

Aus der
Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Feldstudien zur Beurteilung und Optimierung des gewählten
Besamungstages bei Kühen unter Zuhilfenahme eines
quantitativen Milchprogesteron-Schnelltests**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

Eingereicht von
Adriana J. Wöckel
aus Zittau

Leipzig 2017

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Walter Brehm

Betreuer: Prof. Dr. Axel Sobiraj

Gutachter: Prof. Dr. Axel Sobiraj, Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Axel Wehrend, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der
Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz,
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Verteidigung: 22.08.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Sexualzyklus beim Rind	3
2.1.1	Östrus	4
2.1.2	Metöstrus	5
2.1.3	Diöstrus.....	5
2.1.4	Proöstrus	7
2.1.5	Wiedereintritt in den Zyklus nach der Kalbung.....	8
2.2	Das Gelbkörperhormon Progesteron	9
2.2.1	Progesteron	9
2.2.2	Progesteronverlauf während des Zyklus.....	10
2.2.3	Einflussfaktoren auf Progesteron, Brunstverhalten und Fruchtbarkeit.....	13
2.3	Fruchtbarkeitskennzahlen und Brunstbeobachtung.....	21
2.3.1	Erläuterung der wichtigsten Fruchtbarkeitskennzahlen.....	21
2.3.2	Bedeutung der Brunstbeobachtung für einen Milchviehbetrieb	23
2.3.3	Auswahl einzelner Methoden zur Brunstbeobachtung	25
2.3.3.1	Visuelle Brunstbeobachtung.....	25
2.3.3.2	Aktivitätsmessung (Bewegungs- und Wiederkauverhalten)	27
2.3.3.3	Farbmarkierung und Drucksensoren.....	31
2.3.3.4	Elektrische Leitfähigkeit im Vaginalsehlim	32
2.3.3.5	Milchleistung	33
2.3.3.6	Brunstdiagnose durch den Tierarzt.....	34
2.3.3.7	Progesteronmessung	35
3	Tiere, Material und Methoden	40
3.1	Tiere.....	40
3.1.1	Versuchsbetrieb	40
3.1.2	Auswahlkriterien für die Versuchs- und Kontrolltiere	41

3.1.3	Versuchs- und Kontrolltiere	42
3.2	Material und Methoden	43
3.2.1	Milchprobengewinnung.....	43
3.2.2	Testsystem Hormonost® Farmertest	43
3.2.2.1	Allgemeines zum Hormonost® Farmertest	43
3.2.2.2	Testdurchführung und Messprinzip	44
3.2.2.3	Überprüfung der Messgenauigkeit und Durchführungssicherheit unter Anwendung der Kontrolllösungen.....	46
3.2.3	Betriebsdaten aus dem Herdenmanager.....	47
3.3	Versuchsaufbau und Ablauf	47
3.3.1	Vorversuch.....	47
3.3.2	Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1). ..	47
3.3.3	Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch-gynäkologischer Befunde (Versuch 2).....	49
3.4	Statistische Methoden.....	50
3.4.1	Statistische Tests des Vorversuchs	52
3.4.2	Statistische Tests der Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1)	52
3.4.3	Statistische Tests der Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch-gynäkologischer Befunde (Versuch 2)	53
3.4.4	Erläuterung zur grafischen Darstellung der Ergebnisse	54
4	Ergebnisse.....	55
4.1	Ergebnisse des Vorversuchs	55
4.2	Ergebnisse zur Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1).....	55
4.3	Ergebnisse zur Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch- gynäkologischer Befunde (Versuch 2).....	65
5	Diskussion.....	68
5.1	Ziel der Arbeit	68
5.2	Kritische Betrachtung der Methoden.....	68

5.2.1	Auswahl des Betriebes und der Tiere	68
5.2.2	Milch als Analysemedium für Progesteron	69
5.2.3	Versuchsplanung.....	70
5.2.4	Praktikabilität, Zeit- und Kostenaufwand des Hormonost [®] Farmertests.....	72
5.3	Diskussion der wichtigsten Versuchsergebnisse	74
5.3.1	Diskussion zur Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1)	74
5.3.2	Diskussion zur Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch- gynäkologischer Befunde (Versuch 2)	84
5.4	Schlussfolgerung	87
6	Zusammenfassung	89
7	Summary	91
8	Literaturverzeichnis	93
9	Danksagung	111

