnancy-associated glycoprotein (pPAG) gene family examined in situ and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 72 (1-2), 95 - 113.
- SZENCI, O., BECKERS, J.F., HUMBLLOT, P., SULON, J., SASSER, G., TAVERNE, M.A.M., VARGA, J., BALTUSEN, R., SCHEKK, G. (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.
- SZENCI, O., BECKERS, J.F., VARGA, J., BARJCSY, Á.C.S. (2000a): The accuracy of the diagnoses of early pregnancy and late embryonic mortality in the cow: A review. *Folia Vet.* 44 (4), 199 - 201.
- SZENCI, O., HUMBLLOT, P., BECKERS, J.F., SASSER, G., SULON, J., BALTUSEN, R., VARGA, J., BAJCSY, C.A., TAVERNE, M.A.M (2000b): Plasma profiles of progesterone and conceptus proteins in cows with spontaneous embryonic/fetal mortality as diagnosed by ultrasonography. *Vet. J.* 159 (3), 287 - 290.

- SZENCI, O., BECKERS, J.F., SULON, J., BEVERS, M.M., BORZSONYI, L., FODOR, L., KOVACS, F., TAVERNE, M.A.M. (2003): Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy associated glycoprotein 1 in heifers. *Vet. J.* 165 (3), 307 - 313.
- TAMBAJONG, D.S.J. (2002): Geburt, Saugverhalten und Milchparameter bei Burenziegen. Dissertation, Göttingen.
- TAVERNE, M.A.M, BREUKELMAN, S.P., PERENYI, Z., DIELEMAN, S.J., VOS, P.L., JONKER, H.H., DE RUIGH, L., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, J.M., BECKERS, J.F. (2002): The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (6), 613 - 624.
- TEFERA, N., JEANGUYOT, N., THIBIER, M., HUMBLLOT, P. (2001): Pregnancy-specific protein B (bPSPB) and progesterone monitoring of post-partum dairy cows with placental retention. *J. Vet. Med. A.* 48 (6), 331 - 336.
- THATCHER, W.W., MEYER, M.D., DANET-DESNOYERS, G. (1995): Maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49, 15 - 28.
- THOMPSON, J.A., MARSH, W.E., CALVIN, J.A., ETHERINGTON, W.G., MOMONT, H.W., KINSEL, M.L. (1994): Pregnancy attrition associated with pregnancy testing by rectal palpation. *J. Dairy Sci.* 77, 3382 - 3387.
- THRUSFIELD, M. (1995): Diagnostic testing. In: Thrusfield, M. (Hrsg.): *Veterinary epidemiology*, 2. Auflage.
- THURMOND, M.C. PICANSO, J.P. (1993): Fetal loss associated with palpation per rectum to diagnose pregnancy in cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 432 - 435.
- TIJSSSEN, P. (1985): Practice and theory of enzyme immunoassay. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Burdon R.H., van Knippenberg, P.H., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, Vol. 15.
- VAILLANCOURT, D., BIRSCHWAL, C.J. OGWU, D. ELMORE, R.G., MARTIN, C.E., SHARP, A.J., YOUNGQIST, R.S. (1979): Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175 (5), 466 - 468.
- VAN DER WEIJDEN, G.C., TAVERNE, M.A.M. (1999): Trächtigkeitsuntersuchung. In: Grunert, E. und A. de Kruif (Hrsg.): *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*, 3. Auflage. Berlin: Parey Buchverlag, 78 - 92.
- VIT (2004): Jahresbericht des VIT (Vereinigte Informationssystem Tierhaltung w.V.), Verden, Deutschland.
- WEBSTER, H.V., BONE, A.J., WEBSTER, K.A., WILKIN, T.J. (1990): Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a radioimmunoassay (RIA) for measurement of rat insulin. *J. Immunol. Methods.* 134, 95-100.

- WEEMS, C.W., WEEMS, Y.S., FRENCH, J.T., FRENCH, L.N., SASSER, R.G., WELSH, T.H. Jr, HARMS, P.G., RANDEL, R.D. (1996): Effect of histone-H2A (H-H2A), platelet activating factor (PAF) and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of prostaglandins E and F2 alpha (PGE; PGF2 alpha) by bovine endometrium and H-H2A on basal secretion of luteinizing hormone (LH) by bovine pituitary cells in vitro. *Chin. J. Physiol.* 39 (3), 147 - 154.
- WEEMS, Y.S., LAMMOGLIA, M.A., VERA-AVILA, H.R., RANDEL, R.D., SASSER, R.G., WEEMS, C.W. (1998a): Effects of luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-Epi-PGE1, 8-Epi-PGF2 alpha, trichosanthin and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of prostaglandin (PG) E (PGE) or F2 alpha (PGF2 alpha) in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 55 (5-6), 359 - 376.
- WEEMS, Y.S., LAMMOGLIA, M.A., VERA-AVILA, H.R., RANDEL, R.D., KING, C., SASSER, R.G., WEEMS, C.W. (1998b): Effect of luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-EPI-PGE1, 8-EPI-PGE2, trichosanthin, and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of progesterone in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 55 (1), 27 - 42.
- WEEMS, Y.S., BRIDGES, P.J., LEAMASTER, B.R., SASSER, R.G., CHING, L., WEEMS, C.W. (2001): Effect of the aromatase inhibitor CGS-16949A on pregnancy and secretion of progesterone, estradiol-17beta, prostaglandins E and F2alpha (PGE; PGF2alpha) and pregnancy specific protein B (PSPB) in 90-day ovariectomized pregnant ewes. *Prostaglandins and other Lipid Mediat.* 66 (2), 77 - 88.
- WEEMS, Y.S., BRIDGES, P.J., SASSER, R.G., CHING, L., LEAMASTER, B.R., VINCENT, D.L., WEEMS, C.W. (2002): Effect of mifepristone on pregnancy, pregnancy-specific protein B (PSPB), progesterone, estradiol-17beta, prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) and prostaglandin E (PGE) in ovariectomized 90-day pregnant ewes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 70 (1-2):195-208.
- WEEMS, Y.S., KIM, L., HUMPHREYS, V., TSUDA, V., WEEMS, C.W. (2003): Effect of luteinizing hormone (LH), pregnancy specific protein B (PSPB), or arachidonic acid (AA) on ovine endometrium of the estrous cycle or placental secretion of prostaglandins E2 (PGE2) and F2alpha (PGF2alpha) and progesterone in vitro. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 71 (1-2), 55 - 73.
- 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.
- WHITNEY, R.M., BRUNNER, J.R., EBNER, K.E., FARRELL, H.M. JR, JOSEPHSON, R.V., MORR, C.V., SWAISGOOD, H.E. (1976): Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision. *J. Dairy Sci.* 59 (5), 795 - 815.

- WIECZOREK, S., HAGELSCHUER, P. ADAM, W. (1977): Die ökonomische Bewertung der Länge der Zwischenkalbezeit. *Monatsh. Veterinärmed.* 32, 321 - 326.
- WILD, D. (2001): *The Immunoassay Handbook*. 2<sup>nd</sup> Edition. Nature Publishing Group, London.
- WOODING, F.B., WATHES, D.C. (1980): Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J. Reprod. Fertil.* 59 (2), 425 - 430.
- WOODING, F.B. (1983): Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. *Placenta* 4, 527 - 539.
- WOODING, F.B. (1992): Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13 (2), 101 - 113.
- WOODING, F.B., MORGAN, G., MONAGHAN, S., HAMON, M., HEAP, R.B. (1996): Functional specialization in the ruminant placenta: evidence for two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. *Placenta* 17 (1), 75 - 86.
- WOODING, F.B., ROBERTS, R.M., GREEN, J.A. (2005): Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta* 26 (10), 807 - 827.
- XIE, S.C., LOW, B.G., NAGEL, R.J., KRAMER, K.K., ANTHONY, R.V., ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., ROBERTS, R.M. (1991): Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (22), 10247 - 10251.
- XIE, S.C., LOW, B.G., NAGEL, R.J., BECKERS, J.F., ROBERTS, R.M. (1994): A Novel Glycoprotein of the Aspartic Proteinase Gene Family Expressed in Bovine Placental Trophectoderm. *Biol. Reprod.* 51, 1145 - 1153.
- YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1960): Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39, 1157 - 1175.
- YALOW, R.S., BERSON, S.A. (1961): Immunoassay of insulin content of crystalline glucagon preparations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107, 148 - 151.
- ZHOU, G.Q., HAMMARSTROM, S. (2001): Pregnancy-specific glycoprotein (PSG) in baboon (*Papio hamadryas*): family size, domain structure, and prediction of a functional region in primate PSGs. *Biol. Reprod.* 64 (1), 90 - 99.
- ZOLI, A.P., BECKERS, J.F., ECTORS, F. (1990): Isolation of an ovine pregnancy-specific protein. *Theriogenology* 33 (suppl. 1), 366.
- 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., DOMEZ, 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.; BENITEZ ORTIZ, W., BECKERS, J.F. (1992b): Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.* 46, 83 - 92.

