

**ERHOBENE BEFUNDE IN VERSCHIEDENEN ZYKLUSSTADIEN UND
KORRESPONDIERENDE PROGESTERONWERTE (RIA, MAGERMILCH;
EIA, VOLLMILCH)**

Selim Aslan¹

Değişik siklus dönemlerinde elde edilen bulgular ve karşılaştırılan Progesteron değerleri (RIA, Yağsız süt; EIA Yağlı süt)

Özet: *Bu çalışmada, progesteron ölçüm yöntemleri olan Enzimimmunoassay (EIA; semiquantitatif) ve Radioimmunoassay (RIA; quantitatif) testleri karşılaştırılmış ve kullanılan test yöntemlerinin alınan sonuçlar bakımından birbirine eşdeğer olup olmadığı araştırılmıştır; ayrıca bu progesteron ölçüm yöntemleri ve ultrasonografi ile desteklenmiş olan rektal palpasyon bulguları arasındaki uygunluk saptanmaya çalışılmıştır.*

Bu amaçla 75 inekten (Alaca) toplam 312 süt örneği alınmış (RIA = 136, EIA = 176) ve değerlendirilmiştir. Örnekler, folliküler dönemde, corpus luteum peryodunda, ilk tohumlama zamanında ve tohumlamadan sonra gebeliğin saptanması amacıyla alınmıştır. RIA testi radyo immunolojik olarak değerlendirilmiştir. EIA Ovucheck (R) testi ise sarı tonun farklılığına bağlı olarak < 5 ile > 10 arasında değişen 7 ayrı Progesteron değerine ayrılmıştır.

Finekolojik kontroller doğumdan sonra 12. gün başlayıp, 1-3 günlük aralarla folliküler aktivite saptanıncaya değin devam etmiştir. 2 günlük kontrol ritminin sürdürülmesiyle corpus luteum (Cl) ve ilk tohumlama peryodu izlenmiştir. Gebeliğin saptanması ise 40.-45. ve 60.-70. günler arasında yapılmıştır. Sonuçlar ultrasonografi desteği ile kontrol edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, saptanan progesteron değerleri ve ultrasonografi ile desteklenmiş rektal palpasyon arasında % 90,1 uyumluluk olduğunu göstermiştir. İki ölçüm yöntemi olan RIA ve EIA arasındaki farkın çok az olduğu saptanmıştır ($r=0,962$).

Semiquantitatif test olan Ovucheck'ten çabuk sonuç alındığından dolayı pratikte avantaj oluşturmaktadır.

¹ Dr.Araş.Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprod. Hast. B.D.

Zusammenfassung: *In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob mit den beiden zur Verfügung stehenden Progesteronmeßverfahren-Enzymimmuntest (EIA; Semiquantitativ) und Radioimmuntest (RIA; Quantitativ)-vergleichbare Ergebnisse zu erzielen sind. Andererseits wurde überprüft, ob zwischen, mit Ultraschalluntersuchungen untermauerten, Ergebnissen der rektalen Palpation und beiden Progesteronverfahren eine Kongruenz besteht. Mit diesem Zweck wurden von 75 Kühen (Braunvieh) insgesamt 312 Milchproben entnommen (RIA=136, EIA=176) und ausgewertet. Die Entnahme erfolgte zu folgenden Zeitpunkten: Follikelpphase, Gelbkörperperiode, 1. K.B. (erste Künstliche Besamung), nach der K.B. (zur Trächtigkeitsfeststellung). Die Auswertung der Ergebnisse des RIA-Tests erfolgte radioimmunologisch, die Ergebnisse des EIA-Tests wurden anhand unterschiedlicher Gelbfärbungen auf 7 Progesteronwerte zwischen <5 und >10 ng/ml geschätzt. Die gynäkologischen Kontrollen erfolgten ab 12. Tag p. p. bis zur Feststellung der ersten Follikuläraktivität in 1-bis 3-tägigen Intervallen. Mit der Fortsetzung des 2-tägigen Untersuchungsrythmus wurde auch die Gelbkörper- und die 1. K.B -Periode überwacht. Die Trächtigkeitsfeststellung wurde zu den Terminen 40. - 45. Tag p. ins. und 60.-70. Tag p. ins. durch rektale Untersuchung erhoben. Die Befunde wurden mit intergrierten Ultraschalluntersuchungen überprüft.*