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
ÄG	Äußeres Genital
Ak	Antikörper
AMS	automatisches Melksystem
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>
BCS	<i>Body Condition Score</i>
BHB	β -Hydroxybutyrat
BI	Besamungsindex
Cl	Corpus luteum
CLA	<i>Commencement of Luteal Activity</i>
CMR	<i>Cervical Mucus Resistance</i>
d	Tag/Tage
DMI	<i>Dry Matter Intake</i> (Trockenmasseaufnahme)
E2	Estradiol
EB	Energiebilanz
EIA	Enzymimmunoassay
EKA	Erstkalbealter
ELISA	<i>Ezyme-Linked Immunoassay</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GI	Gesamtindex
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
h	Stunde/Stunden
hCG	humanes Choriongonadotropin
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IFN τ	Interferon-Tau
IGF-1	<i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>
IQR	Interquartilbereich
KB	Künstliche Besamung
KI	Konfidenzintervall
KT	Kontrolltiere
LG	Laktationsgruppe
LH	Luteinsierendes Hormon
MHz	Megahertz
MLP	Milchleistungsprüfung
MM	Milchmenge
mmol/l	Millimol pro Liter
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Tiere
NEB	Negative Energiebilanz
NEFAs	<i>Non Esterified Fatty Acids</i> (Freie, unveresterte Fettsäuren)
NNR	<i>Non-Return-Rate</i>
p	Signifikanz

p. i.	post inseminationem
p. p.	post partum
P4	Progesteron
P4*	Radioaktiv markiertes Progesteron
pg	Pikogramm
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
RIA	Radioimmunoassay
RU	Rektale Untersuchung
RZ	Rastzeit
SF	Standardfehler
TMR	Totale Mischration
TR	Trächtigkeitsrate
TU	Trächtigkeitsuntersuchung
UK	Umrinderkontrolle
VT	Versuchstiere
VU	Vaginale Untersuchung
VZ	Verzögerungszeit
WZ	Wartezeit
ZKZ	Zwischenkalbezeit
ZL	Zykluslänge
ZP	Zeitpunkt
ZTZ	Zwischentragezeit
zzgl.	zuzüglich
σ	Standardabweichung

1 Einleitung

Die ökonomische Bedeutung von Gesundheit, Langlebigkeit und guter reproduktiver Leistung von Milchkühen tritt in der modernen Milchwirtschaft immer mehr in den Vordergrund (FIRK et al. 2002, BECKER et al. 2005). 2015 lag der Anteil der Gesamtabgänge der Tiere aus deutschen Milchviehbetrieben bei 37,7 %, wobei rund ein Fünftel der Abgänge auf Fruchtbarkeitsstörungen zurück zu führen sind. Damit stellt eine unzureichende Fertilitätsleistung der Tiere einen der Hauptabgangsgründe aus einem Betrieb dar (ADR 2016). Im Durchschnitt beträgt die heutige Nutzungsdauer von Milchrindern nur noch 45 Monate bzw. 3,75 Jahre, was wirtschaftlich ineffizient ist, da das Laktationsmaximum mit der dritten Laktation erst erreicht wird und mit vorzeitigem Abgang der Tiere das Potential zur Milchproduktion nicht vollständig ausgeschöpft werden kann (WANGLER et al. 2005, RÖMER 2011, ADR 2016). Im Jahr 2016 gab es durchschnittlich 26,50 € pro 100 kg abgelieferter verkehrsfähiger Milch. Diese Preisentwicklung stellt seit 2009 einen Tiefpunkt in der Milchwirtschaft dar und führt zu entsprechend hohen wirtschaftlichen Einbußen bei den Landwirten (INCHAISRI et al. 2010, WOHLFAHRT 2016). Seit Wegfall der Milchquote zum 31.03.2015 gibt es nun auch keine Regulierung für die zu liefernden Milchmengen mehr, was viele Betriebe weiter an die Existenzgrenze führt (WOHLFAHRT 2015). Seit 2010 hat bereits ca. ein Fünftel der Betriebe die Milchviehhaltung aufgeben müssen. Die weiterhin bestehenden Herden werden immer größer (WOHLFAHRT 2015). INCHAISRI et al. (2010) schätzten aufgrund verlängerter Zwischenkalbeintervalle und Milchverlust sowie damit verbundenen erhöhten Tierarztkosten und vorzeitigem Abgang aus der Herde einen finanziellen Verlust von bis zu 231 € pro Kuh und Jahr. Die nachdrückliche genetische Selektion, die in den letzten Jahren immer intensiver betrieben wurde, führte zur Zucht von hochleistenden Milchkühen und damit einhergehend zu reduzierter fertiler Leistung, was sich durch schlechte Fruchtbarkeitskennzahlen widerspiegelt (MACMILLIAN et al. 1996, ROYAL et al. 2000, LUCY 2001, CHAGAS et al. 2007, DOBSON et al. 2008, MORRIS und DISKIN 2008, DHAKAL et al. 2015, MERCADANTE et al. 2016). Die niedrigen Trächtigkeitsraten der Hochleistungskühe von 24-40 % und der Färsen mit 60-70 % repräsentieren die schlechte reproduktive Situation (ROYAL et al. 2000, LUCY 2001, CAVALIERI et al. 2003a). Selbst die Einführung und Weiterentwicklung der assistierten Reproduktion in der Milchviehhaltung hat in dieser Hinsicht nicht den erwarteten Erfolg erbracht.

