

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden auf einem Milchviehbetrieb in Sachsen-Anhalt durchgeführt. Im Versuchszeitraum umfaßte die Herde durchschnittlich 424 Milchkühe und 339 Färsen. Der Anteil an Erstkalbinnen lag bei 26% (Remontierungsanteil aus eigener Nachzucht), der Anteil trockenstehender Rinder bei 14%. Die Aufzucht der weiblichen Rinder erfolgt auf dem Betrieb. Die Milchviehherde umfaßte Tiere zwischen 2 und 12 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter bei etwa 4,5 Jahren lag. Die Herde bestand zu Versuchsbeginn noch aus 0,5% Kühen der Rasse Jersey, bei Versuchsende zu 100% aus Tieren der Rasse Deutsche-Schwarzbunte. Aus ehemals Schwarzbunten Milchrindern bestehend, wurde seit 1990 durch Verdrängungszüchtung in eine Herde mit steigendem Holstein Frisian (HF) Blutanteil umgezüchtet. Während des Versuchszeitraums lag der HF-Anteil je nach Alter der Tiere zwischen 50 (Alttiere) und 87,5% (Jungtiere).

Es wurden nur Tiere in die Untersuchungen und anschließende Auswertung einbezogen, die zum Zeitpunkt der fünften Puerperalkontrolle (70. Tag post partum) noch nicht von der Zucht ausgeschlossen worden waren.

Die durchschnittliche Laktationsnummer aller 217 in den Versuch aufgenommenen Kühe lag bei 3,1. Die Laktationsnummern der Tiere, deren Progesterongehalt analysiert wurde (n=127) sind aus Tabelle 04 ersichtlich.

Tabelle 04: Laktationsnummern der nach dem Progesterongehalt ausgewerteten Tiere (n=127)

Laktationsnummer	Gesamt
1. Laktation	37 (29,1%)
2. Laktation	24 (18,9%)
3. Laktation	29 (22,8%)
> 3. Laktation	37 (29,1%)
Gesamt	127 (100%)

3.1.1.1. Fütterung

Als Grundfuttermittel wurde einmal täglich eine Totale Mischration (TMR) aus betriebseigenem Anbau vorgelegt. Diese wurde nachmittags einmal nachgeschoben. Als einzelne Komponenten standen Maissilage, Anwelksilage, Ganzpflanzensilage, Grassilage und Lieschkolbenschrot zur Verfügung. Die Kraftfutterkomponenten Getreide, Biertreber, Sojaextraktionschrot und Rapsextraktionsschrot standen außerdem bereit. Weiterhin wurden Mineral- und Ergänzungsfuttermittel (Propylenglycol, Methionin, Carotin) eingesetzt. Die Rationen wurden entsprechend der Eingruppierung der Kühe nach Leistung und Laktationsstadium für fünf Leistungsgruppen berechnet (35, 25, 15 kg Tagesmelk, Trockengestellt 6 Wochen ante partum, Vorbereitet 2 Wochen ante partum). Tieren der ersten Laktationsgruppe bis zum 30. Laktationstag sowie der Vorbereitungsgruppe wurde zusätzlich Propylenglykol, ein Aminomix mit einem geschützten Methionin (Fertigfutter 49,25% Sojaschrot, 49,25% Maiskleber, 1,5% Mepron M85) und eine erhöhte Menge Mineralfutter (Anionen Sulfat und Chlorid) in die TMR eingemischt.

3.1.1.2. Haltung

Die gesamte Herde der Milchkühe wurde in zwei Milchviehanlagen (MVA) in Boxenlaufställen gehalten. Die Kühe wurden nach Leistung und Laktationsstadium in Gruppen mit bis zu 50 Tieren eingeteilt. Milchviehanlage I bestand aus Tiefboxen mit einer Einstreu aus Sägespänen und planbefestigten Laufflächen mit Schieberentmistung. In Milchviehanlage II wurde die Tiere auf Hochboxen mit einer aus Sägespänen bestehenden Einstreu auf Gummimatten und Laufflächen aus Spaltenboden gehalten. Die Abkalbungen erfolgten ganzjährig mit etwa 40 Geburten monatlich in einer dafür vorgesehenen Tiefstreubox. Hochtragende Tiere wurden etwa 6 Wochen vor dem errechneten Termin trocken gestellt und im Sommer auf der Weide, im Winter in einem entsprechenden Boxenlaufstall gehalten. Auch Färsen wurden zu diesem Termin aus dem Offenstall für Jungrinder eingestallt. Alle Ställe wurden 14-tägig grob gereinigt und im Boxenbereich mit Branntkalk desinfiziert. Die Abkalbebox wurde nach jeder Abkalbung, die Box mit den klinisch kranken Tieren wöchentlich gereinigt und desinfiziert. In der MVA I wurden die Tiere in einem 2 mal 12er Side-by-Side Melkstand gemolken, in der MVA II in einem 2 mal 10er Fischgrät-Melkstand.

3.1.1.3. Leistung

Die durchschnittliche Leistung im Kontrolljahr vom 1.10.1996 bis 30.09.1997 betrug 7.282 kg Milch mit 4,33% Fett und 3,56% Eiweiß pro Kuh. Bis zum 30.09.1998 erfolgte eine Veränderung der Leistung um 817 kg auf 8.099 kg pro Kuh mit 4,37% Fett und 3,53% Eiweiß.

3.1.1.4. Management

Der auf dem Betrieb angestellte Besamungstechniker nahm die Brunstbeobachtung, die künstliche Besamung und auch die Trächtigkeitsuntersuchung zwischen dem 35. und 45. Tag nach der Besamung vor. In Absprache mit dem Besamungstechniker und dem Meister der jeweiligen Milchviehanlage traf der Leiter der Rinderproduktion Entscheidungen über das weitere Schicksal einzelner Milchkühe.