Die erzielten Ergebnisse zeigten, daß zwischen den erhobenen Progesteronwerten einerseits, und den mit Ultraschall gestützten, konsequent durchgeführten rektalen Explorationen andererseits, eine gute (90, 1 %) Kongruenz besteht.

Es stellte sich heraus, daß zwischen den Ergebnissen aus beiden Meßverfahren (RIA, EIA) ein geringer Unterschied bestand (Der Korrelationskoeffizient betrug $r=0,962$). Die schnelle Anwendungsmöglichkeit des Semiquantitativtests (Ovucheck (R)) bringt für die Praxis einen Vorteil.

Einleitung

Die in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß das Gelbkörperhormon Progesteron in der Regulation des Sexualzyklus und für die Aufrechterhaltung der Trächtigkeit eine zentrale Stellung einnimmt (3,7). Es konnte festgestellt werden, daß die Bestimmung von Progesteron (P4) öfters Beweise über die Ovarfunktion bringt (4,5,8).

Fruchtbarkeitsanalysen mittels des Milchprogesterontests sind inzwischen zur Routine geworden. Anhand der Progesteronbefunde

können die klinischen Befunde korrigiert, die erhobenen Overbefunde überprüft werden (2,3,9).

In dieser Arbeit war zu überprüfen, ob mit zwei unterschiedlichen Milchprogesterontestverfahren, dem Enzymimmuntest (EIA; Semiquantitativ) und dem Radioimmuntest (RIA; Quantitativ) vergleichbare Ergebnisse zu erzielen sind. Außerdem wurde überprüft, inwieweit zwischen den Rektalbefunden und den objektivierten Befunden der Progesteronbestimmung eine Übereinstimmung besteht. Ausserdem wurde in Vorversuchen durch Ultraschalluntersuchungen überprüft (Fa. Pic Medical, Linearrektalschalkopf, 5 Mhz)), inwieweit eine Übereinstimmung zwischen Vergleichsmessung und tatsächlichen Werten (integrierte Messung im Ultraschall-scanner) besteht.

Material und Methode

Die Untersuchungen zu vorliegender Arbeit wurden in der Zeit von November 1987 bis November 1989 auf dem Lehr- und Forschungsgut Merkenstein der Universität Wien durchgeführt.

Das Kollektiv bestand durchwegs aus 75 österreichischen Braunviehrindern im Durchschnittsalter von $4,6 \pm 2,2$ Jahren. Als Versuchstiere dienten ausschließlich Kühe, die sich zu Versuchsbeginn am 15. Tag nach der Erstkalbung befanden.

Die Fütterung bestand im Sommer aus Luzernegras, Maissilage und Heu, im Winter aus Maissilage und Heu. Durch Zugabe von Mineralstoffen und Kraftfutter erfolgte eine leistungsgerechte Ergänzung der Ration. Gemolken wurden die Tiere 2 x pro Tag. Über eine Rohrmelkanlage wurde die Milch in eine vom Stall getrennte Milchkammer geleitet. Die Jahresmilchmenge pro Kuh lag im Durchschnitt zwischen 3500 und 6500 Liter bei einem mittleren Fettgehalt von 3,5 bis 4,5 %. Im Durchschnitt hatten die Kühe nach einer Graviditätsdauer von $278,3 \pm 5,7$ Tagen abgekalbt.

