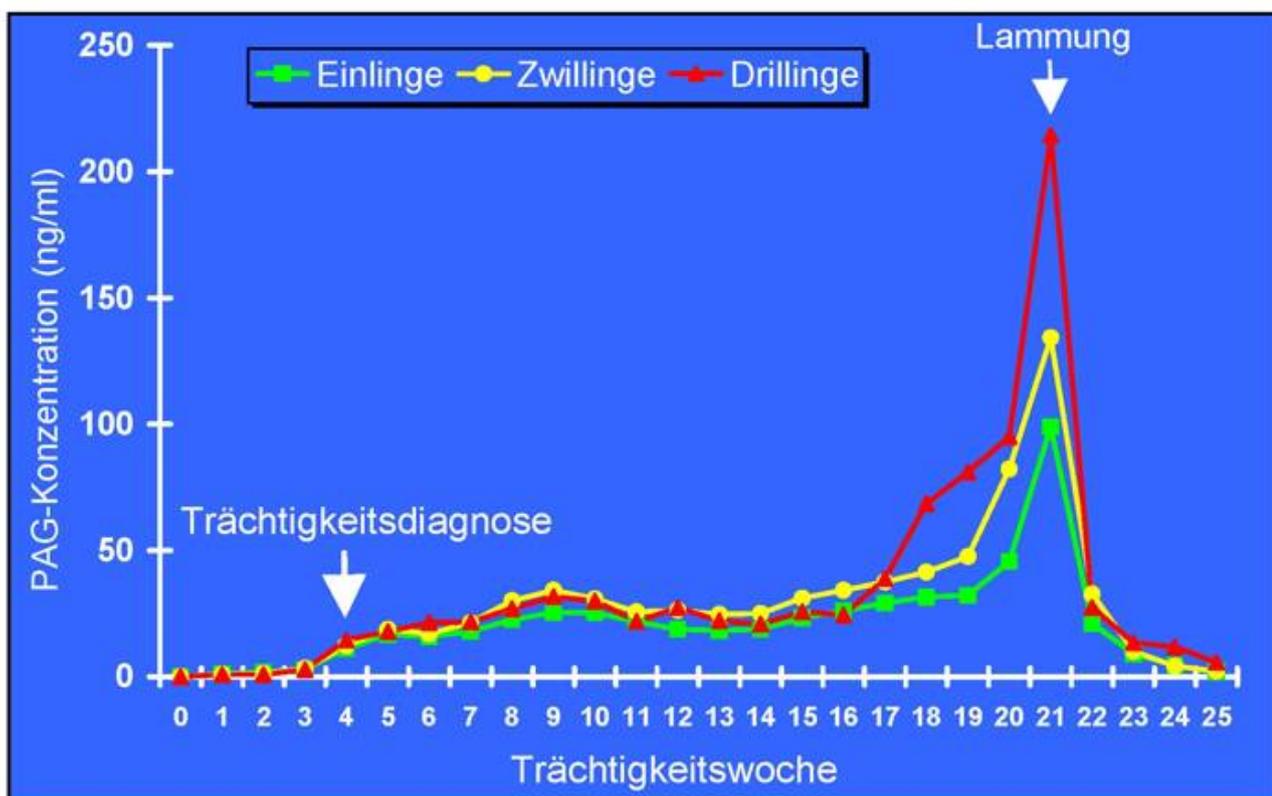


## Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) im Blut vom Schaf und Östrogen-Konzentration im Kot der Ziege als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsdiagnose



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

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

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

vorgelegt von

**Rogelio A. Ledezma Torres**

Tierarzt M. Sc., geboren in Monclova, Mexiko

Göttingen, im November 2002

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

## **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

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

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

D7

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

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](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, 2002  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-589-3

**Meiner Frau**



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

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

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

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

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

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

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

### Abkürzungen

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

## Abkürzungen

---

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

## 1. Einleitung

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

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

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Trächtigkeitsdiagnose bei kleinen Wiederkäuern

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

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

## **2.2. Trächtigkeitsdiagnoseverfahren**

### **2.2.1. Späte Trächtigkeitsdiagnose**

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

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

### **2.2.2. Diagnose in der Trächtigkeitsmitte**

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

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

### **2.2.3. Frühe Trächtigkeitsdiagnose**

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