Als eine der wichtigsten beeinflussbaren Ursachen und limitierenden Faktoren der Fruchtbarkeit ist die korrekte Östrusdetektion und die damit verbundene zeitlich akkurat abgestimmte Besamung zu nennen (KING et al. 1976, LEHRER et al. 1992, SENGER 1994, HOLMAN et al. 2011, SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012). Problematisch dabei ist, dass mannigfaltige Gründe neben der hohen Milchleistung, wie zum Beispiel Stress, Management, nutritive Komponenten und Aufstallungssysteme,

Einfluss auf die Ausprägung der Brunstsymptomatik und deren Intensität haben (COOK et al. 1987, EHNERT und MOBERG 1991, LÓPEZ-GATIUS et al. 2005, PALMER et al. 2010, DHAKAL et al. 2015). So kann es zu Verlusten der Brunsterkennung bei bis zu 50 % (STEVENSON und BRITT 1977, HEERSCHKE und NEBEL 1994) bzw. zu unpassend terminierten Besamungen bei bis zu 20 % der Tiere kommen (BULMAN und LAMMING 1978, GRUNERT 1999b, OBRITZHAUSER und JANACEK 2012). In Großbetrieben existiert aufgrund finanzieller Einsparungen und stetig steigender Herdengrößen häufig ein Mangel an geschultem Fachpersonal, welches ausreichend Zeit zur gewissenhaften Brunstbeobachtung und Dokumentation aufwendet (WANGLER et al. 2005, ROELOFS et al. 2010). Die Verkürzung der durchschnittlichen Brunstdauer von ursprünglich ca. 18 Stunden auf bis zu unter 8 Stunden innerhalb der letzten 50 Jahre sowie die reduzierte Brunstsymptomatik und -intensität begründen die Notwendigkeit neben der visuellen Brunstbeobachtung weitere Verfahren zur Östrusdetektion einzusetzen, um unzureichende fertile Leistungen zu minimieren (PENNINGTON et al. 1986, LOPEZ et al. 2004, YÁÑIZ et al. 2006, REAMES et al. 2011, RÖMER 2011, CHANVALLON et al. 2014). Bereits LAMMING und BULMAN (1976) nutzen Verlaufsmessungen von Progesteron, um die ovarielle Aktivität bei Milchkühen zu untersuchen. Diese Methode kann helfen, den aktuellen Zyklusstand zu ermitteln und gezielt bei Problemen zu intervenieren sowie zur besseren Brunsterkennung beitragen (BULMAN und LAMMING 1978, ARNSTADT und CLEERE 1981, NEBEL et al. 1987, MANN und LAMMING 2001, ROBINSON et al. 2008). Da über die Progesteronmessung eine Aussage getroffen werden kann, ob ein produktiver Gelbkörper vorliegt oder nicht, kann bei geschlechtsgesunden Tieren eine Besamungszeitpunktoptimierung erfolgen und damit der reproduktive Herdenstatus verbessert werden (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE 1999, GORZECKA et al. 2011, BLAVY et al. 2016).

Zielstellung der vorliegenden Dissertation war es, ein für Landwirte und für Tierärzte konzipiertes Testsystem für Milchprogesteronmessungen (Hormonost[®] Farmertest der Firma Biolab GmbH München) unter Feldbedingungen zu testen, um den gewählten Besamungszeitpunkt zu beurteilen bzw. zu optimieren. Die gewonnenen Progesteronwerte über die Zyklusverläufe der einzelnen Tiere sollen genutzt werden, um eine eventuell wiederkehrende Brunst („Umrindern“), auch ohne deutliche Brunstsymptomatik, besser zu erkennen und das Tier gezielt einer Nachbesamung zuzuführen. Des Weiteren erfolgte der Vergleich dieser Tiere zu einer nicht Progesteron-kontrollierten Tiergruppe, um einen Einfluss der genutzten Technik auf die Fruchtbarkeitskennzahlen zu prüfen und gegebenenfalls vorzeitigen Abgang der Tiere aus dem Betrieb, aus Gründen unzureichender Brunstbeobachtung, zu reduzieren. Durch die Analyse der Daten sollte beurteilt werden, ob sich der Einsatz dieser Brunstdetektionsmethodik im größeren Maßstab eignet, aber auch, ob dieses Verfahren problemlos in den täglichen Betriebsablauf integrierbar ist.