Die Tiere wurden bis zum Nachweis eines Follikels in 1- bis 3-tägigen-Intervallen ab 12. Tag p.p. untersucht. Nach der Feststellung des Follikels wurde im 2-tägigen Rythmus die rektale Palpation durchgeführt, und dadurch war es möglich, die Überwachung der Gelbkörperperiode fortzusetzen. Bei eingetretener Konzeption wurde zu den Terminen 40.- 45. Tag nach der Besamung (p. ins.) und 60.-

70. Tag p. ins. der Trächtigkeitsbefund durch die rektale Untersuchung erhoben. Die rektale Exploration wurde auch durch intergrierte Ultraschalluntersuchungen überprüft und mit der Bestimmung des Progesterongehaltes in der Milch wurden die klinischen Befunde ergänzt.

Die Messung des Milchprogesterongehaltes erfolgte aus dem Nachgemelk der Kuh. Die Proben wurden mit Natriumazid konserviert und bis zur Aufarbeitung bei -18°C aufbewahrt. Für die Progesteronbestimmung stand bei 45 Tieren ein Schnelltest (Ovucheck) der Fa. Cambridge life science zur Verfügung. Die restlichen Proben (30 Tiere) wurden am Institut für Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien nach der Methode von Möstl (6) radioimmunologisch bestimmt.

Das Ovucheck-Reaktionsprinzip beruht darauf, daß sie das freie Progesteron in der Standardlösung und in der Probe sowie eine bestimmte zugeetzte Progesteronmenge (markiert durch das Enzym Alkalische Phosphatase = AP) kompetitiv an einen in begrenzter Menge vorhandenen Progesteron-spezifischen Antikörper binden. Die gebundene, durch AP markierte Progesteronmenge, ist umgekehrt proportional zum Progesteron in der Probe. Nach Substratzugabe und Inkubation erfolgt der Farbvergleich (visuell oder mittels Spektrophotometer) mit den 4 Standardlösungen (1,5, 10 und 30 ng/ml), die sich in der Intensität ihrer Gelbfärbung unterscheiden. Nach unserer Unterteilung, basierte die Mengenangabe beim Ovucheck (R) auf Zuordnungen von Gelbnuancen zu 7 Progesteronwerten, die von <5 bis >10 ng/ml reichten. Die Schätzung erforderte eine Gewöhnung. Um den bei diesem Verfahren möglichen Fehler gering zu halten, wurde jede Probe doppelt angesetzt und beurteilt.

Ergebnisse

Bei 75 Kühen wurden insgesamt 312 Milchproben (RIA = 136; EIA = 176) während der Follikelphase ($n=97$), der Gelbkörperperiode ($n=67$), der Zystendiagnose ($n=11$), zum Zeitpunkt der I.K.B. ($n=84$), und nach der K.B. zur Trächtigkeitsfeststellung ($n=64$) entnommen.

Parallel zum Follikelbefund am Ovar erbrachte die semiquantitative Messung des P4-Gehaltes (EIA) in je 24,5 % ($n=11+11$) der Fälle P4-Konzentrationen <5 und ≤ 5 .Progesteronwert = 5 wur-

de in 44,4 % (n=31) der Proben gemessen. 2 Kühe (4,4 %) hatten in der Follikelperiode einen Wert $P_4 = > 5 < 10$, und ein Tier (2,2 %) $P_4 = 10$ ng/ml. Die Gelbkörperperiode wurde in 66,6 % (n=21) der Fälle von einem P_4 -Wert 10 bis > 10 ng/ml begleitet. 7 Tiere (16,7 %) hatten einen P_4 Wert der $> 5 < 10$ zeigte. 11,9 % (n=5) zeigten den wert $P_4 = 5$ ng/ml. Der niedrigste Meßbereich ($P_4 < 5$ ng/ml) wurde bei einem Tier (2,4 %) in dieser Periode notiert. Unter den 34 Probanden fanden sich 6 (14,3 %) mit niedrigem P_4 -Gehalt in der Milch ($> 5, = 5$) aber die Gelbkörpern an den Ovarium hatten. Zum Zeitpunkt der 1. K.B. erbrachte die P_4 - Messung in 97, 6 % (n=58) der Fälle P_4 -Werte bis zu 5 ng/ml ($23,8 = P_4 \leq 5$ ng/ml; $19,0 \% = P_4 < 5$ ng/ml; $54,8 \% = 5$ ng/ml). Ein Proband (2,4 %) hatte bei der ersten Besamung einen Wert von 10 ng/ml (Abb.; 1 und 3).