## 9. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Ablauf des Brunstzyklus mit Follikel- und Gelbkörperentwicklung, sowie Progesteron, Östradiol und LH-Verläufen beim Rind (nach HAFEZ und HAFEZ, 2000).	3
Abb. 2: Schematische Darstellung von Eizellreifung, Befruchtung und embryonaler Entwicklung bis hin zum Stadium der Blasozyste (nach SCHNORR und KRESSIN, 2001).	5
Abb. 3: Expressionsmuster verschiedener boviner PAG während der Trächtigkeit (nach GREEN et al., 2000)	10
Abb. 4: Schematische Darstellung von Plazentation (a) und feto-maternalen Verbindung (b) beim Rind. Zweikernige Trophoblastenzellen (1,2) fusionieren mit maternalen Epithelzellen (3). Nach Exocytose gelangt u.a. PAG in den maternalen Blutkreislauf. Ab dem 40. Trächtigkeitstag werden beim Rind kurzlebige dreikernige Zellen gebildet die nach Verschmelzung im Trophektoderm resorbiert werden (4,5). (nach GREEN et al. 1998)	12
Abb. 5: Beginnende Bildung einer feto-maternalen Hybridzelle beim Rind (mit freundl. Genehmigung von Dr. K. Klisch, MH Hannover).	13
Abb. 6: PAG-1 Verlauf bei trächtigen Kühen (ZOLI et al., 1992b).	15
Abb. 7: Schematische Darstellung einer manuellen rektalen Untersuchung beim Rind. a) Palpation der Gebärmutter b) Trächtigkeit 5. Monat (nach Rosenberger, 1990)	18
Abb. 8: Mittlere Nachgemelks-Progesteronkonzentrationen nach erfolgreicher (trächtig) und erfolgloser (nicht trächtig) Besamung (nach NIGGEMEYER, 1989).	20
Abb. 9: Schematische Darstellung einer ultrasonographischen Untersuchung beim Rind (modifiziert nach BEAL et al., 1992).	21
Abb. 10: Schematische Darstellung transzellulärer Wege von Plasmaproteinen durch eine Milchdrüsenepithelzelle. Mittels Endocytose aufgenommene Proteine werden in Endosomen (e), Vesikularkörpern (Mvb) oder Lysosomen (Ly) in der Zelle angereichert und nach einer erfolgten Sortierung teilweise in das Lumen der Milchalveolen abgegeben (Exocytose) (nach BOISGARD et al., 2001).	26
Abb. 11: Prinzip eines kompetitiven Doppelantikörper-ELISA mit gleichzeitiger Inkubation von Probe, spezifischem Antikörper und Tracer (nach MÖLLER, 1991).	31

- Abb. 12: Pipettierschema des PAG-ELISA (S0-S6: Standardreihe, K1-K4: 41  
Kontrollen, P1-P36: Proben).
- Abb. 13: Verlauf einer Standardkurve PAG-Blut-ELISA nach 20-stündiger 58  
Vorinkubation des 1. Antikörpers und einer Probeninkubation von  
10 Stunden. Die gemittelten Messwerte wurden anhand einer  
Doppelbestimmung der Standardproben errechnet.
- Abb. 14: PAG-Blut-Konzentrationen (RIA und ELISA) von 16 verschiedenen 60  
Kühen. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (ULG,  
Belgien) und mittels ELISA.
- Abb. 15: Verlauf einer Standardkurve im PAG-Milch-ELISA. unter 61  
Verwendung von H-Milch als Puffer für die Herstellung der  
Standardreihen.
- Abb. 16: Einfluss der Lagerungsdauer und -temperatur auf die PAG- 63  
Konzentration (+SD) in der Frischmilch von 20 Kühen (frisch =  
100%) (a,b:  $p < 0,001$  Dunnett-t-Test).
- Abb. 17: Mittlere PAG-Konzentrationen ( $\pm$ SD) in frischer Magermilch bei 65  
nicht-trächtigen Tieren (NT) und 40, 60, 80 oder 100 Tage  
trächtigen Tieren (a,b b,c:  $p < 0,05$ ; a,c:  $p < 0,001$ , LSD-Test).
- Abb. 18: PAG-Konzentrationen im Blut trächtiger (◆) und nicht trächtiger (▲) 67  
Kühe zu verschiedenen Zeiten nach KB
- Abb. 19: Verlauf der PAG-Konzentration im Blut trächtiger Kühe. Dargestellt 68  
sind die gemessenen PAG-Konzentration bis zum 100. Tag nach  
KB (◆), sowie die zugehörige Regressionskurve (—).
- Abb. 20: PAG-Konzentrationen ( $\bar{x} \pm$ SD) im Blut nicht trächtiger (NT) und 69  
trächtiger Kühe in der 3. (d21), 4. (d28) und 5. (d35)  
Trächtigungswoche. (ns: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ;  
Dunnett-t-Test).
- Abb. 21: PAG-Konzentrationen in der Milch trächtiger (■) und nicht 70  
trächtiger (●) Kühe nach erfolgter KB.
- Abb. 22: Verlauf der PAG-Konzentrationen in der Milch trächtiger Kühe. 71  
Dargestellt sind die gemessenen PAG-Konzentrationen bis zum  
100. Tag nach KB (◆), sowie die zugehörige Regressionskurve  
(—).
- Abb. 23: Verlauf der PAG-Konzentration in Blut und Milch während der 72  
Trächtigkeit.
- Abb. 24: PAG-Konzentrationen in Blut und Milch nach einem Abbruch der 73  
Trächtigkeit.

- Abb. 25: Anteil trächtiger Kühe innerhalb der unterschiedenen PAG-Konzentrationsgruppen. Die Trächtigkeitsdiagnose wurde mittels ultrasonographischer Untersuchung (d28) gestellt. 76
- Abb. 26: Prozentualer Anteil trächtiger Kühe innerhalb verschiedener PAG-Konzentrationsgruppen. Die Trächtigkeitsdiagnose wurde mittels rektaler Untersuchung (>d50) gestellt. 77
- Abb. 27: Verlauf der PAG-Konzentration trächtiger (n=267) und nicht-trächtiger (n=130) Kühe zwischen dem 10. und 50. Tag nach der Belegung (Mittelwert  $\pm$ SD). 81
- Abb. 28: Verlauf der PAG-Konzentrationen trächtiger (n=267) und nicht-trächtiger (n=130) Kühe zwischen dem 10. und 50. Tag nach KB. Dargestellt anhand von 5-Tagemittelwerte (Mittel  $\pm$ SD). 83
- Abb. 29: Mittlere PAG-Konzentrationen ( $\bar{x} \pm$ SD) im Blut 16 bis 50 Tage trächtiger und einer Kontrollgruppe nicht trächtiger Tiere (NT) (ns = nicht signifikant; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001; Dunnett-t-Test). 83

