

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)

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2006
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

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

1. Auflage, 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
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
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
3. Material und Methoden	35
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
4.	Ergebnisse	57
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
5.	Diskussion	86
5.1	ELISA-Entwicklung	86
5.2	Verlaufskurven der PAG-Konzentration bei trächtigen Tieren	91
5.3	Trächtigkeitsdiagnose mittels PAG-Nachweis	93
6.	Zusammenfassung	101

7.	Summary	103
8.	Literaturverzeichnis	105
9.	Abbildungsverzeichnis	120
10.	Tabellenverzeichnis	123
11.	Anhang	125
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 ₄	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
Σ	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"