19-21 Tage nach der Besamung entnommene Proben bei 21 Tieren nahmen einen Wert zwischen 10 und > 10 an. 6 Tiere, bei denen zu dieser Zeit Werte von < 5 und $= 5$ erzielt wurden, waren nicht trchtig.

Allerdings erreichten auch diese Tiere nach der zur Trächtigkeit führenden Besamung Werte von 10 oder > 10 ng/ml. Somit war der Rektalbefund trchtig zu 100 % von erhöhten Progesteronwerten begleitet.

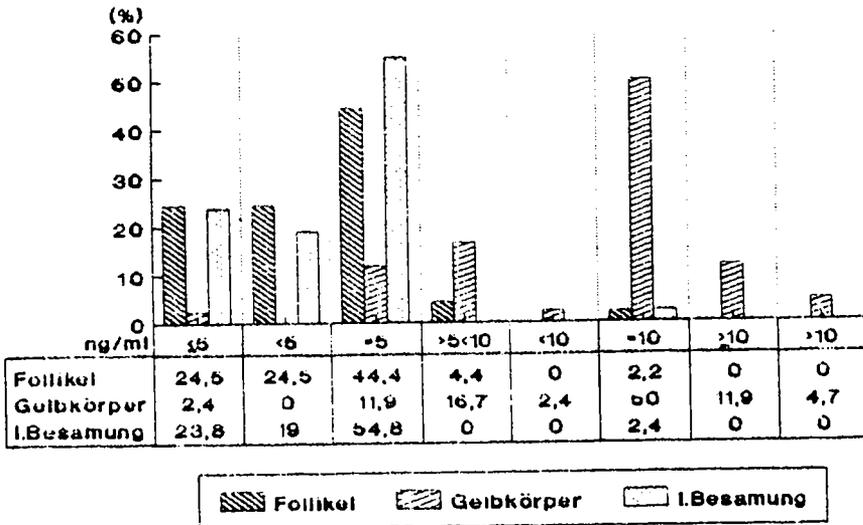


Abb. 1. Progesteronwerte (EIA) in verschiedenen Zyklusstadien

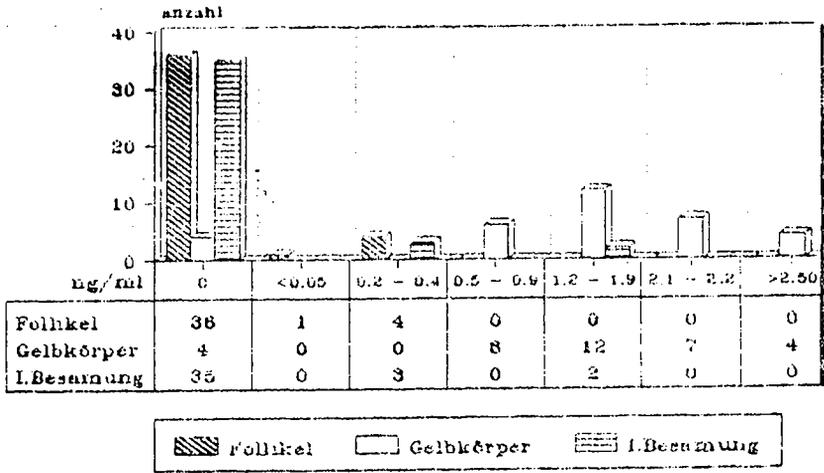


Abb. 2. Progesteronwerte (RIA) in verschiedenen Zyklusstadien

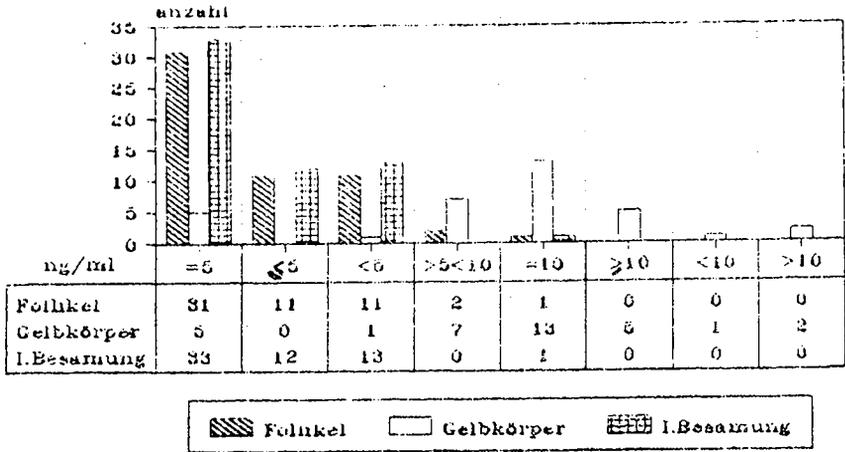


Abb. 3. Erhobene Befunde in der Follikel-Gelbkörper- und I. Besamungsphase und korrespondierende Progesteronwerte (EIA/VOLLMILCH)

Die in der Magermilch mittels RIA gemessenen Progesteronwerte während der Follikelphase (n=41), der Gelbkörperperiode (n=33) und der 1. K.B. (n=25) sind in den Abbildungen 2 und 4 graphisch dargestellt.

In 87,8 % ($n=36$) der Proben konnte beim Nachweis eines Follikels kein Progesteron festgestellt werden (0 ng/ml). Ein Tier (2,4 %) hatte eine P4-Konzentration zwischen 0 und 0,05 ng/ml. Bei 9,8 % ($n=4$) der Probanden mit Eibläschen enthielt die Milchprobe einen P4-Wert im Bereich von 0,21–0,43 ng/ml. Die klinischen Befunde fanden im niedrigen Progesteronspiegel insofern eine Bestätigung, als ausschließlich Follikel verschiedener Reifestadien an den Eierstöcken dominierten.