Als freiwillige Wartezeit wurden in diesem Betrieb mindestens 55 Tage vorgegeben. Eine Übersicht über die Fruchtbarkeitskennzahlen für die laktierenden Tiere (n=194) für das Kontrolljahr 10/1997 bis 09/1998 im Betrieb zu Versuchsbeginn ist in Tabelle 05 gegeben.

Tabelle 05: Fruchtbarkeitskennzahlen für das Kontrolljahr 97/98 (nach Drillich 1999)

Fruchtbarkeitskennzahl	Herde
Rastzeit (Tage)	85,6±33,6
Güstzeit (Tage)	98,9±36,9
Zwischenkalbezeit (Tage)	380
Besamungsindex	1,85
Erstbesamungsalter (Tage)	527
Freiwillige Wartezeit (Tage)	55
Konzeptionsrate	54,2%
Gesamtträchtigkeitsrate	83,5%
Abgänge	26,8%

3.1.2. Versuchszeitraum

In die Studie wurden alle Tiere (n=320) aufgenommen, die zwischen dem 19.03.1998 und 29.09.1998 trocken gestellt worden waren, zwischen dem 29.04.1998 und 19.12.1998 abkalbten und weiter für die Zucht bestimmt waren. Tiere, die am 150. Tag post partum noch nicht wiederbesamt worden waren, wurden als Abgang wegen mangelnder Fruchtbarkeit gewertet.

3.1.3. Zeitpunkt und Technik der Blutprobenentnahme, Harnentnahme, Milchprobenentnahme und Pansensaftentnahme

Die Tiere wurden nach folgendem Schema der Probenentnahme untersucht (Tabelle 06):

Tabelle 06: Schema der Probenentnahme

Probe	Termin/Bemerkung
Puerperalkontrolle rektal (PK)	vierzehntägig p.p.
Ultraschall rektal (US)	bei Zystenverdacht
Blutproben (BP)	Trockenstellen, Transition, Partus 2., 4., 6. und 10. Woche p.p.
Harnproben (HP)	Trockenstellen, Transition, Partus, 2., 4., 6. und 10. Woche p.p.
Milchprogesteron (P4)	zweimal wöchentlich
Pansensaft (PP)	2. und 4. Woche p.p.
Körperkondition (BCS)	vierzehntägig ab Trockenstellen
Milchmenge (ML)	vierwöchentlich p.p.
Milchinhaltsstoffe (LKV)	vierwöchentlich p.p.
Sterilitätskontrolle rektal (SK)	ab der zwölften Woche p.p. vierzehntägig

Tiere, die in dem Untersuchungszeitraum trocken gestellt wurden und abkalbten wurden 14-tägig untersucht. Blutproben- und Harnentnahme wurden neben der Bestimmung der Körperkondition und der Messung der Rückenfettdicke zum Zeitpunkt der Trockenstellung (etwa 6 Wochen vor dem errechneten Abkalbetermin), zu Beginn der Vorbereitungsfütterung (etwa 2

Wochen vor der Abkalbung), zum Geburtstermin (in der Woche der Kalbung) und zwei, vier, sechs, acht und zehn Wochen post partum vorgenommen. Zwei und vier Wochen post partum wurde stichprobenweise Pansensaft mit Hilfe einer Pansensaftsonde entnommen. Milchproben wurden von den untersuchten Rindern während des gesamten Untersuchungszeitraumes zweimal wöchentlich, jeweils im Abstand von 84 Stunden genommen.

Die aus der Vena coccygea entnommene Blutmenge von etwa 10 ml wurde in unbeschichteten Serumröhrchen (Fa. Sarstedt, Art.-Nr. 62/ 476.022) aufgefangen und nach einigen Stunden verarbeitet. Das Serum wurde abzentrifugiert und anschließend bis zur labor diagnostischen Untersuchung bei etwa -18°C eingefroren. Zur Harnentnahme wurde das Tier durch Massage des Dammes zum Urinieren stimuliert. Der Harn wurde in verschließbaren Behältnissen aufgefangen und innerhalb eines Zeitraumes von maximal sechs Stunden im Labor untersucht. Blut und Harn wurden jeweils Montags um etwa 06.00 Uhr gewonnen. Der regelmäßig am Donnerstag vormittag vor der Futtervorlage mit einer Sonde nach Geishäuser entnommene Pansensaft wurde sofort im Labor untersucht. Hierzu wurde zu Versuchsbeginn stichprobenweise von 22 Tieren jeweils zwei Wochen und vier Wochen post partum Pansensaft entnommen. Zweimal in der Woche wurden während der Melkzeiten Milchproben aus dem Nachgemelk gewonnen. Sie wurden in fortlaufend nummerierten 1,5 ml Probengefäßen (Fa. Sarstedt, Art.-Nr. 72/ 690) aufgefangen, in Gefrierbeuteln gebündelt und bis zur Bestimmung des Progesterongehaltes bei -18°C eingefroren.

Die Art der Probenentnahme und die untersuchten Parameter sind in Tabelle 07 dargestellt.

Tabelle 07: Probenentnahme und Parameter

Probenart	Analysen
Blut (Serum)	AST, GGT, GIDH
	Bilirubin, Harnstoff, Glukose, Insulin, Freie Fettsäuren
Harn	Netto-Säure-Basen-Ausscheidung, pH
Pansensaft	pH
Nachgemelksprobe	Progesteron

3.1.4. Puerperal- und Sterilitätskontrollen

Das Vorgehen bei Puerperal- und Sterilitätskontrollen sowie die Therapie wurden im Voraus geplant. Die Puerperalkontrollen (PK) wurden bis 10 Wochen post partum durchgeführt. Das Vorgehen wird in Abbildung 04 verdeutlicht.