## 10. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Vergleich der Aminosäuresequenzen repräsentativer PAG und Aspartat-Proteinasen (nach GREEN et al., 1998)	9
Tab. 2: Definition von Parametern der Trächtigkeitsuntersuchung aus verschiedenen Ergebniskombinationen (nach THRUSFIELD, 1995).	17
Tab. 3: Genauigkeit einer PAG-Trächtigkeitsdiagnose mittels RIA zu verschiedenen Zeiten nach erfolgter Besamung beim Rind (Se=Sensitivität, Sp=Spezifität, PPV=positive predictive value, NPV=negative predictive value).	23
Tab. 4: Pipettierschema einer Mikrotiterplatte (12x8 Vertiefungen) zur Bestimmung der Affinität von Tracerlösungen und Antiserumlösungen (AS).	39
Tab. 5: Verteilung von Frischmilchproben (n=75) trächtiger und nicht trächtiger Kühe auf verschiedene Versuchsgruppen.	46
Tab. 6: Abkalbe- und Besamungsdaten der Versuchstiere.	49
Tab. 7: Berechnung der Qualitätskriterien Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Werte anhand der Anzahl von im PAG-Test trächtig und nicht trächtiger Tiere (PAG) sowie der Anzahl korrekt gestellter Diagnosen basierend auf den Ergebnissen einer 2. Trächtigkeitsuntersuchung (2. TU).	53
Tab. 8: Intraassay-Variationskoeffizient (CV) und Wiederfindungsraten (RR%) für Blutproben mit definierten bPAG-Konzentrationen.	59
Tab. 9: Interassay-Variationskoeffizient (CV) und Wiederfindungsraten (RR%) für Blutproben mit definierten bPAG-Konzentrationen.	59
Tab. 10: Eigenschaften und Qualitätskriterien des Milch-ELISA.	62
Tab. 11: Veränderung der PAG-Konzentration in Magermilch (A,B,E,F) oder Molke (C,D,G,H) während der Lagerung bei +4°C (A,C,E,G) oder -20°C (B,D,F,H). Die Lagerung der Proben erfolgte mit (E-H) und ohne (A-D) Zugabe eines Konservierungsmittels.	65
Tab. 12: Mittlere PAG-Konzentrationen in Blut und Milch zu verschiedenen Zeiten der Trächtigkeit sowie der prozentuale Anteil der Milch-Konzentration an der im Blut nachgewiesenen PAG-Menge.	71
Tab. 13: Verteilung der untersuchten Blutproben trächtiger und nicht-trächtiger Kühe (n=422) auf die vier unterschiedenen	75

	Konzentrations- (1,5ng/ml, 1,5-2,0ng/ml, 2,0-2,5ng/ml und >2,5ng/ml) und Zeitgruppen (<25., 26.-30., 31.-35. und >35. Tag nach KB).	
Tab. 14:	Verteilung nach ultrasonographischer Untersuchung (d28) trächtiger und nicht-trächtiger Tiere auf vier PAG-Konzentrationsgruppen.	76
Tab. 15:	Verteilung der nach rektaler Untersuchung (ab d50) als trächtig erkannter Kühe auf verschiedene PAG-Konzentrationsgruppen.	77
Tab. 16:	Sicherheit der PAG-Trächtigkeitsdiagnose zu verschiedenen Zeiten nach KB. Eine Trächtigkeit wurde angenommen, wenn die PAG-Konzentration einer Blutprobe über dem jeweiligen Grenzwert lag. Die Überprüfung der Diagnosen erfolgte mittels rektaler Untersuchung.	78
Tab. 17:	Verteilung der PAG-Konzentrationen von 1. und 2. Blutprobe (n=110) auf die Konzentrationsgruppen.	79
Tab. 18:	Entwicklung der PAG-Konzentration zweier aufeinanderfolgender Blutproben (n=110) in Abhängigkeit von verschiedenen Zeiten (<25, 26-30, 31-35 und >35) nach KB und verschiedenen Konzentrationsgruppen (bis 1,5, bis 2,0, bis 2,5 und >2,5ng/ml).	80
Tab. 19:	5-Tagemittelwerte ( $\pm$ SD) der PAG-Konzentration trächtiger und nicht-trächtiger Tiere zu verschiedenen Zeiten nach KB.	82
Tab. 20:	Genauigkeit der nach PAG-Bestimmung gestellten Trächtigkeitsdiagnosen unter Annahme verschiedener PAG-Grenzwerte zu verschiedenen Zeiten nach KB. Die Bestätigung der Diagnose erfolgte mittels ultrasonographischer oder rektaler Untersuchung oder der PAG-Bestimmung einer 2. Blutprobe.	84

## 11. Anhang

### 11.1 Chemikalien und Geräte

#### Allgemein

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS):

0,15 M	NaCl (SIGMA, Deisenhofen)
0,08 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (SIGMA)
0,03 M	KCl (Merck, Darmstadt)
0,015 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)
pH-Wert	7,2

Assaypuffer (TP-1):

1g	Casein (SIGMA)
1ml	NaOH (5M)
7,02g	NaCl
2,84g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
3,72g	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, SIGMA)
20mg	Phenolrot (SIGMA)
50µl	Clorhexidin-Digluconat (SIGMA)
pH	7,3 – 7,4

PAG-Stammlösung:

1mg	gereinigtes PAG
1ml	PBS

Gefrierschutzpuffer:

45%	TP-1
55%	Glycerol (SIGMA)

Beschichtungspuffer:

0,05 M	NaHCO <sub>3</sub> (SIGMA)
0,2g	Thimerosal (97%, SIGMA)
pH	9,6

Casein-Lösung (2,5%):

50 mM	NaOH
25g	Casein

### Tracerherstellung

Boratpuffer:

0,1 M	Borax (SIGMA)
pH	8,9

Biotin-Stammlösung:

2mg	BcapNHS (SIGMA)
1ml	DMSO (Dimethylsulfoxid, SIGMA)

Ammoniumchlorid (1M, SIGMA)

BSA-PBS-Lösung (1%)

PBS-Puffer mit 0,05%  $\text{NaN}_3$

### ELISA-Durchführung

Streptavidin-Peroxidase-Enzymlösung:

50 $\mu$ g	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (SIGMA)
500 $\mu$ l	TP-1
500 $\mu$ l	Glycerol

Substratpuffer:

0,05 M	Citronensäure, wasserfrei (SIGMA)
0,11 M	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
0,05%	Harnstoffperoxid (SIGMA)
pH	4,05

TMB-Lösung:

250mg TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, SIGMA)  
20ml DMSO (Dimethylsulfoxid, SIGMA)

Substratlösung:

17ml Substratpuffer  
340µl TMB-Lösung

Schwefelsäure 0,25 M

Waschpuffer:

10% PBS  
0,05% Tween 20

**Milchaufbereitung**

Kaliumdichromat (Merck)

Natriumazid (99%, SERVA)

**Verbrauchsmaterialien**

Einweg-Kanülen (3 BD Microlance™)

Luer-Einweg-Spritzen (5ml, Braun, Melsungen)

Mikrotiterplatten (Immunoplate C96 MaxiSorp™, Nunc™, Wiesbaden)

PD-10 Säulen (Sephadex G-25, GE Healthcare, München)

Pipettenspitzen (Sarstedt AG, Nümbrecht)

Reaktionsgefäße (1,5ml und 5ml, Sarstedt AG, Nümbrecht)

**Geräte**

Feinanalysewaage 1602 MP (Sartorius, Göttingen)

Magnetrührer (IKA Combimag Ret, Janke und Keikel GmbH, Staufen)

Makrofuge 5902 (Heraeus SEPATECH, Osterode)

Mehrkanalpipette 50-200µl (Dynatech, Denkendorf)

Plattenphotometer (SunRise™, Tecan, Crailsheim)

Reaktionsgefäßmischer (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG)

Schüttelinkubator (Heidolph DSG 304/M4, Bibby Dunn Labortechnik, Asbach)

Schüttelinkubator (MTS Schüttler, IKA)

Suprafuge 22 Heraeus SEPATECH, Osterode)

Waschvorrichtung (Columbus Plus, Tecan™, Crailsheim)

Wasserbadschüttler (Schütt, Göttingen)

## 11.2 ELISA-Entwicklung

**Tabelle A:** Ermittlung der optimalen Konzentrations-Kombination von Tracer und Antiserum. Dargestellt sind die gemessenen optischen Aktivitäten bei verschiedenen Verdünnungen von markiertem PAG (Tracer) und zwei unterschiedlichen Antiseren.