Während der Gelbkörperperiode erreichten 48 % ($n=12$) der Tiere P4-Werte von 1,22–1,92 ng/ml. 12 % ($n=11$) der Kühe wiesen höhere P4-Konzentrationen auf (8 % = 2,08–2,19 ng/ml; 4 % = >2,50 ng/ml), 40 % ($n=10$) niedrigere. Von diesen 40 % waren bei 24 % die P4-Gehalte zwischen 0,48 – 0,91 ng/ml und bei den restlichen 16 % ($n=4$) kein Progesteron nachweisbar. Der bei 4 Rindern nachgewiesene Milchprogesterongehalt von 0 ng/ml bestätigte das Vorliegen von Follikeln anstatt eines Gelbkörpers. Diese Bestätigung wurde mit Ultraschallbildern befestigt. Zum Zeitpunkt der 1. K.B. betrug der Prozentsatz an Tieren ohne P4-Gehalt in der Milch 80% ($n=20$). 20 % ($n=5$) wurden bei einem P4 Wert von 0,21–0,43 ng/ml und bei 1,22–1,92 ng/ml besamt.

19–21 Tage nach der 1.k.B. wurde bei 25 Kühen ein P4-Wert von 2,2–9,6 ng/ml festgestellt. Bei Kühen, die eine 2. und 3. Besamung benötigten ($n=12$), lagen die Meßwerte nach erfolgreicher k.B. ebenfalls in diesem Bereich (2,2–9,6 ng/ml). Die anhand von Trächtigkeitsgelbkörpern gestellte Diagnose ging durchwegs mit erhöhten Milchprogesteronwerten einher; die Übereinstimmung betrug 100 %.