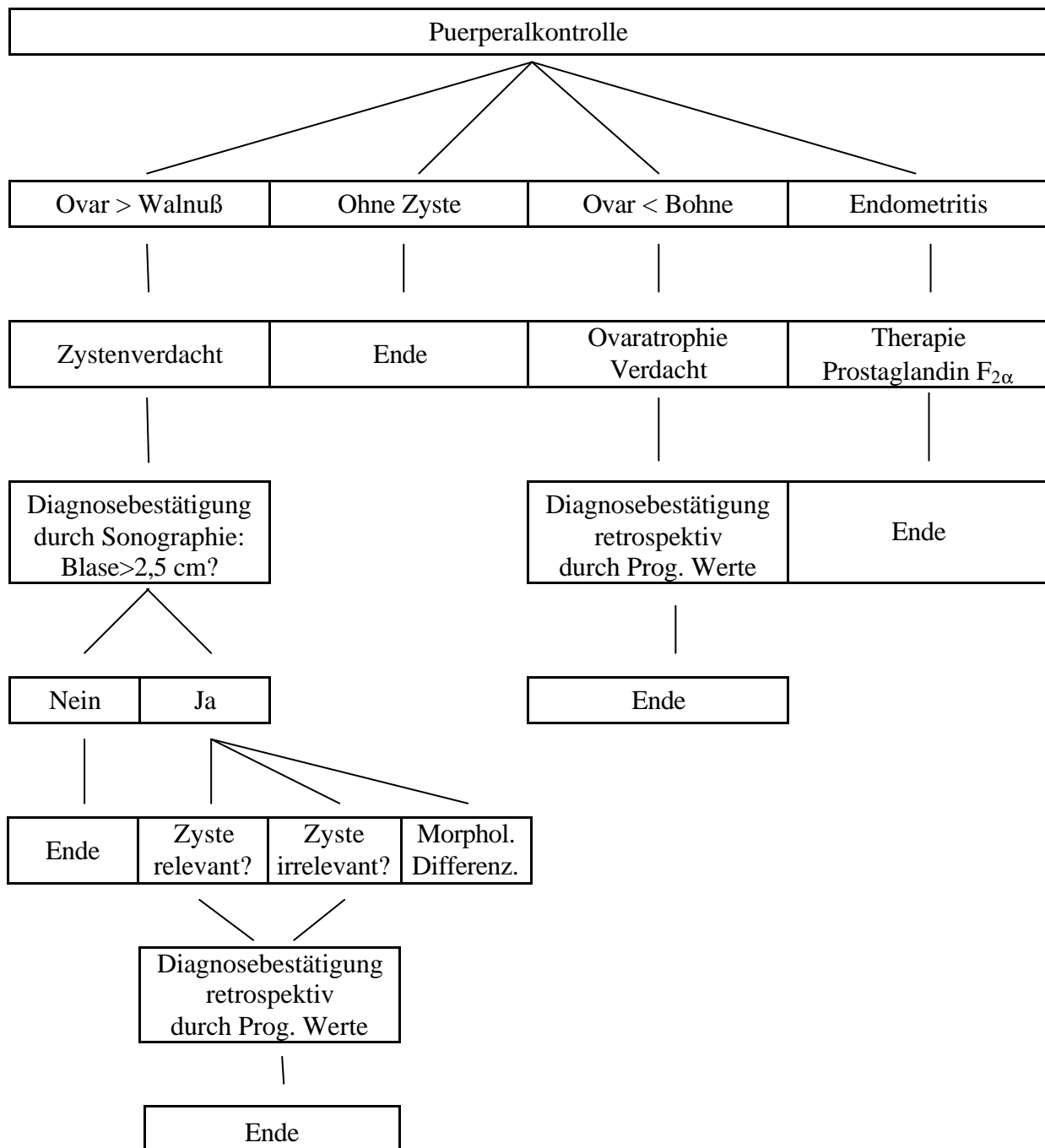


Abbildung 04: Flußdiagramm der Puerperalkontrollen

Nach dem 80. Tag post partum wurde die in Abbildung 05 skizzierte Strategie der Sterilitätskontrolle verfolgt.