2 Literaturübersicht

2.1 Sexualzyklus beim Rind

Der Beginn der Geschlechtsreife ist unter anderem rasseabhängig und tritt beim Holstein Friesian Rind zwischen dem 7. und dem 9. Lebensmonat ein. Die Zuchtreife, und damit die körperliche Voraussetzung, um eine Trächtigkeit und eine Geburt bewerkstelligen zu können, ist ab einem Gewicht von ca. 340 kg erreicht (BERCHTHOLD und RÜSCH 1999, BOSTEDT 2006). Der Sexual- oder Brunstzyklus beim Rind ist gekennzeichnet durch regelmäßig wiederkehrende Veränderungen des Verhaltens und der inneren sowie der äußeren Geschlechtsorgane (SCHNURRBUSCH und VOGLER 2002, BOSTEDT 2006). Europäische Rinderrassen sind asaisonal polyöstrisch (TUCKER 1982). Die Zykluslänge, d. h. der Abstand zwischen zwei Zyklen mit Ovulation, beträgt zwischen 18 bis 24 Tagen (MEIER et al. 2009b, FORDE et al. 2011), wobei der Durchschnitt 21 ± 2 d beträgt (GRUNERT 1999a). ROYAL et al. (2000) fanden heraus, dass sich die Zykluslänge im Laufe der Jahre verändert hat. So betrug in den 1970er Jahren die durchschnittliche Länge 20,2 d und gegen Ende der 1990er Jahre bereits 22,3 d (ROYAL et al. 2000). Andere Studien geben die mittlere Zykluslänge bei laktierenden Rindern mit $22,9 \pm 0,7$ d (SARTORI et al. 2004) bzw. $24,6 \pm 0,6$ d (WOLFENSON et al. 2004) an. BLAVY et al. (2016) unterschieden noch zwischen dem ersten Zyklus nach Ablauf des Puerperiums und den folgenden Zyklen. Dabei betrug die mittlere Dauer des ersten postpuerperalen Zyklus 21,3 d und die der folgenden Zyklen 22,9 d (BLAVY et al. 2016). Färsen können im Unterschied zu Kühen einen bis zu 2,6 d kürzeren Zyklus aufweisen (WOLFENSON et al. 2004). Äußere Faktoren können die Zykluslänge beeinflussen (ALLRICH 1993), wie z. B. eine erhöhte Umgebungstemperatur, welche zyklusverlängernd wirken kann (TUCKER 1982). Neben klimatischen Faktoren wie z.B. die Licht- und Luftverhältnisse nehmen auch die Haltungsform (Weidehaltung vs. Stallhaltung), Leistung und diätetische Komponenten Einfluss auf das Zyklusgeschehen (BEAL et al. 1978, LOTTHAMMER 1999, STEVENSON 2001, VASCONCELOS et al. 2003, WOLFENSON et al. 2004, BECKER et al. 2005, THATCHER et al. 2006, CHAGAS et al. 2007, PALMER et al. 2010). Untersuchungen zum Thema Fruchtbarkeit in Hochleistungsherden konnten zeigen, dass in Herden bis zu 50 % der Tiere eine abnorme, das heißt verlängerte oder stark verkürzte Zyklusdauer aufweisen können und damit die Trächtigkeitsraten pro Jahr um mindestens 1 % abnehmen (LUCY 2001, SHELDON et al. 2006).

Der ovarielle Zyklus lässt sich in vier Phasen unterteilen: Östrus, Metöstrus, Diöstrus und Proöstrus (FORTUNE 1994, GRUNERT 1999a, BOSTEDT 2006).

2.1.1 Östrus

Der Beginn des Östrus oder der Hauptbrunst ist gekennzeichnet durch die Duldung. Innerhalb dieser Zeit besteht volle Paarungsbereitschaft. Das in der Vorbrunst bzw. im Proöstrus eher durch Unruhe, vermehrte Kontaktsuche nach potentiellen Paarungspartnern und Lautäußerung gekennzeichnete Verhalten wird nun deutlich ruhiger. Beim Aufsprung von anderen Tieren bleibt das in Brunst befindliche Tier stehen, duldet und biegt den Schwanz zur Seite (ALLRICH 1993, KERBRAT und DISENHAUS 2004, BOSTEDT 2006). Die Scham ist komplett ödematisiert, nicht gefältelt und klarer, fadenziehender Brunstschleim geht ab. Der Scheidenvorhof ist deutlich feucht und hyperämisiert. Im Vaginalboden befindet sich ein See aus Brunstschleim und der Muttermund ist ungefähr bleistiftstark geöffnet. Die Gebärmutter zeigt starke Tonisierung, die Uterusschleimhaut befindet sich in der Proliferationsphase, und auf den Eierstöcken ist ein sprungreifer Graafscher Follikel palpierbar (GRUNERT 1999a, BOSTEDT 2006). Zusätzlich werden Pheromone gebildet, die von anderen Tieren über das Vomeronasale Organ olfaktorisch wahrgenommen werden können (SHELDON et al. 2006). Als Auslöser der Brunstsymptomatik gilt die steigende Östrogenproduktion des Graafschen Brunstfollikels (SVEBERG et al. 2011). Die steigende Estradiol (E2)- und Inhibinsynthese des dominanten Follikels reduziert die pulsatile FSH-Sekretion (GINTHER 2000) und bewirkt eine Atresie der subdominanten Follikel innerhalb einer Follikelkohorte (GINTHER et al. 1989). Der dominante Follikel kann nun durch eine bessere vaskuläre Versorgung und die höhere Anzahl an Granulosazellen die abfallende FSH-Konzentration besser nutzen und weiter wachsen (WALTERS und SCHALLENBERGER 1984). Estradiol scheint nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ zu wirken. Das heißt, erst ab einem gewissen Schwellenwert kann E2 die Brunst auslösen, wobei eine weitere Erhöhung des Estradiolspiegels keine Verstärkung der Östrus-Ausprägung hervorruft (ALLRICH 1994, WALKER et al. 2010). Die Ausschüttung von LH (Luteinisierendes Hormon) wird durch 17 β -Estradiol stimuliert (LYIMO et al. 2000, ROELOFS et al. 2010, MARTIN et al. 2013). Gegen Ende der Brunst kommt es zum Abfall des E2-Spiegels im Blut, wodurch der Feedbackmechanismus an der Hypophyse aufgehoben wird. Die nun höheren Impulsamplituden der GnRH (Gonadotropin releasing hormone)-Ausschüttung führen zu einem finalen LH-*Peak*, welches die Ovulation induziert (WALTERS und SCHALLENBERGER 1984). Obwohl die Angaben zur Östruslänge zwischen $7,1 \pm 5,4$ h (DRANSFIELD et al. 1998) und $11 \pm 4,2$ h (ROELOFS et al. 2005a) variieren, ist die Zeit zwischen LH-*Peak* und Ovulation relativ konstant (24 ± 6 h) (GRUNERT 1999a, SAUMANDE und HUMBLLOT 2005). Laut ALLRICH (1994) und GRUNERT (1999a) kommt es ungefähr 10 bis 14 h nach Ende der Brunst bzw. mit Beginn des Metöstrus zur Ovulation.