Von den 11 mit Zysten behafteten Tieren wurde die Milch ebenfalls auf den Progesterongehalt hin untersucht. Es stellte sich heraus, daß sich die Mengen wohl in weiten Grenzen bewegten, mit 0,75 – 0,8 ng/ml jedoch einen Hinweis auf eine Lutealaktivität lieferten, der auch mittels Ultrasonografie festgestellt werden konnte.

Die Gegenüberstellung der erhobenen Progesteronkonzentrationen zeigte eine gute Übereinstimmung zwischen EIA und RIA. Der Korrelationskoeffizient betrug $r=0,952$. Diese Gegenüberstellung zeigte nun auf, daß sowohl zwischen den palperten Follikeln und den niedrigen Progesteronwerten einerseits, und der eindeutigen C.1.-Struktur und den hohen Progesteronspiegeln andererseits, eine gute Übereinstimmung bestand (Abb.; 5).

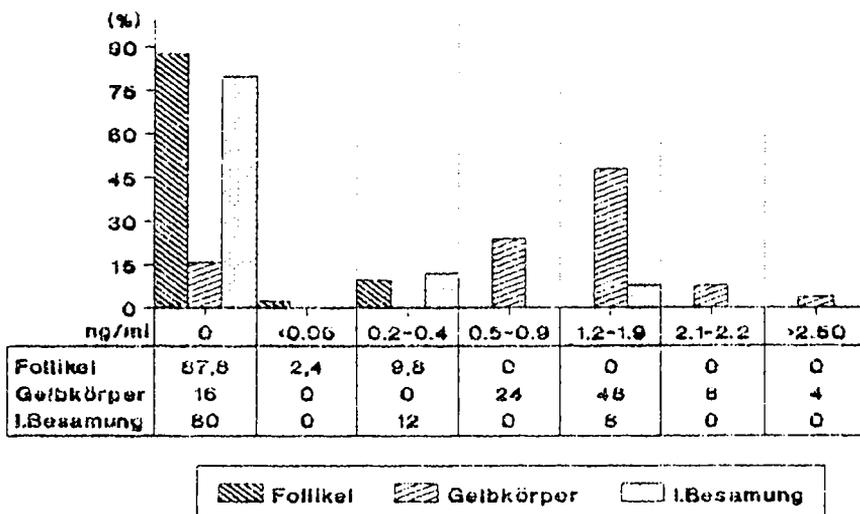


Abb. 4. Erhobene Befunde in der Follikel-Gelbkörper- und I. Besamungsphase und korrespondierende Progesteronwerte (RIA/MAGERMILCH)

Die Untersuchungen zeigten, daß zwischen geschätzten und mittels Ultraschall gemessenen Ovarbefunden durch einen Korrelationskoeffizienten von $r=0,930$ eine gute Übereinstimmung beider Bestimmungsverfahren ermittelt werden konnte.

Diskussion

Durch den Milchprogesterontest (RIA = 136; EIA = 176) am Tage der Applikation (während der Follikelphase = 97 Proben) und 7-9 Tage danach (Gelbkörperperiode = 67 Proben) sollten die zyklischen Vorgänge am Ovar objektiviert werden. Auch bei nach der Medikation entstandenen Gynäkopathien (Zysten; $n=11$ Proben) wurde der Milchprogesteronwert bestimmt. Weiters erfolgte ein Vergleich der Rektalbefunde der besamten ($n=84$ Proben) und trächtigen Kühe ($n=64$ Proben) mit den Progesteronergebnissen. Der Nachweis der Progesterongehalte in der Milch ermöglicht indirekt die Ovarfunktion zu überwachen. Ein niedriger Wert weist auf das Vorhandensein eines Reiffollikels hin, während ein inkretaktiver Gelbkörper sich durch entsprechend höhere Progesterongehalte in der Milch zu erkennen gibt. Der bei Eierstocksdysfunktion niedri-