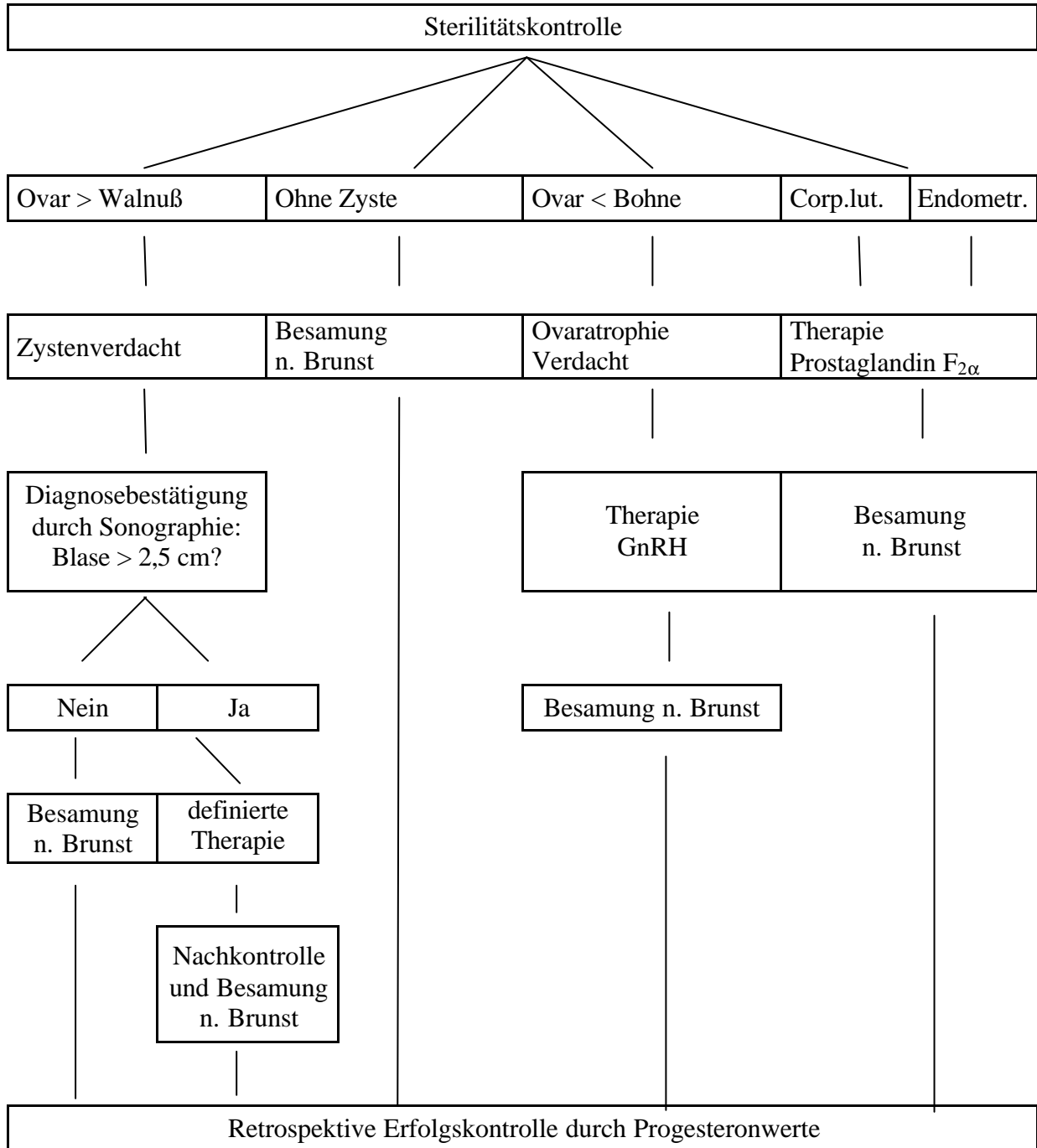


Abbildung 05: Flußdiagramm der Sterilitätskontrollen

3.2. Methoden

3.2.1. Analyse der Blutparameter

Serumproben von 82 Tieren (Trockenstellung 63 Kühe) wurden analysiert.

3.2.1.1. Freie Fettsäuren

Bei diesem Test handelte es sich um einen optimierten enzymatischen Farbttest (Fa. Boehringer Mannheim) zur Bestimmung von Freien Fettsäuren in Serum oder Plasma.

Prinzip:

In Gegenwart des Enzyms Acyl-CoA-Synthetase (Acyl-CS) wurden Freie Fettsäuren durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und Coenzym A (CoA) zu Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA) umgesetzt. Dabei entstand Adenosin-5'-monophosphat (AMP) und Pyrophosphat. Durch Zufuhr von Sauerstoff (O₂) reagierte Acyl-CoA in Anwesenheit von Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) zu 2,3-Enoyl-Coenzym A (Enoyl-CoA). Das hierbei entstandene Wasserstoffperoxid (H₂O₂) konnte 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure (TBHB) und 4-Aminoantipyrin (4-AA) in Gegenwart von Peroxidase (POD) zu einem roten Farbstoff umsetzen. Von diesem wurde in einer Küvette der Dicke 1 cm die Extinktion bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die Messtemperatur lag bei 25°C.

3.2.1.2. Harnstoff

Die Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Serum der untersuchten Kühe wurde mit Hilfe eines kinetischen UV-Tests (Fa. Olympus) für klinisch-chemische Analysensysteme (Olympus AU 800) durchgeführt.

Prinzip:

Durch das Enzym Urease wurde der Harnstoff zu Ammoniumionen (NH₄⁺) und CO₂ hydrolysiert. Die Ammoniumionen und das hinzugefügt α -Ketoglutarat bildeten in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) und Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form, NADH) Glutamat und Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form, NAD⁺). Die pro Zeiteinheit gemessene Extinktionsabnahme ist proportional der Harnstoffkonzentration. Die Messung erfolgte bei 25°C, einer Schichtdicke von 1 cm und bei den Wellenlängen von 340-380 nm.

3.2.1.3. Bilirubin

Zur Bestimmung des Gesamt-Bilirubins wurde die DPD-Methode nach Ehrlich (1883) und Hijmans van den Bergh (1916, Fa. Boehringer Mannheim, Hitachi 717) angewandt.

Prinzip:

Die Freisetzung des indirekten Bilirubins erfolgte durch ein gebrauchsfertiges Detergenz (Salzsäure 120 mmol/l). Das Gesamt-Bilirubin wurde durch eine Diazoniumverbindung (2,5-Dichlorphenyldiazoniumsalz 3,0 mmol/l) zu einem entsprechenden Azobilirubin gekuppelt. Mit Hilfe des kommerziellen Analysengerätes Olympus AU 800 wurde unter den üblichen Bedingungen die Extinktion bei den Wellenlängen von 660-570 nm gemessen (Endpunktmessung).

3.2.1.4. AST, GIDH, GGT

Der Gehalt an Glutamatdehydrogenase (GIDH) im Serum wurde mit Hilfe eines optimiertem photometrischen UV-Tests (Fa. Merck) in dem kommerziellen Analysengerät ACP (Fa. Eppendorf) bestimmt.