### Antiserum 726

Antiserumkonz. (in 1000)	Tracerkonzentration					
	400	600	800	1200	1600	2400
10	3,255	3,382	1,688	2,231	0,952	1,127
20	3,434	1,361	3,436	3,329	2,303	2,7
40	1,262	1,323	3,373	3,114	3,257	3,361
80	1,668	1,228	3,472	3,29	3,318	3,362
160	3,54	3,316	3,306	3,179	2,501	2,811
320	3,52	3,405	2,259	2,725	1,407	1,152
640	2,488	2,846	1,43	1,668	0,786	0,842
0	0,174	0,109	0,091	0,072	0,066	0,066

### Antiserum 805

Antiserumkonz. (in 1000)	Tracerkonzentration					
	400	600	800	1200	1600	2400
10	3,011	1,744	0,74	0,253	0,169	0,047
20	2,433	1,912	0,96	0,388	0,223	0,058
40	1,494	1,725	1,012	0,49	0,248	0,081
80	0,831	1,121	0,945	0,523	0,27	0,107
160	0,458	0,601	0,625	0,527	0,244	0,145
320	0,255	0,323	0,342	0,478	0,155	0,164
640	0,158	0,179	0,188	0,252	0,086	0,137
0	0,068	0,049	0,035	0,025	0,02	0,02

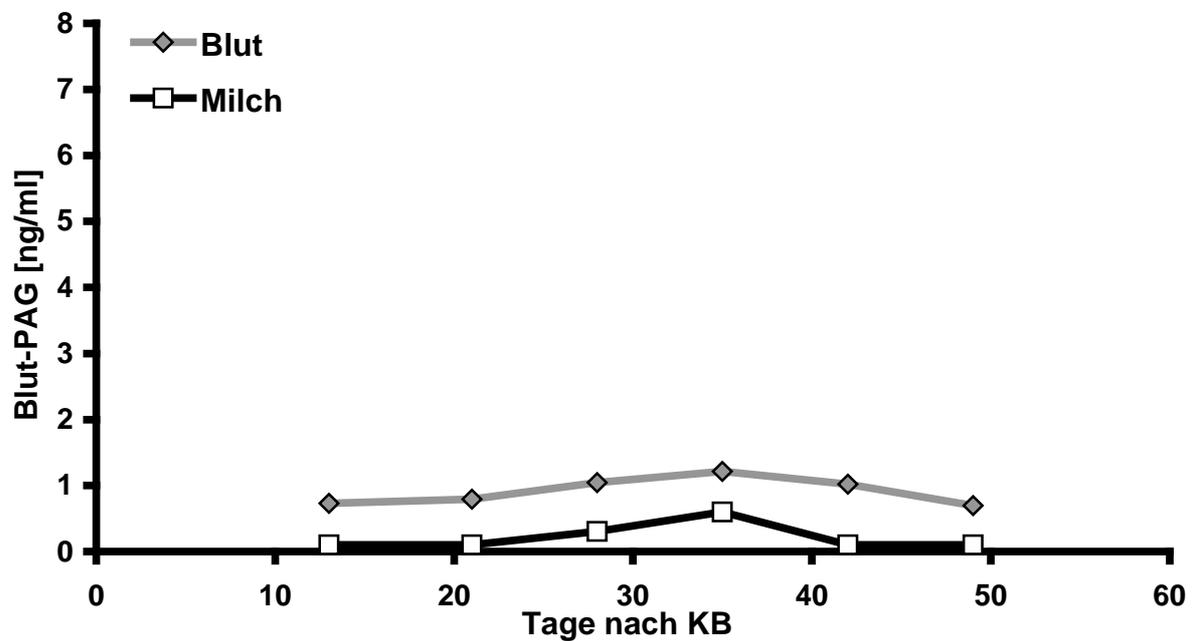
**ELISA-Protokoll (Blut und Milch-Nachweis)**

1. Tiefgefrorene Mikrotiterplatte (Beschichtungsantikörper) auf RT bringen.
2. Anti-bPAG-Arbeitslösung vorbereiten
3. 100µl Antikörperarbeitslösung je Vertiefung auftragen.
4. Inkubation bei +4°C über Nacht
  
5. Vorbereitung der Standardreihen in TP-B (Blut) oder TP-M (Milch).
6. Platte auf RT bringen, entleeren und mehrmals ausklopfen.
7. 100µl Puffer, Standard, Probe bzw. Kontrolle auftragen.
8. Platte kurz schütteln.
9. Inkubation bei RT über Nacht.
  
10. Tracerarbeitslösung vorbereiten, Verdünnung 1:1000 in TP-1.
11. 50µl Tracerearbeitslösung je Vertiefung hinzugeben.
12. 75min Inkubation auf Schüttler bei RT.
13. Streptavidin-Peroxidaselösung vorbereiten (200ng/ml)
14. Mikrotiterplatte 2 x waschen.
15. 100µl Streptavidin-Peroxidaselösung je Vertiefung hinzugeben.
16. 30min Inkubation bei RT.
17. Substratlösung vorbereiten.
18. Mikrotiterplatte 4 x waschen, ausklopfen.
19. 150µl Substratlösung je Vertiefung auftragen.
20. 45min Inkubation im Dunkeln bei RT.
21. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von je 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M).
22. Messung der OD mittels Tecan SunRise™ Photometer.
23. Berechnung der Konzentrationen mit Tecan Magellan-Software 4.0.

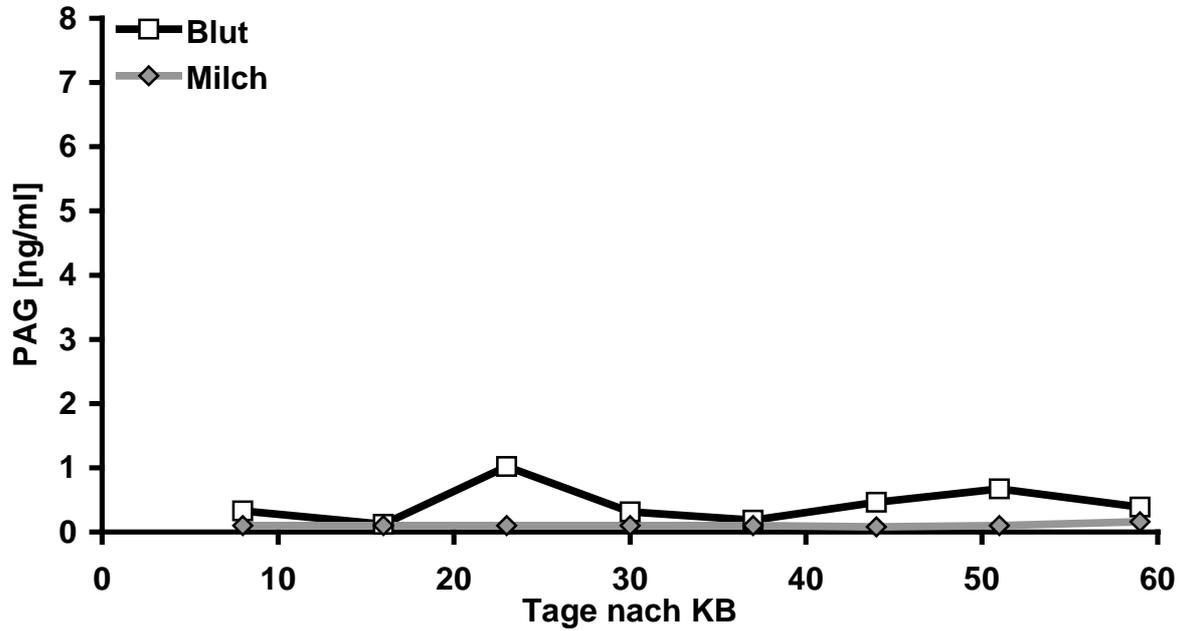
### 11.3 Verlaufprofile der Einzeltiere

Im folgenden sind die ermittelten Verlaufprofile der PAG-Konzentration der untersuchten Kühe dargestellt. Angegeben sind die PAG-Konzentrationen der Blut- und Milchproben in Bezug auf die Zeit nach erfolgter Besamung. Auf der x-Achse ist die Zeit aufgetragen, auf der 1. y-Achse die PAG-Konzentration im Blut und auf der 2. Achse die PAG-Konzentration in der Milch. Bei drei Tieren wurde nur eine Y-Achse verwendet, da die PAG-Konzentration im Blut nicht über 8ng/ml hinausging.