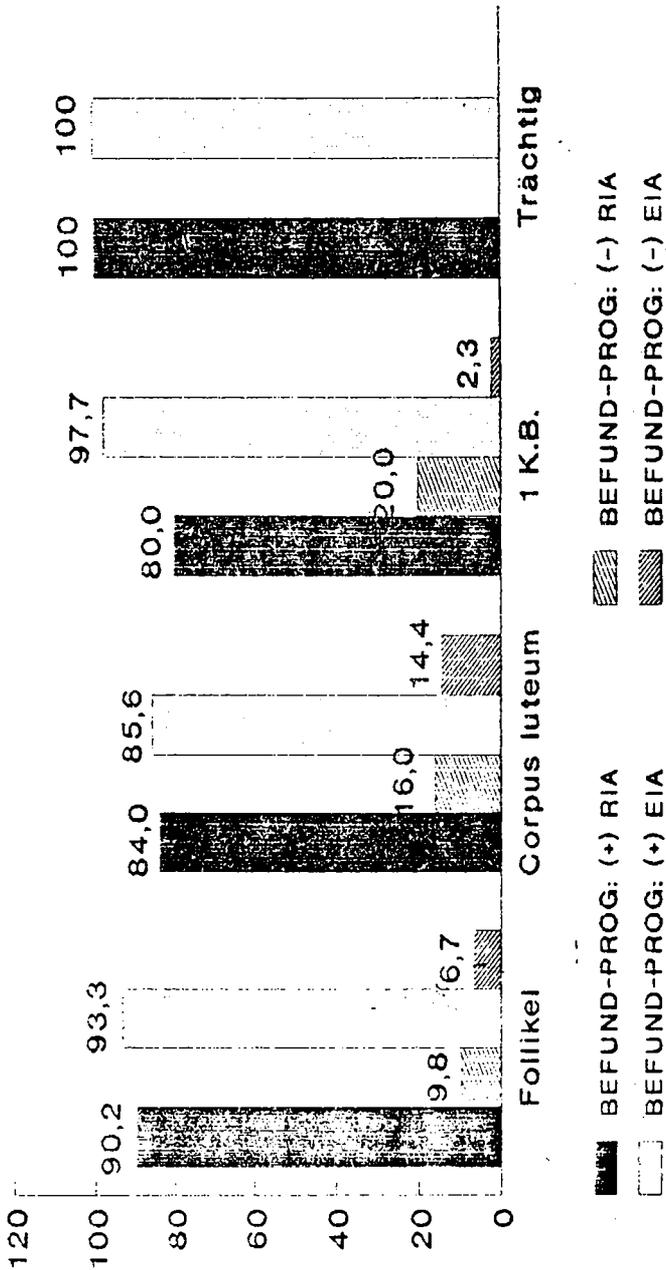


Abb. 5. Vergleich der Rektalbefunde mit den Milch-Progesteronwerten

gere P4-Wert kann nur durch eine klinische Untersuchung richtig interpretiert werden.

Die Werte der Milchprogesteronkonzentrationen der Tiere gaben aufschlußreiche Informationen. So konnte bei 88 % der 164 Progesteronbestimmungen (RIA + EIA) der vorher klinisch diagnostizierte Zyklusstand bzw. Ovarbefund (Follikel, Gelbkörper) weitgehend bestätigt werden; 12 % der Milchproben wiesen auf Fehler in der Diagnose oder Interpretation der erhobenen Befunde hin. Bei diesen 17 Fehldiagnosen wurde klinisch ein Follikel diagnostiziert (7 Mal), obwohl es sich aufgrund der Progesteronbestimmungen um Ausbildungsformen des Corpus luteum im frühen Funktionsstadium handelte. Bei den 10 falschen Diagnosen der Gelbkörper handelte es sich nach Messungen des Progesteronspiegels (0 ng/ml bzw. =5 ng/ml) um Follikeln. Die retrospektive Überprüfung der falschen Aussagen über Funktionskörper mit den Ultraschallbildern haben gezeigt, daß die Progesteronergebnisse mit den Bildern 100 % übereinstimmten. Das Ausmaß fehlerhafter Diagnosen bei transrektaler Palpation geben Berger (1) und Hocke (4) mit 21,6 % bis 25 % an.