Prinzip:

Die reduktive Aminierung von 2-Oxoglutarat durch NADH zu L-Glutamat und NAD^+ und Wasser wurde durch GIDH katalysiert. Die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität ließ sich daher durch die direkt proportionale Geschwindigkeit der NADH-Abnahme im optischen Test ermitteln. Die entsprechende Extinktionsabnahme wurde unter den oben genannten Bedingungen bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Bei dem Test zur Bestimmung der Aspartat-Amino-Transferase (AST, alt: GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) handelt es sich um einen kinetisch-photometrischen UV-Test (Fa. Olympus) für das Analysensystem Olympus AU 800.

Prinzip:

AST katalysierte die Reaktion der Substrate α -Ketoglutarat und L-Aspartat zu L-Glutamat und Oxalacetat. Durch die Anwesenheit des Enzyms Malatdehydrogenase (MDH) entstanden aus Oxalacetat und NADH im weiteren Verlauf der Reaktion L-Malat und NAD^+ . Bei einer Temperatur von 25°C und einer Schichtdicke von 1 cm wurde die photometrische Messung bei den Wellenlängen von 340-380 nm durchgeführt.

Die Enzymaktivität wurde durch die direkt proportionale Extinktionsänderung abgelesen.

Ein kinetischer Farbttest für das oben genannte Analysensystem konnte ebenfalls für die Bestimmung L- γ -Glutamyl-Transferase (GGT) verwendet werden.

Prinzip:

Die Substrate L- γ - Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid und Glycylglycin wurden durch GGT zu L- γ -Glutamylglycylglycin und 5-Amino-2-nitrobenzoat umgesetzt. Die Enzymaktivität war wiederum unter oben genannten Bedingungen bei den Wellenlängen von 410-480 nm durch die gemessene Extinktionsänderung ablesbar.

3.2.1.5. Insulin, Glukose

Bei dem Test zur Bestimmung des Glukose-Gehaltes handelte es sich wiederum um einen kinetischen UV-Test für das klinisch-chemische Analysensystem Olympus AU 800.

Prinzip:

Vorhandene Glukose wurde durch die Enzyme Hexokinase (HK) und Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G₆P-DH) in Anwesenheit von Adenin-triphosphat (ATP) und NAD⁺ umgesetzt. Dabei wurde NAD⁺ zu NADH reduziert. Die entsprechende Extinktionszunahme konnte unter den üblichen Bedingungen bei den Wellenlängen 340-380 nm gemessen werden und ist der Glukosekonzentration proportional.

Die quantitative Bestimmung von Insulin im Serum wurde mit Hilfe eines Doppel-Antikörper- Radioimmunoassay (Fa. Pharmacia&Upjohn) vorgenommen.

Prinzip:

In der Probe konkurrierte Insulin mit einer bestimmten Menge 125Jod-markiertem Insulin um die Bindungsstellen der spezifischen Antikörper. Gebundenes und freies Insulin wurden mit einem zweiten Antikörper-Immunoabsorbent und nach anschließender 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, 10-minütiger Zentrifugation bei 1500 x g und Dekantierung getrennt. Die anschließend gemessene Radioaktivität ist der Menge unmarkiertem Insulin in der Serumprobe proportional. Der Meßbereich liegt zwischen 3-240 μ U/ml.

3.2.3. Untersuchung der Milch

3.2.3.1. Progesteronbestimmung

Die Nachgemelksproben wurden im Labor des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Georg August Universität Göttingen im Doppelansatz auf ihren Progesteron Gehalt untersucht. Bei dem hierfür verwendeten Testsystem handelt es sich um einen kompetitiven ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) nach Van de Wiel und Koops (1986), modifiziert nach Möller (1991).

Prinzip:

Durch die im Überschuss aufgetragenen Antikörper gegen Kaninchen-IgG wurden die hormonspezifischen Antikörper (gegen Progesteron) gebunden. Sobald die Tracerlösung und die vorverdünnte Milchprobe in die Plattenvertiefungen pipettiert wurde, begann die immunologische Reaktion, wobei das natürliche Progesteron in der Probe und das enzymmarkierte Progesteron der Tracerlösung um die Bindungsstelle am hormonspezifischen Antikörper konkurrierten. Bei dieser Verdrängungsreaktion konnte umso weniger Tracer an den Antikörper gebunden werden, je mehr Progesteron sich in der Milchprobe befand. Durch den Waschvorgang wurde ungebundene Tracer- und Probelösung entfernt. Durch die Zugabe des Farbsubstrates kam es zu einer Enzymreaktion des markierten Tracerprogesterons, die durch einen Farbumschlag sichtbar wurde. Die Farbreaktion war umso stärker, desto mehr enzymmarkiertes Progesteron am Antikörper gebunden war, d.h. desto weniger natürliches Progesteron in der Probe vorlag. Die Farbintensität wurde mit Hilfe eines Plattenphotometers (Fa. SLT Laborinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim) gemessen und die Progesteronkonzentration anhand einer im Test mitgeführten Eichkurve ermittelt.

Testdurchführung:

In der Vorbereitung wurde eine Mikrotiterplatte mit einem Antikörper gegen Kaninchen-IgG im Überschuss beschichtet. Einen Tag vor Gebrauch wurde die Mikrotiterplatte mit 100 µl hormonspezifischer Antikörperlösung (1:80) beschichtet und bei 4°C gelagert. Direkt vor der weiteren Verwendung wurde die Platte auf Zimmertemperatur gebracht. Die aufgetauten Milchproben wurden geschüttelt und mit Ultraschall homogenisiert. Mittels eines Diluters wurde eine Vorverdünnung der Milch mit Testpuffer (1:20) angefertigt.