2.1.2 Metöstrus

Auf die Brunst folgt die sogenannte Nachbrunst, welche auch als Met- bzw. Postöstrus bezeichnet wird und ca. 2 d andauert (BOSTEDT 2006). Im Metöstrus kommt es zum Abklingen der inneren und äußeren Brunstsymptomatik und Aufheben der Duldungsbereitschaft. Die Labien schwellen langsam ab und die Rötung der Vaginalschleimhaut geht zurück. Der Zervikalkanal schließt sich wieder und der Uterus beginnt zu erschlaffen (GRUNERT 1999a). Auf dem Eierstock kommt es nach der Ovulation zum schnellen Einströmen von Blut in die ehemalige Follikelhöhle (BOSTEDT 2006). Aufgrund der hohen Östrogengehalte gegen Ende des Östrus kann es zu kapillären Blutungen in der hyperämischen Uterusschleimhaut kommen (OHTANI et al. 1993). Darauffolgender sichtbarer Abgang von Brunstschleim mit Blutbeimengungen wird als „Abbluten“ bezeichnet (O'CONNOR 1993) und kann laut GRUNERT (1999a) einen Hinweis auf eine stattgefundene Ovulation sein, aber keine Information über den Erfolg einer Befruchtung liefern. Die Uterusschleimhaut geht in die Sekretionsphase über, um sich für eine eventuelle Nidation des Konzeptus vorzubereiten (BOSTEDT 2006).

2.1.3 Diöstrus

Etwa ab dem dritten Tag post ovulationem beginnt die Zwischenbrunst, welche auch als Di- oder Interöstrus bezeichnet wird. Diese Zyklusphase ist mit ca. 15 d die längste Zyklusphase und hauptsächlich durch sexuelle Ruhe geprägt (GRUNERT 1999a). Die ehemalige Follikelhöhle wird nun zu einem Progesteron (P4) produzierenden Gelbkörper umgewandelt (ALLRICH 1994). Dieser Prozess wird Luteinisierung genannt, wobei Wachstums- und Luteinisierungshormone bei der Etablierung eine wichtige Rolle spielen (NISWENDER et al. 2007). Auch Steroide, Peptidhormone, Eicosanoide und Zytokine, die z. T. von den Zellen des Gelbkörpers selbst gebildet werden, sind essentiell für dessen sekretorische Funktion (BERISHA und SCHAMS 2005). Das Wachstum des Gelbkörpergewebes ist von einer funktionellen Blutversorgung abhängig. Initial kommt es nach der Ovulation kurzzeitig zu einer Verringerung des Blutflusses am Ovar. In den ersten zwei bis fünf Tagen post ovulationem folgt dann das Wachstum des Gelbkörpers, eine Erhöhung des Plasmaprogesteronspiegels und Angiogenese, sowie vermehrter Blutstrom am Eierstock (ACOSTA et al. 2003, VASCONCELOS et al. 2003, SIQUEIRA et al. 2009, BOLLWEIN et al. 2012). Aus den Granulosa- und Theca-Follikelzellen entwickeln sich die großen und kleinen Luteinzellen. Des Weiteren enthält der Gelbkörper Endothelzellen, Fibroblasten und verschiedene Arten von Immunzellen (LEI 1991). Das frisch entstandene Corpus luteum (Cl) ist die ersten vier bis sechs Tage nach der Ovulation unempfindlich gegenüber Prostaglandin F_{2α} (McCRACKEN et al. 1999). Wie beim Rind wird auch bei anderen domestizierten Haustieren die luteale Synthese und Sekretionsleistung durch die pulsatile LH-

Ausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen reguliert (NISWENDER et al. 2007, SKARZYNSKI et al. 2008). Palpatorisch kann während der Blütophase des Gelbkörpers ein derbes Gebilde, welches sich durch sogenannte Flaschenhalsbildung vom restlichen Ovarstroma absetzt, festgestellt werden (GRUNERT 1999a). Der gereifte Gelbkörper ist so gut vaskularisiert, dass nahezu jede Lutealzelle Kontakt zu ein oder mehreren Blutgefäßen hat, was essentiell für die sekretorische Funktion ist. Somit zählt das Corpus luteum zu den am besten durchbluteten Gewebearten im Körper (ACOSTA et al. 2003, ROBINSON et al. 2006, BOLLWEIN et al. 2012).