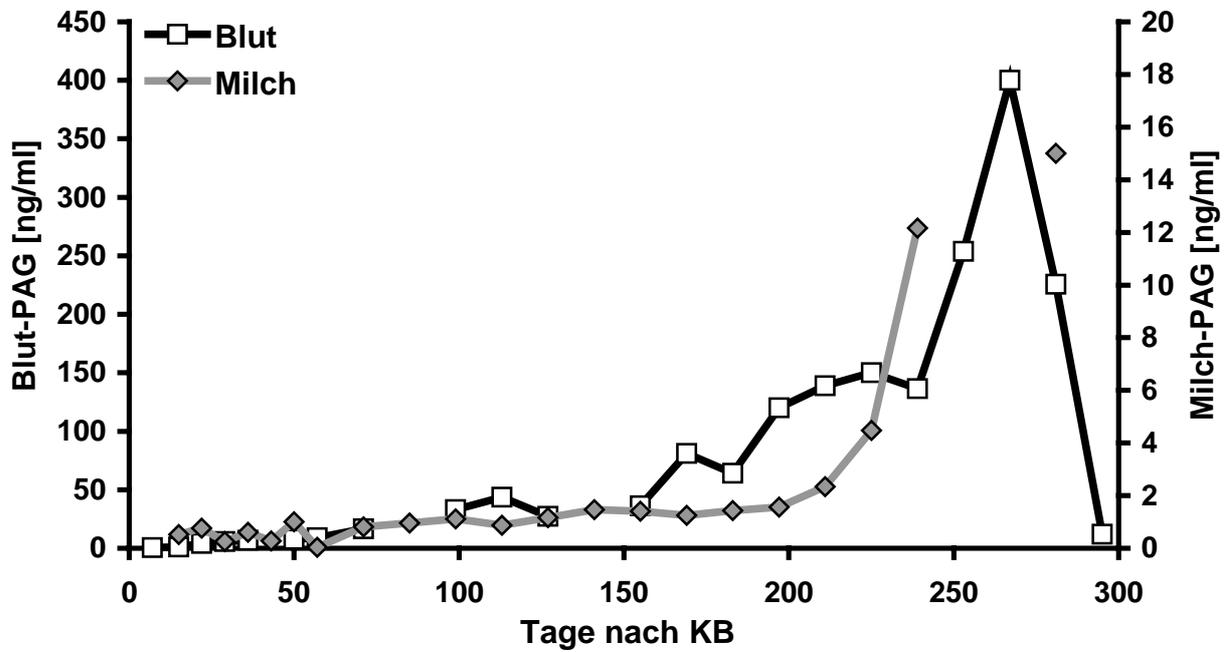
#### PAG-Verläufe von Kuh Nr. 355



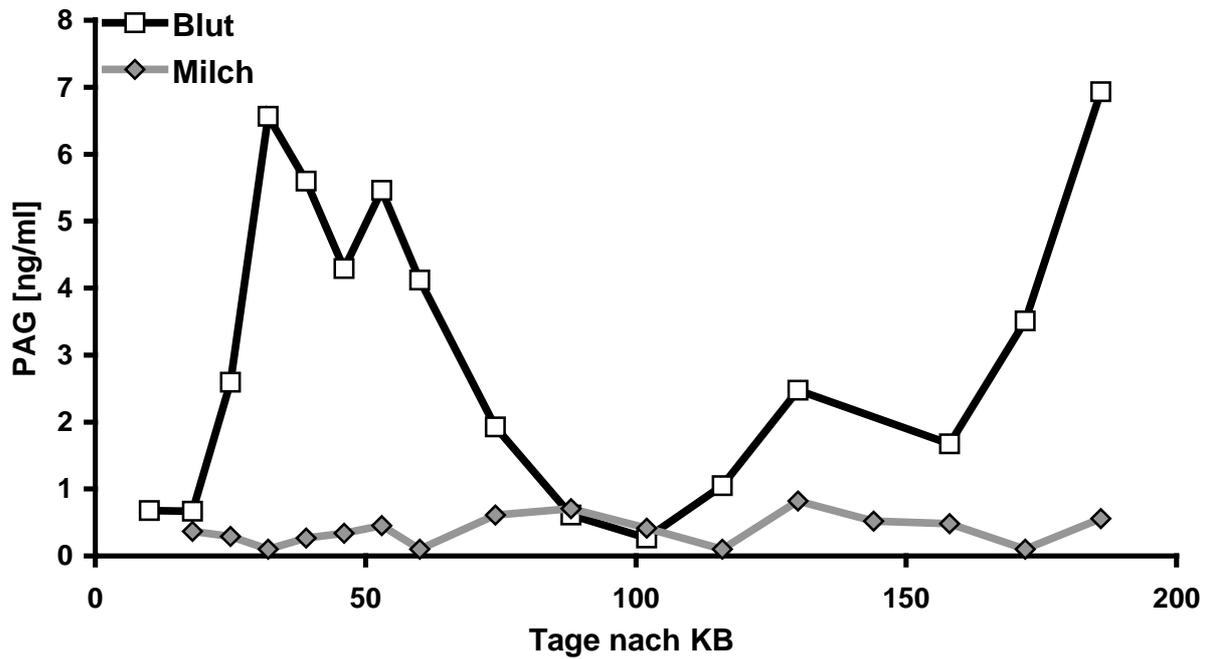
PAG-Verläufe von Kuh Nr. 395



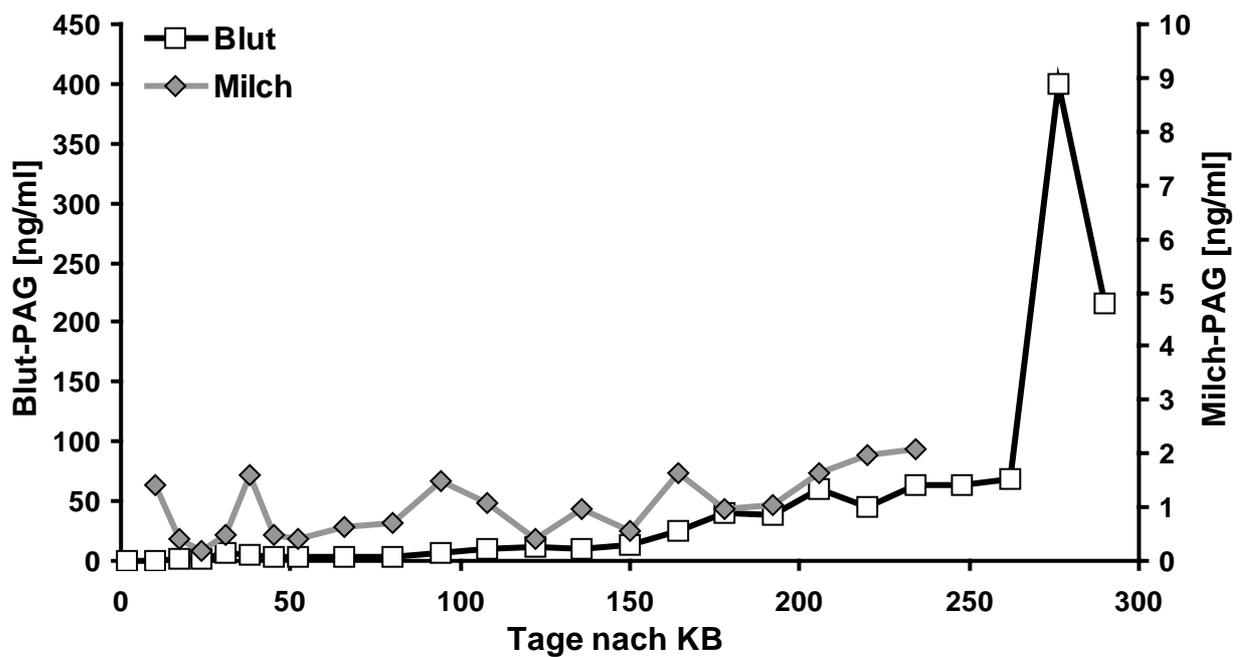
PAG-Verläufe von Kuh Nr. 362



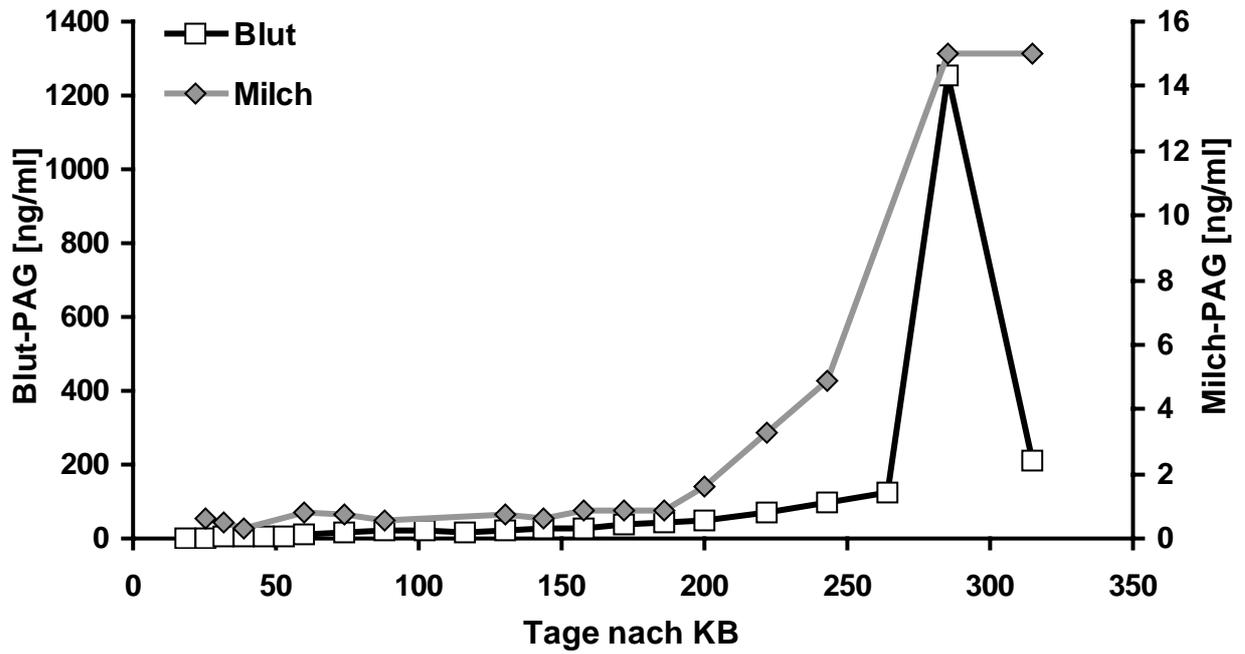
**PAG-Verläufe von Kuh Nr. 368**



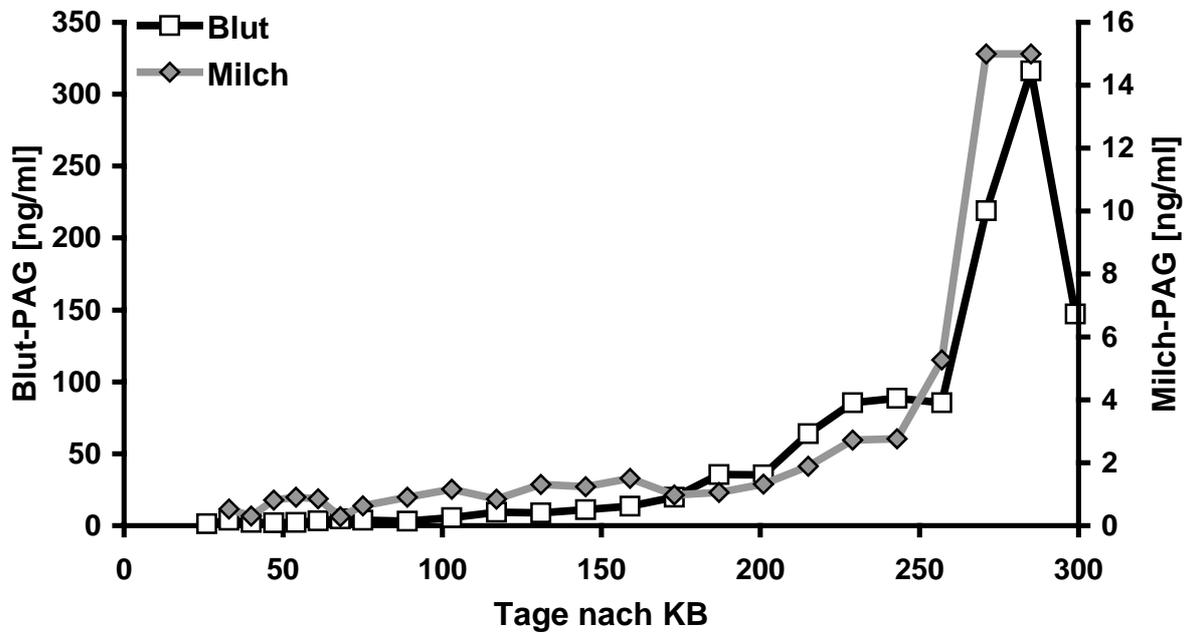
**PAG-Verläufe von Kuh Nr. 373**



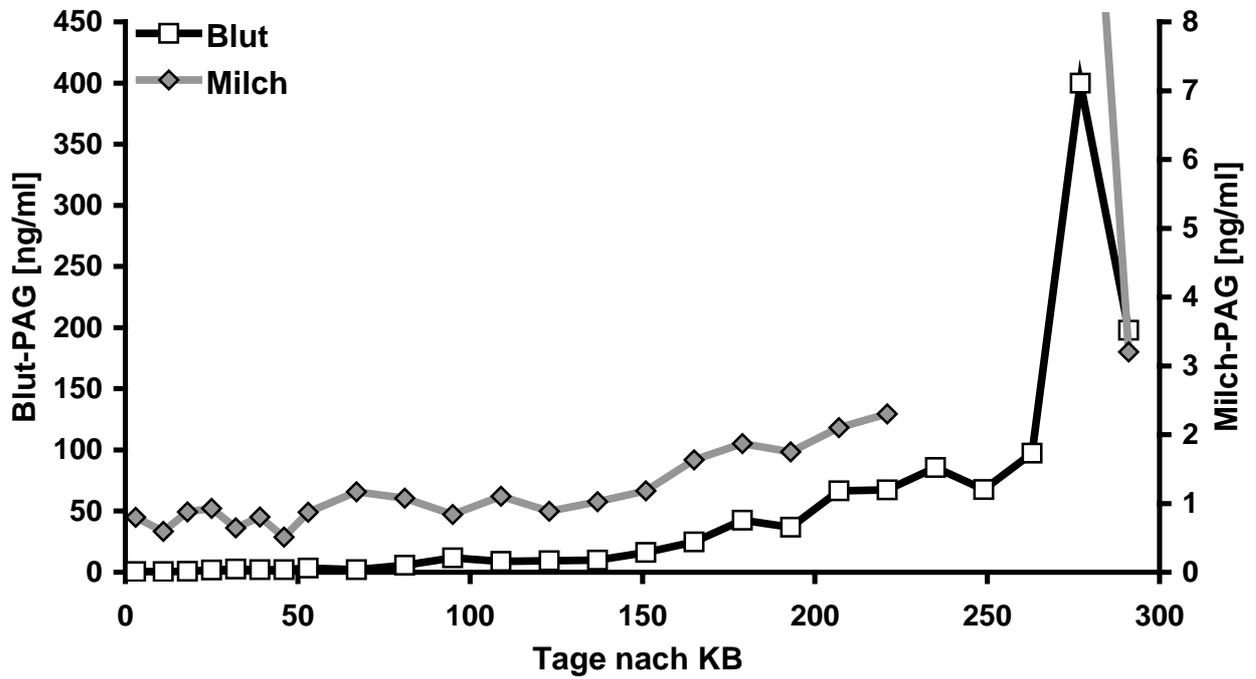
**PAG-Verläufe von Kuh Nr. 375**



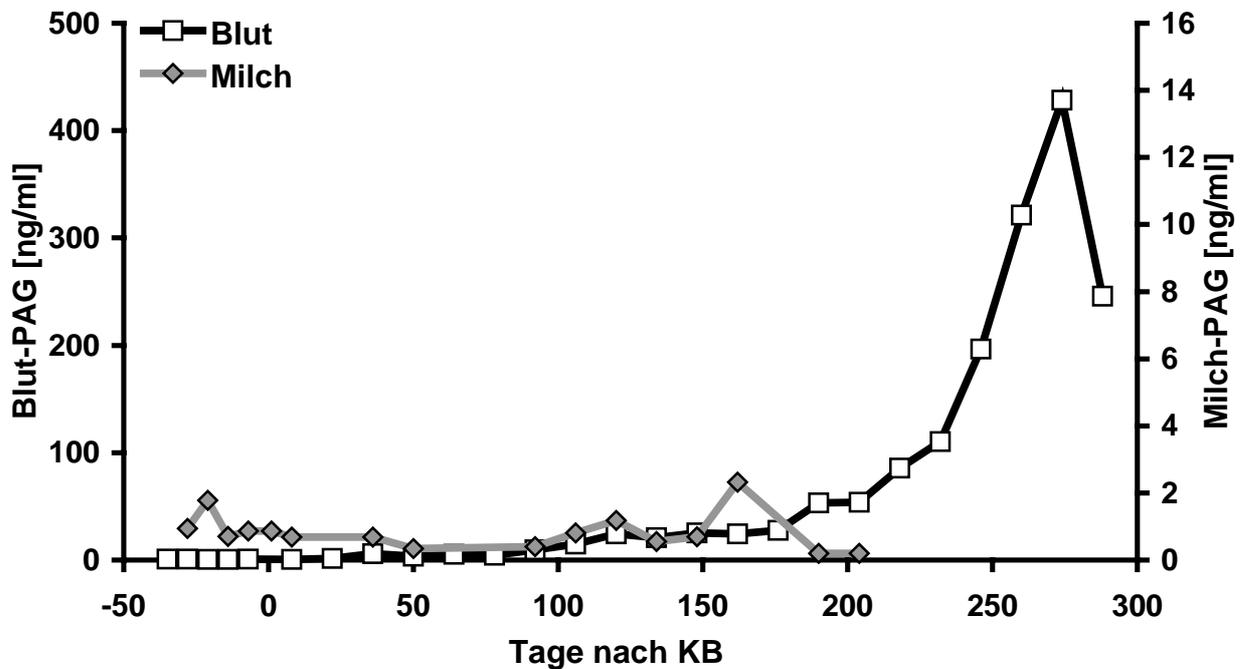
**PAG-Verläufe von Kuh Nr. 378**



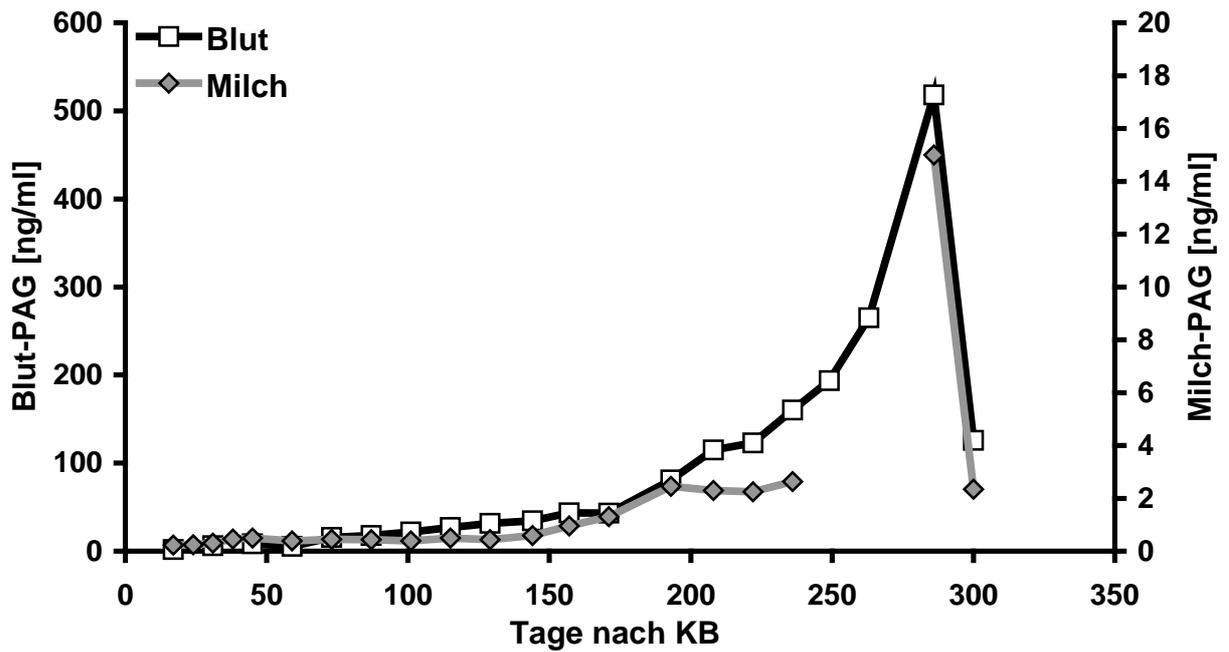
PAG-Verläufe von Kuh Nr. 389



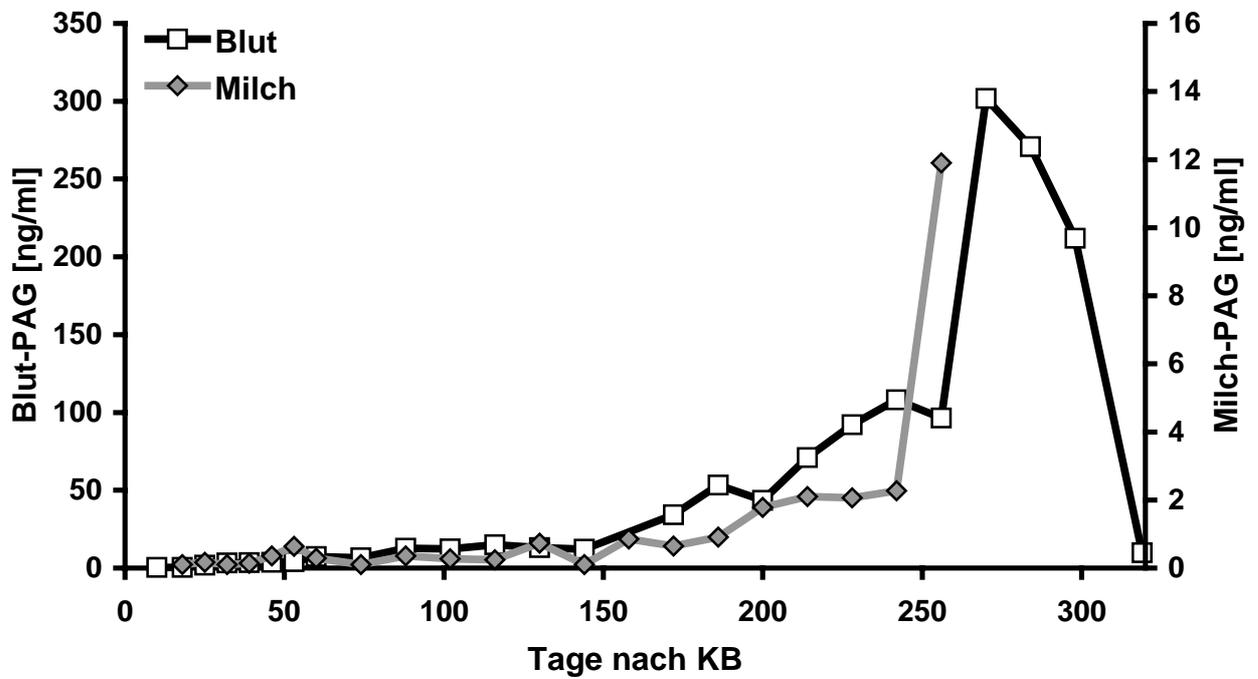
PAG-Verläufe von Kuh Nr. 394



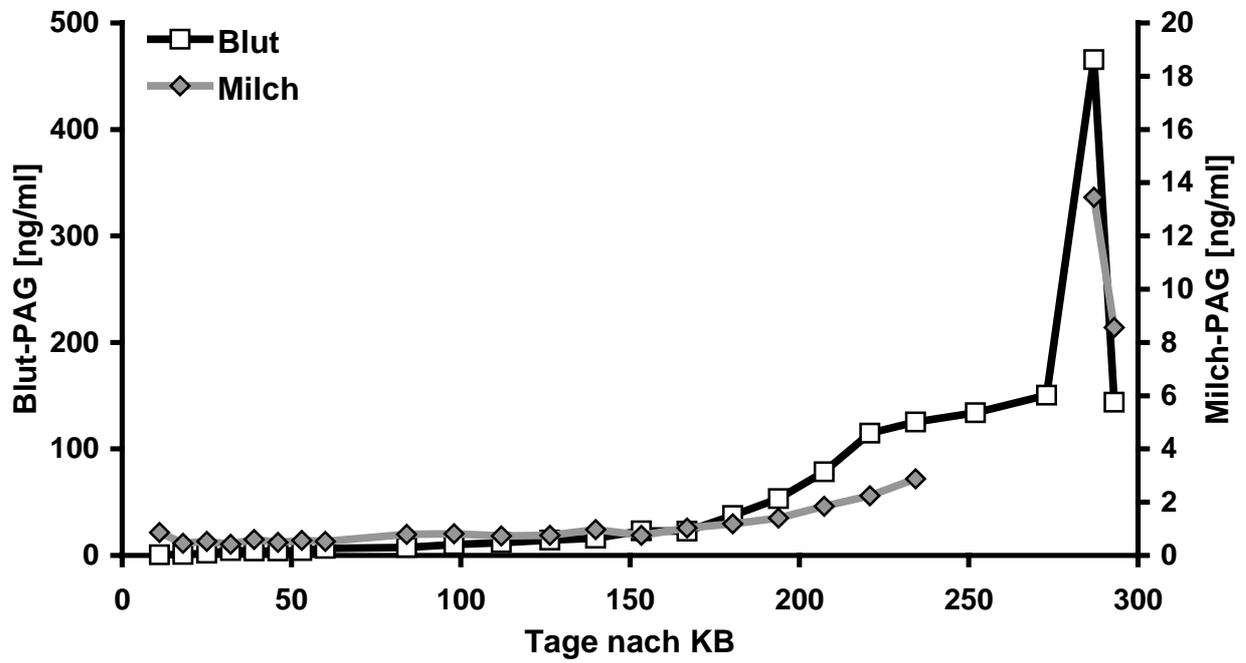
**PAG-Verläufe von Kuh Nr. 398**



**PAG-Verläufe von Kuh Nr. 412**



## PAG-Verläufe von Kuh Nr. 428



## 11.4 Testgenauigkeit

**Tab. B:** Anzahl richtig und falsch erkannter Trächtigkeiten bei verschiedenen PAG-Grenzwerten zu verschiedenen Zeiten nach KB, sowie Verlässlichkeit (%) der PAG-Bestimmung anhand Sensitivität<sup>1</sup> (SE), Spezifität<sup>2</sup> (SP), positivem<sup>3</sup> (PPV) und negativem<sup>4</sup> prädiktivem Wert (NPV). Die Bestätigung der Diagnose erfolgte mittels ultrasonographischer oder rektaler Untersuchung oder der PAG-Bestimmung einer 2. Blutprobe.

Dauer nach KB (d)	Grenzwert (ng/ml)	Positiv		Negativ		SE <sup>1</sup> (%)	SP <sup>2</sup> (%)	PPV <sup>3</sup> (%)	NPV <sup>4</sup> (%)
		Richtig <sup>a</sup>	Falsch <sup>b</sup>	Richtig <sup>c</sup>	Falsch <sup>d</sup>				
<b>26-30</b>	1,5	67	10	27	2	97	73	87	93
	2,0	59	4	33	10	86	89	94	77
	2,5	56	0	37	13	81	100	100	74