Für die spätere Farbreaktion wurde nun eine Tracerlösung aus 13 ml Testpuffer und 24 µl Tracer (enzymmarkiertes Progesteron) hergestellt. Die vorverdünnte Milch (10 µl) wurde zusammen mit der Tracerlösung (100 µl) im Doppelansatz in die Vertiefungen der

Mikrotiterplatte einpipettiert. Nach kurzem Schütteln wurde die Platte bei 37°C im Brutschrank für 1,5 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Platte entleert und viermal mit einer Waschpufferlösung gewaschen. Mit einer Mehrkanalpipette wurde nun jeweils 150 µl einer Farbsubstratpufferlösung (17 ml Substratpuffer und 340 µl TMB-Lösung) in die Vertiefungen pipettiert. Nach kurzem Schütteln folgte eine Inkubation der Platte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 40 Minuten. Die Farbreaktion wurde anschließend mit 50 µl 8N-Schwefelsäure unter Verwendung der Mehrkanalpipette gestoppt. In dem Plattenphotometer konnte letztlich bei einer Wellenlänge von 450 nm das Ablesen der Mikrotiterplatte erfolgen.

Die Reproduzierbarkeit des Testes wurde durch den Intraassay-Variationskoeffizienten bzw. den Interassay-Variationskoeffizienten festgelegt. Der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei 8,8%, der Interassay-Variationskoeffizient betrug 10,5%.

Nach Van de Wiel (1979) wurde der Progesterongehalt von 5 ng/ml im Nachgemelk als Schwellenwert für eine beginnende Lutealfunktion gewertet. Entsprechend ergaben sich folgende Definitionen (Tabelle 08):

Tabelle 08: Ovarfunktion nach Auswertung der Progesteronkonzentration (Van de Wiel 1979)

Zyklusphase	Progesterongehalt
Progesteronanstieg	Anstieg über 5 ng/ml
1. Lutealfunktion	1. Progesteronanstieg über 5 ng/ml post partum
Zyklus	Intervall zwischen 2 aufeinanderfolgenden Progesteronanstiegen über 5 ng/ml
Lutealphase	Intervall zwischen einem Progesteronanstieg über 5 ng/ml und dem darauf folgenden Abfall unter 5 ng/ml
Follikelphase (Brunstphase)	Intervall zwischen einem Progesteronabfall unter 5 ng/ml und dem darauffolgenden Anstieg über 5 ng/ml

Für die vorliegende Studie wurden für die Beschreibung des Zyklusbeginns und –verlaufs Daten einer Studie von Bostedt et al. (1985) (Tabelle 09) verwendet. Anhand der Ergebnisse von Lamming und Darwash (1998) wurde das Auftreten von Ovarialzysten identifiziert und beschrieben (Tabelle 10). Zeitpunkt und Dauer der Progesteronerhöhung bzw. –erniedrigung wurden manuell ausgezählt. Für Follikel wurde eine mittlere Dauer von 8 Tagen (6-12 Tage, Hamilton et al. 1995), für Gelbkörper eine mittlere Dauer von 13 Tagen (10-18 Tage,

Lamming und Darwash 1998) vorausgesetzt. Die Diagnose der palpatorisch und sonographisch untersuchten Funktionskörper auf den Ovarien konnte so retrospektiv verifiziert werden.

Tiere, denen anhand der Progesteronkonzentration das Auftreten von Follikelzysten und Luteinzysten in Folge nachgewiesen werden konnte, wurden den Tieren mit Follikelzysten (Gruppe FZ) zugeordnet.

Tabelle 09: Zyklusbeginn (nach Bostedt et al. 1985)

Typ	Zyklustag	Beschreibung
Typ I	15 - 25. Tag	Früher Zyklusbeginn
Typ II	25 - 40. Tag	Verzögerter Zyklusbeginn
Typ III	40 - 72. Tag	Nach klinischem Puerperium
Typ IV	> 72. Tag	Ovarfunktionsstörung

Tabelle 10: Funktionelle Merkmale für das Auftreten der Zystischen Ovardegeneration (mod. nach Lamming und Darwash 1998)

Zystentyp	Progesterongehalt	Zeitraum
Follikel-Theka-Zyste	P4 < 5 ng/ml	> 12 Tage
Follikel-Lutein-Zyste	P4 > 5 ng/ml	> 19 Tage

3.2.3.2. Milchleistungsprüfung (MLP)

Auch die Beurteilung der monatlichen MLP-Daten diene der Beurteilung der Stoffwechselfgesundheit der Kühe. Sie sollte frühzeitig Information über die Herdenfruchtbarkeit geben. Die Daten wurden herdenbezogen über den Versuchszeitraum erfasst und graphisch dargestellt. Im einzelnen wurden die Tagesmilchleistung der laktierenden Kühe, Milcheiweiß- und Milchfettgehalt erhoben. Des weiteren wurden die Inhaltsstoffe in Prozent in Abhängigkeit von der Milchleistung dargestellt.

3.2.4. Untersuchung des Pansensaftes

Die Untersuchung des Pansensaftes wurde unmittelbar nach dessen Entnahme mit Hilfe des pH-Meters WTW 537 durchgeführt. Dazu wurden eventuell vorhandene Futterreste aufgeschüttelt und somit Schwebeteilchen fein verteilt. Der Messstab des eingestellten pH-Meters wurde wenige Sekunden in die Probe eingetaucht und der Wert von der Anzeige abgelesen.

3.2.5. Klinische Untersuchung

Die Palpation vom Rektum her und die darauffolgende sonographische Untersuchung wurden einerseits miteinander (PK1 bis PK5 von 127 Tieren), andererseits mit den Ergebnissen verglichen, die aus der Messung des Progesterongehaltes im Nachgemelk resultierten (Goldstandard).