Typisch für das Rind ist während der Phase der Zwischenbrunst der Ablauf von sogenannten Follikelwellen auf dem Ovar (SIROIS und FORTUNE 1988). Eine solche Welle bedeutet die Rekrutierung einer Kohorte von ca. 3 bis 6 Tertiärfollikeln aus dem gesamten Follikelbestand des Eierstocks. Voraus geht immer ein Anstieg von FSH, welcher zum Wachstum der Follikelkohorte führt. Innerhalb jeder Follikelwelle kristallisieren sich ein, seltener zwei dominante Follikel heraus, die während die anderen Follikel zugrunde gehen, weiter wachsen und sich differenzieren (FORTUNE 1994). Die Anzahl dieser Wellen variiert in der Regel zwischen zwei (SARTORI et al. 2004, WOLFENSON et al. 2004) bis drei (RAJAMAHENDRAN und TAYLOR 1990, RANASINGHE et al. 2010), selten eine oder vier (SIROIS und FORTUNE 1988, SARTORI et al. 2004). Bei Kühen und Färsen beinhalten ca. zwei Drittel der Zyklen zwei Follikelwellen und bei einem Drittel laufen drei Follikelwellen ab. Bei zweiwelligen Zyklen atresiert der dominante Follikel der ersten Welle, bei dreiwelligen Zyklen atresieren die dominanten Follikel der ersten beiden Wellen. WOLFENSON et al. (2004) vermuten, dass es verschiedene Faktoren, wie die Rasse, die Parität und diverse Umwelteinflüsse wie Ernährung und Stress sind, die auf die Anzahl der ablaufenden Follikelwellen Einfluss nehmen. Mehrwellige Zyklen können auch zu einer Verlängerung der Zyklusdauer führen (WOLFENSON et al. 2004). Damit ist eine Verlängerung der Lutealphase verbunden, da die Regression des Gelbkörpers bei einem dreiwelligen Zyklus erst ab dem 19. und nicht wie bei einem zweiwelligen ab dem 16. Tag beginnen kann (GINTHER et al. 1989). Im Falle der Trächtigkeit würde der Embryo über seine Interferon-Tau (IFN τ)-Sekretion erkannt werden und die Auflösung des Lutealgewebes, welche durch die endometriale Prostaglandin F $_{2\alpha}$ -Freisetzung vermittelt über Oxytocinrezeptoren eingeleitet werden würde, wird unterbunden (MANN et al. 1999, ROBINSON et al. 2008). Es existiert nachweislich eine enge direkte und eine indirekte positive Beziehung zwischen maternaler Progesteronproduktion und embryonaler Entwicklung sowie der IFN τ -Produktion (MANN und LAMMING 2001, MORRIS und DISKIN 2008). In Abwesenheit einer Fruchtanlage und deren Signalausschüttung wird zwischen den Tagen 17 bis Tag 19 die Luteolyse eingeleitet (McCRACKEN et al. 1999, WOLFENSON et al. 2004). Über eine Erhöhung der Ausschüttung der hypophysären Hormone, wie LH und FSH, sowie viele lokal modulierende Faktoren wie Peptide, Steroidhormone und Wachstumsfaktoren, kommt es zur

Rekrutierung und Reifung des Brunstfollikels innerhalb der letzten Follikelwelle (FORTUNE 1994). Der Follikel ist in der Lage vermehrt Estradiol zu produzieren, was zur Bildung von Oxytocinrezeptoren am Endometrium führt. Über diese Rezeptoren wirkt im Corpus luteum produziertes Oxytocin stimulierend auf die Freisetzung von Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) aus dem Endometrium und leitet somit die Auflösung des Gelbkörpers ein (SCHAMS 1989, HANSEL und BLAIR 1996, McCRACKEN et al. 1999). Es gibt sowohl eine funktionelle als auch eine strukturelle Luteolyse (JUENGEL et al. 1993). Die sinkende Progesteronsyntheseleistung kennzeichnet die funktionelle Rückbildung (McCRACKEN et al. 1999), was mit der Abnahme der lutealen Durchblutung aufgrund des LH-Rezeptorverlusts an den Granulosazellen erklärt wird (NISWENDER 1976, SKARZYNSKI et al. 2008). Über Apoptose der Luteinzellen kommt es zur strukturellen Luteolyse, welche länger als die funktionelle Rückbildung dauert. Als morphologisches Korrelat kann der alte Gelbkörper neben dem in Anbildung befindlichen Follikel auf dem Ovar noch längere Zeit palpierbar bleiben (JUENGEL et al. 1993).