<b>31-35</b>	1,5	56	7	24	1	98	77	89	96
	2,0	55	3	28	2	97	90	95	93
	2,5	51	3	28	6	90	90	94	82
<b>36-40</b>	1,5	40	2	14	1	98	88	95	93
	2,0	40	2	14	1	98	88	95	93
	2,5	39	0	16	2	95	100	100	89
<b>&gt;40</b>	1,5	71	2	10	1	99	83	97	91
	2,0	71	0	12	1	99	100	100	92
	2,5	65	0	12	7	90	100	100	63

<sup>a-d</sup>) Vom PAG-Test richtig und falsch erkannte trächtige und nicht trächtige Tiere.

<sup>1</sup>) Anteil vom PAG-Test korrekt trächtig erkannter Tiere. ( $100 \cdot a / (a+d)$ )

<sup>2</sup>) Anteil vom PAG-Test korrekt nicht trächtig erkannter Tiere. ( $100 \cdot c / (c+b)$ )

<sup>3</sup>) Anteil richtiger Diagnosen von den positiven Diagnosen des PAG-Tests. ( $100 \cdot a / (a+b)$ )

<sup>4</sup>) Anteil richtiger Diagnosen von den negativen Diagnosen des PAG-Tests. ( $100 \cdot c / (c+d)$ )

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Holtz danke ich ganz aufrichtig für die Überlassung des für mich sehr interessanten und praxisbezogenen Themas, die finanzielle Unterstützung, das mir entgegengebrachte Vertrauen, sowie das freundschaftliche und konstruktive Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig danke ich herzlich für die unkomplizierte Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Jean Francois Beckers (ULG, Belgien) danke ich für die offene und hilfreiche Zusammenarbeit und die Möglichkeit der informativen und netten Aufenthalte in Belgien. Herrn Dr. Jose Sulon danke ich für die zahlreichen konstruktive Ratschläge während der Entwicklung des Assays und dem Team in Lüttich für die herzliche Zusammenarbeit. Herrn Dr. Karl Klisch, Hannover, möchte ich für die austauschenden Gespräche zum Thema PAG in deutscher Sprache danken. Herrn Dr. Mark Hennies danke ich für die unerschütterlichen Bemühungen auch die kompliziertesten Fragen schnellstmöglich zu beantworten.