3.2.5.1. Rektale Palpation

Hinsichtlich des Studienziels diente die rektale Palpation nur der Zystendiagnose.

Alle Tiere wurden post partum im 14-tägigen Abstand bis zur Besamung einer rektalen Puerperalkontrolle (PK) und bei negativer Trächtigkeitsuntersuchung gegebenenfalls einer Sterilitätskontrolle unterzogen. Durch rektale Palpation wurden die Größe, Kontraktilität, Symmetrie und gegebenenfalls Inhalt des Uterus, sowie Größe und Funktionskörper der Ovarien beurteilt. Tieren mit Anzeichen einer Endometritis wurde ab der zweiten Puerperalkontrolle (28. Tag) 0,75 mg Tiaprost (5 ml Iliren[®] C, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) intramuskulär verabreicht. Behandelte Tiere wurden vierzehn Tage später im Rahmen der folgenden Puerperalkontrolle erneut untersucht und gegebenenfalls nachbehandelt. Kühe, die zum Zeitpunkt der PK4 (56. Tag) keine Brunstsymptome gezeigt hatten, wurden bei Vorhandensein eines Gelbkörpers ebenfalls mit PGF_{2α} nach dem oben genannten Schema behandelt. In dem Betrieb wurde eine freiwillige Wartezeit von 55 eingehalten. Bei erfolgter Diagnose einer Ovarialzyste wurde die Kuh ab der fünften Puerperalkontrolle (70. Tag) entweder mit 0,02 mg Buserelin i.m. (Gonadotropin Releasing Hormon GnRH, 5 ml Receptal[®], Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) bei

Follikelzysten oder PGF2 α bei Luteinzysten therapiert. Tieren mit Follikelzysten, die nach vierzehn Tagen noch immer eine Follikelzyste und kein Corpus Luteum aufwiesen, wurde für zehn Tage eine PRID[®]-Spirale (Progesterone Releasing Intravaginal Device, Sanofi-CEVA GmbH, Düsseldorf) intravaginal appliziert. Eine Sprengung der Ovarialzyste erfolgte nicht.

3.2.5.2. Sonographie

Zu Beginn der Studie wurden palpatorisch diagnostizierte Ovarialzysten sonographisch untersucht. Die Sonographie diente dabei nach der rektalen Zystendiagnose der Unterscheidung zwischen Follikel- und Luteinzysten. Dabei wurde der Scanner 100 Vet der Firma Pie Data (Pie-Data-Elektronik GmbH, Dorsten) verwendet. Das Gerät ist mit einem Akku und einem 5/7,5 MHz Linear-Array-Schallkopf ausgerüstet. Zwischen den Monaten August und Dezember kamen 34 Tiere teils mehrfach zur Untersuchung. Die Probanden wurden erst nach Beendigung der freiwilligen Wartezeit (PK 4, 56. d), das heißt im besamungswürdigen und daher behandlungsrelevanten Zeitraum für die Ultraschalldiagnostik herangezogen. Ovarialzysten konnten so identifiziert und verschiedene Zystenqualitäten differenziert und entsprechend behandelt werden.

Die morphologische Identifizierung nach Kähn (1991) erfolgte nach den in Tabelle 11 dargestellten Kriterien.

Tabelle 11: Morphologische Merkmale der Zystischen Ovardegeneration (mod. nach Kähn 1991)

Zystentyp	Follikelgröße	Follikelinhalt	Follikelwand
Follikel-Theka-Zyste	> 25 mm	echoarm	< 3 mm
Follikel-Lutein-Zyste	> 25 mm	echogen	> 3 mm

3.2.6. Körperkonditionsbewertung

Die Beurteilung der Körperkondition der Tiere erfolgte mit der von Edmonson et al (1989) beschriebenen Methode. Durch Adspektion und Palpation wurde die Körperkondition der Tiere auf einer 5-Punkte-Skala mit Viertel-Punkt-Schritten zu jedem der acht Untersuchungstermine (Trockenstellung, Vorbereitung, Kalbung, PK1 bis 5) bestimmt.

3.2.7. Messung der Rückenfettdicke

Für die Messung der Rückenfettdicke wurde das Ultraschallgerät Hs 120 der Firma Physia GmbH verwendet. Es ist ebenfalls mit einem Akku und einem Linearschallkopf 5,0 MHz ausgestattet. Die Messung wurde zu sechs Untersuchungsterminen vorgenommen (Trockenstellung, Vorbereitung, Kalbung, PK2, PK4 und PK5). Der Messpunkt liegt auf der gedachten Linie zwischen Hüfthöcker und Sitzbeinhöcker auf einer von der Schwanzwurzel ausgehenden senkrechten Linie.

3.2.8. Dokumentation und Datenerfassung

Bei der Verwaltung der Bestandsdaten kam das Herdenbetreuungsprogramm „KW Superkuh III“ Version 3,80-6 (Klöpper&Wiege, Iden) zum Einsatz. Die bestandseigenen Daten wurden wöchentlich durch die Eingabe von Milchleistungsdaten, Kalbedaten, Besamungsdaten und Abgängen aktualisiert. Mit Hilfe dieses Programms wurden entsprechende Arbeitslisten zur Milchprobennahme sowie für Sterilitäts- und Trächtigkeitsuntersuchungen erstellt. Weiterhin wurden die Daten der Milchleistungsprüfungen über dieses Programm gespeichert und zur Auswertung genutzt.

Im Hinblick auf die Zielsetzung der Arbeit, die Ursachen für das Auftreten von Ovarialzysten zu erkennen, wurden alle abkalbenden Tiere entsprechend dem Befund der Palpation und der Progesteronauswertung einer der Gruppen OZ, FZ und LZ zugeordnet.