Eine besondere praktische Bedeutung hat die Kontrolle der Besamung durch gleichzeitige P4-Messungen.

Anhand der Progesteronergebnisse stellte sich heraus, daß 8,9 % der Tiere (n=6) zum falschen Zeitpunkt besamt wurden. Bei 90,1 % (n=16) der Kühe fand die Besamung zum optimalen Zeitpunkt statt.

Günzler (3), Hocke (4), Schopper (7) stellten in ihren Untersuchungen einen noch weit höheren Anteil falscher Besamungstermine fest (15 %, 21,7 % bzw. 22,3 %).

Die niedrigen Progesteronresultate stimmten retrospektiv betrachtet mit den trächtig gewordenen Tieren 100 % - gig überein.

Die erzielten Ergebnisse wiesen darauf hin, da zwischen den bestimmten Progesteronproben einerseits und den mit Ultraschall-gestützten konsequent durchgeführten Rektalpalpationen andererseits eine gute (90,1 %) Kongruenz besteht. Der Vergleich zwischen EIA - und RIA-Testverfahren hat gezeigt, daß die Unterschiede sehr gering sind. Der Korrelationskoeffizient betrug $r=0,962$. Es ist anzunehmen, daß der Semiquantitativtest wegen der schnelleren Auswertungsmöglichkeiten in der Praxis mit Sicherheit anwendbar ist. Damit können Befundfehler rasch korrigiert werden.

Literaturverzeichnis

1. **Berger, G.** (1987). *Zur Methodik und Ergebnissen der Zyklus- und Ovardiagnostik bei Kühen.* Mh. Vet. - Med., 42: 121-123.
2. **Bostedt, H., Kozicki, L.E., Finger, K.H. und Karg, H.** (1983). *Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Haltungsbedingungen auf postpartale Regenerationsvorgänge am Genitaltrakt von Milchkühen unter besonderer Berücksichtigung der Progesteronprofile.* Zucht-hyg., 20: 17-33.
3. **Günzler, O., Korndörfer, L., Lohoff, H., Hamburger, R., Hoffmann, B.** (1975). *Praktische Erfahrungen mit der Progesteronbestimmung in der Milch zur Erfassung des Fertilitätszustandes bei der Kuh.* Tierärztl. Umschau, 30: 111-117.
4. **Hocke, P.** (1987). *Sterilitätsprophylaxe bei Bullenmüttern (Milchprogesteronwert-Besamungsergebnisse).* Zucht-hyg., 22: 14-23.
5. **Kozicki, L.E.** (1982). *Über den postpartalen Zyklusverlauf bei Kühen unter verschiedenen Haltungsbedingungen, darstellt anhand von klinischen Erhebungen und von Progesteronbestimmungen in Milchproben mit Hilfe des Enzymimmuntests und Radioimmuntests.* Vct. Diss., Gießen.
6. **Möstl, E., Choi, H.S., Bamberg, E.** (1985). *Stimulation of androgen and oestrogen concentrations in plasma of cows after administration of a synthetic glucocorticoid (flunethason) at the end of gestation.* J. Ender., 105: 121-126.
7. **Schopper, D., Schemer, R., Claus, R.** (1983). *Analyse der Fruchtbarkeitssituation von Milchkühen post partum in Praxisbetrieben anhand von Progesteronprofilen.* Zucht-hyg., 24: 67-78.
8. **Schallenberger, E.** (1990). *Charakterisierung von Sekretionsrhythmen der Gonadotropine und Ovarsteroiden während des Brunstzyklus, der Gravidität und post partum beim Rind.* Fortschritte der Veterinärmedizin, 40: 90-91.