Weiterhin möchte ich mich aufrichtig bei Dr. Albert Görlach, Dr. Andreas Kuwer und Dr. Knut Roschlau für die geleistete Mithilfe bei den Versuchen bedanken, ohne welche die Arbeit nicht in diesem Rahmen hätte erfolgen können. Des weiteren möchte ich mich auch bei Nicole Weber, Birgit Sohnrey, Claudia Kaltwasser, Peter Ludewig, Dr. Nina Wildenhayn und besonders bei Elisabeth Stüve für die geleistete Unterstützung in Sachen "Labor" bedanken.

Nicht zu vergessen auch alle anderen Studenten, Doktoranden und Mitarbeiter des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik, die mich auf verschiedenste Art und Weise unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders bedanke ich mich aber bei allen Landwirten und Tierärzten, die es mir gestattet haben, Blut- oder Milchproben von ihren Tieren zu entnehmen.

Bedanken möchte ich mich auch, bei Tierarzt Helmut Hesse für die "ersten Schritte" der Blutentnahme und bei Elke Kalscheuer, für die unermüdlich gesammelten Milchproben und die netten und aufmunternden Gespräche. Ganz besonderer Dank gilt hierbei auch meinem Vater, der alles einmal mit dem schönen Satz kommentierte, dass unsere Kühe in der Zeit meiner Promotion oft mehr Blut als Milch geben mussten.

Meiner Familie und meinen Freunden zu Hause und in Göttingen danke ich aufs Herzlichste für die entgegengebrachte Unterstützung, die in den unterschiedlichsten Formen stattgefunden hat.