Gruppe OZ = Tiere ohne Zysten

Gruppe FZ = Tiere mit Follikelzysten, unabhängig vom zeitlichen Verlauf

Gruppe LZ = Tiere mit Luteinzysten, unabhängig vom zeitlichen Verlauf

Die Befunde wurden nach einem festgelegten Schlüssel (Anhang Tabelle 30) auf einem entsprechenden Befundbogen (s. Anhang Tabelle 31) dokumentiert.

Der Datenspeicherung, -verarbeitung und deskriptiven Auswertung diente das Programm EXCEL 2000 von Microsoft. Aus darstellerischen Gründen wurden für die Diagramme Mittelwerte und Standardabweichungen verwendet, obwohl diese Art der deskriptiven Darstellung der Verteilung der Daten nicht angemessen ist.

3.2.9. Statistische Methoden

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 9.0. (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois).

3.2.9.1. Deskriptive statistische Betrachtungen

Untersuchung der Ausprägung jedes einzelnen Merkmals in den Gruppen ohne Zysten, mit Follikelzysten und Luteinzysten

Bei den metrischen Merkmalen wurden Mittelwerte und Quartile berechnet. Für die nachfolgende statistische Analyse konnte davon ausgegangen werden, dass Serum- und Harnparameter nicht symmetrisch verteilt sind. Obwohl es der Verteilung der Daten nicht angemessen ist, wurden für die graphische Darstellung der Parameter Mittelwerte und Standardabweichungen gewählt. Mit Hilfe des H-Testes nach Kruskal-Wallis wurden die Daten darauf getestet, ob und hinsichtlich welcher Parameter zwischen den Analysengruppen ohne Zysten (OZ), mit Follikel- (FZ) sowie mit Luteinzysten (LZ) signifikante Unterschiede vorhanden waren.

Gruppenvergleiche in Bezug auf die Blut- und Harnparameter, body-condition-score und Rückenfettdicke

Sofern mit Hilfe des H-Tests nach Kruskal-Wallis signifikante Unterschiede festgestellt worden waren, wurden für die betroffenen Parameter der entsprechenden Zeitpunkte die Gruppen paarweise mit dem U-Test nach Mann und Whitney verglichen. So konnte festgestellt werden, zwischen welchen beiden Analysengruppen im einzelnen signifikante Lageunterschiede vorhanden waren. Der Test wurde ohne Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Gruppenvergleiche wurden für die absoluten Messwerte (alle Tiere/bestimmter Zeitpunkt) und ebenfalls für die Änderung eines Parameters seit Versuchsbeginn (Zeitraum/Einzeltier) durchgeführt. Das Ergebnis des ersten Messwertes des entsprechenden Blutparameters (für Kühe zur Trockenstellung, für Färsen zur Transition) diente dabei als Basiswert (Nullwert), die Differenz ergibt sich durch Subtraktion der nachfolgenden Werte von diesem. Aufgrund der geringen Datenmenge wurde für Kühe und Erstkalbinnen getrennt kein U-Test durchgeführt.

3.2.9.2. Auswertung der MLP-Daten und Progesteronkonzentrationen

Die Vorhersagekraft der Ergebnisse der Milchleistungsprüfungen im Hinblick auf die Entstehung von Zysten wurde mittels Logistischer Regression geprüft. Die Regressionsanalyse der vorliegenden Daten dient dazu, die Art des Zusammenhanges zwischen einer dichotomen, abhängigen Variablen (Zyste ja/nein) und mehreren unabhängigen Variablen aufzudecken. Sie ist für die Identifikation von Risikofaktoren geeignet.

Dabei wurden für jede Milchleistungsprüfung jeweils Tiere ohne Zysten (OZ), Tiere mit Follikelzysten (FZ) und Tiere mit Luteinzysten (LZ) miteinander verglichen. Es ergaben sich folgende Modelle:

1. Milchleistungsprüfung 1:

- a. OZ gegen FZ
- b. OZ gegen LZ
- c. FZ gegen LZ

2. Milchleistungsprüfung 2:

- a. OZ gegen FZ
- b. OZ gegen LZ
- c. FZ gegen LZ

3. Milchleistungsprüfung 3:

- a. OZ gegen FZ
- b. OZ gegen LZ
- c. FZ gegen LZ

Als Kovariaten wurde jeweils die Milchmenge, der Fettgehalt der Milch in %, der Eiweißgehalt der Milch in %, der Harnstoffgehalt in mg/100ml sowie der Fett/Eiweiß-Quotient eingesetzt. Die logistische Regression wurde als Vorwärtsselektion durchgeführt, wobei Kovariaten mit einem p-Wert $> 0,1$ ausgeschlossen wurden.

Die Genauigkeit der Zystendiagnostik wurde durch den Vergleich der Sonographie mit den retrospektiv analysierten Progesteronkonzentrationen (Goldstandard) ermittelt. Aus dem

Vergleich der Diagnosen beider Untersuchungstechniken resultierten vier verschiedene Ergebniskombinationen (korrekt-positiv, korrekt-negativ, falsch-positiv, falsch-negativ) im Hinblick auf die Ovardiagnostik mittels rektaler Sonographie. Die Parameter Sensitivität und Spezifität konnten berechnet werden:

Sensitivität: Σ erkrankter Tiere mit positivem Testergebnis / Σ erkrankter Tiere

Spezifität: Σ nicht erkrankter Tiere mit negativem Testergebnis / Σ nicht erkrankter Tiere

Mit Hilfe der Berechnung von Quartilen können die Progesteronverläufe in Gruppen eingeteilt werden. Es wurde der Anteil der Tiere, die Zyklusunregelmäßigkeiten aufwiesen, berechnet.