2.1.4 Proöstrus

Der Proöstrus, auch als Vorbrunst bezeichnet, dauert etwa 2 bis 3 Tage und ist gekennzeichnet durch die Vorbereitung auf die Hauptbrunst. Die Übergänge zwischen beiden Zyklusphasen sind dabei nicht immer deutlich abzugrenzen (BOSTEDT 2006). Durch das Absinken des P₄-Spiegels wird im Hypothalamus wieder in erhöhter Frequenz GnRH ausgeschüttet. Damit verbunden werden FSH und LH aus der Hypophyse in pulsatilen Schüben sezerniert (MILVAE et al. 1996, RATHBONE et al. 2001), welche das Follikelwachstum und die Estradiolsynthese stimulieren (GRUNERT 1999a). Diese hormonelle Situation wird durch beginnende Schwellung der Vulva, Hyperämisierung der Vestibularschleimhaut sowie Ansammlung von Schleim im Vaginalbereich widerspiegelt. Deutliche Anzeichen der beginnenden Brunst beim Wiederkäuer sind gegenseitiges Beriechen und Bespringen, Rückgang der Futteraufnahme und der Milchleistung sowie erhöhte Nervosität und Lautäußerung der Tiere (GRUNERT 1999a, FABRE-NYS und GELEZ 2007). Im Laufe der Vorbrunst verändert sich die Viskosität des Genitalschleims von mäßig viskös zu transparent, klar und fadenziehend – der sogenannte Brunstschleim. Bei der rektalen Untersuchung kann häufig eine leichte Erschlaffung der Zervix und eine beginnende Steigerung des Uterustonos getastet werden. Auf den Eierstöcken befindet sich ein oder zwei zum Graafschen Follikel heranreifende Follikel (GRUNERT 1999a). Oftmals kann noch ein Gelbkörper in Rückbildung ertastet werden (JUENGEL et al. 1993).

2.1.5 Wiedereintritt in den Zyklus nach der Kalbung

Zwischen 50-94 % der ersten Zyklen nach der Kalbung sind verkürzt und anöstrisch bzw. stillbrünstig, das heißt, ohne erkennbare Brunstsymptomatik, und enthalten oft nur eine Follikelwelle (SCHAMS et al. 1978, ELDON 1991, GRUNERT 1999a, CROWE 2008, RANASINGHE et al. 2010, BLAVY et al. 2016). ALLRICH (1994) nennen verschiedene Gründe für die Stillbrünstigkeit der ersten Zyklen. So wird die erste Brunst aufgrund ihres variablen Zeitpunktes nur schlecht bis gar nicht registriert, beziehungsweise sind die Estradiolspiegel nach der Kalbung noch zu niedrig (ALLRICH 1994). Follikel, die während einer Phase der negativen Energiebilanz gebildet werden, sind weniger funktionstüchtig und können die für den Schwellenwert notwendige Estradiol-Syntheseleistung nicht erreichen. Das daraus resultierende Corpus luteum ist durch niedrigere P4-Produktion und Sekretion gekennzeichnet (LAMMING et al. 1989, VANDEHAAR et al. 1995). Ein weiterer Grund für die postpartale Stillbrünstigkeit kann laut ALLRICH (1994) das Vorliegen einer sogenannten refraktären Phase der zentralen hormonellen Steuerung sein. Ausgelöst wird dieses Refraktärstadium durch den hohen Estradiolspiegel in der späten Phase der Trächtigkeit. Im ersten Zyklus kann über das produzierte E2 die „Blockade“ nicht aufgehoben werden. Somit kommt es nicht zur Überschreitung des kritischen Schwellenwertes, woraufhin das Entstehen der Brunstsymptomatik verhindert wird. Dennoch kann diese stille Brunst mit einer Ovulation einhergehen (DUCHENS et al. 1995). Erst das später aus dieser zyklischen Aktivität gebildete P4 kann diese Blockade lösen, was auch als Progesteron-*Priming* bezeichnet wird (ALLRICH 1994, FABRE-NYS und GELEZ 2007). Der erreichte P4-Spiegel ist essentiell für die Induktion von Estradiolrezeptoren und die Erhöhung der E2-Sensitivität am Hypothalamus (BLACHE et al. 1994). Nach Ablauf des *Primings*, welches in jedem weiteren Zyklus essentiell ist, ist E2 in der Lage den Schwellenwert zu überschreiten und eine Verhaltensbrunst hervorzurufen (ALLRICH 1994). DARWASH et al. (1997) stellten fest, dass es zwischen der dritten und der vierten Woche nach der Kalbung bei den meisten Tieren zur ersten Ovulation kommt. Mittels Milchprogesteronbestimmung wurde der Beginn der lutealen Aktivität, auch bezeichnet als CLA (Commencement of luteal activity) als indirekter Parameter genutzt, um Rückschlüsse auf eine davor stattgefundene Ovulation ziehen zu können (BULMAN und LAMMING 1978, DARWASH et al. 1997, ROYAL et al. 2002). Der P4-Wert, welcher stellvertretend für den Beginn lutealer Aktivität interpretiert wird, liegt bei >3 ng/ml Vollmilch (BULMAN und LAMMING 1978). Die CLA liegt laut DARWASH et al. (1997) bei durchschnittlich 26,5 Tagen. Andere Autoren geben eine weitaus größere Spanne von ca. 28,5±15 Tagen an (PETERSSON et al. 2007). WATHES et al. (2007b) fanden eine CLA zwischen 26-28 Tagen. Im Zuge der ersten ablaufenden Zyklen nach der Kalbung sind eine Verbesserung der

lutealen Durchblutung, eine höhere zelluläre Dichte des entstehenden Gelbkörpers und steigende periphere Steroidspiegel zu verzeichnen (STAPLES et al. 1990, COOLS et al. 2014).