Von Herzen bedanke ich mich bei Dr. Judith Reischl für das entgegengebrachte Verständnis und die Unterstützung in der schwierigen Zeit der Promotion. Ihre Hilfe und Motivation hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Eltern gilt ohne Frage mein größter Dank, da sie mir meine Ausbildung ermöglicht und mich zeitlebens, besonders in der Zeit des Studium und während der Fertigstellung dieser Arbeit mit allen Mitteln unterstützt haben.

*Ach, wie eilte so geschwinde  
Dieser Sommer durch die Welt.  
Herbstlich rauscht es in der Linde,  
Ihre Blätter mit dem Winde  
Wehen übers Stoppelfeld..*

*Wilhelm Busch*

## **Lebenslauf**

<b>Name</b>	Morten Friedrich
<b>Geburtsdatum</b>	11.06.1974
<b>Geburtsort</b>	Northeim
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Eltern</b>	Manfred Friedrich (Landwirtschaftsmeister) Angelika Friedrich, geb. Rose (Verwaltungsangestellte)
<b>Schulbildung</b>	1980 Grundschule Kreiensen 1984 Orientierungsstufe Greene/Kreiensen 1986 Roswitha-Gymnasium Bad Gandersheim 1993 Schulabschluss Abitur
<b>Zivildienst</b>	1993 – 1994 Lammetal-Werkstätten Lamspringe
<b>Studium</b>	1994 – 2000 Agrarwissenschaften, Universität Göttingen Studienschwerpunkt Tierproduktion / Biotechnik Abschluss Diplom-Agraringenieur
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	01.09.2000 – 31.12.2002 landwirtschaftlicher Mit- arbeiter, Friedrich-Wille GbR, Ippensen 01.01.2003 – 31.12.2005 wissenschaftlicher Mit- arbeiter am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik in der Arbeitsgruppe Fortpflanzung und Biotechnik, Prof. Dr. W. Holtz

Göttingen, im März 2006