2.2 Das Gelbkörperhormon Progesteron

2.2.1 Progesteron

Das Wort „Progesteron“ (P4) leitet sich aus dem lateinischen „pro gestare“ ab und bedeutet „für die Trächtigkeit“. Neben dem Schutz und Erhalt der Trächtigkeit, indem es relaxierend am Uterus wirkt, stimuliert es außerdem vor allen in den ersten Gestationswochen die Drüsen in der Gebärmutter und im Zervikalkanal, welcher daraufhin durch einen festen, zähpappigen Schleimpfropf verschlossen wird (GARRETT et al. 1988, BOSTEDT 2006). Für die frühe embryonale Entwicklung und Versorgung sowie für die endometriale Regulation der Genexpression ist bereits der erste postovulatorische P4-Anstieg essentieller Bestandteil (GARRETT et al. 1988, MANN und LAMMING 1999, NISWENDER et al. 2000, MORRIS und DISKIN 2008, ROBINSON et al. 2008, LONERGAN et al. 2016, SPENCER et al. 2016). Das Hormon gehört in die Gruppe der Gestagene, ist ein Steroidhormon mit 21 Kohlenstoffatomen und besitzt lipophile Eigenschaften. Die enzymatische Synthese findet ausgehend vom Cholesterin über Pregnenolon zu Progesteron statt (KÖHRLE und PETRIDES 2007). Cholesterin für die Steroidgenese kann aus verschiedenen Quellen stammen, dazu gehören die Zellmembranen, intrazelluläre Speicher von Cholesterinestern, Lipoproteine oder die de novo Synthese (DIAZ et al. 2002). Speziell bei Wiederkäuern ist zirkulierendes HDL (*high density lipoprotein*) als Hauptquelle für Cholesterin anzusehen (GWYNNE und STRAUSS 1982, GRUMMER und CARROLL 1988, WILTBANK 1990). Die P4-Synthese und -sekretion findet vor allem am Corpus luteum statt, aber auch die Plazenta und die Nebenniere können Progesteron bilden (BAMBERG 2001, YOSHIDA und NAKAO 2005). Beim Rind ist die Plazenta ca. ab dem 150. Trächtigkeitstag in der Lage, parallel zum Gelbkörper P4 zu produzieren (MÖSTL 2005). Der hormonelle Taktgeber für die Progesteronproduktion ist bei Wiederkäuern das luteinisierende Hormon (LH) (ROBINSON et al. 2006). Luteinisierendes Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen stimuliert die Aufnahme und Speicherung von Cholesterin sowie die Synthese von Progesteron in den kleinen Luteinzellen, welche ursprünglich aus den Theca-Follikelzellen entstammen (LEI 1991). Durch weitere LH-Stimuli kommt es zur Freisetzung von P4 aus den kleinen Luteinzellen und zur Weitergabe von Cholesterin an die großen Luteinzellen. Diese können nun länger andauernd und in größeren Mengen P4 synthetisieren (BAMBERG 2001). Über die Bindung an Transcortin (KÖHRLE und PETRIDES 2007), Albumin und Sexhormonbindungsglobulin (BAMBERG 2001) kann Progesteron über den Blutkreislauf zum Zielgewebe transportiert werden. Während einerseits nur ungebundenes P4 in die Zielzellen

aufgenommen werden kann, bildet proteinassoziiertes Progesteron eine Art Reservepool aus dem, falls der Hormonspiegel langsam absinkt, P4 freigesetzt und utilized werden kann. Laut BAMBERG (1994) schwanken die Blutprogesteronkonzentrationen zwischen 0,5 ng/ml Blut während der Brunst und bis zu 20 ng/ml Blut während der lutealen Blüthe phase bzw. bei einer intakten Gravidität. Der Abbau von Progesteron findet hauptsächlich in der Leber statt, wobei die Metabolismusrate von der Leberdurchblutung abhängig ist (CUMMING et al. 1971, SANGSRITAVONG et al. 2002, WILTBANK et al. 2006). Die Ausscheidung von P4 und dessen Abbauprodukte erfolgt hauptsächlich billär-enteral sowie auch renal bzw. über die Fettfraktion in der Milch (KÖHRLE und PETRIDES 2007, OBRITZHAUSER und JANACEK 2012).

2.2.2 Progesteronverlauf während des Zyklus

Die Form des Progesteronverlaufs ist für den Fortpflanzungserfolg, die embryonale Entwicklung, die Modifikation des Uterusmilieus sowie die Aufnahme und adäquate Versorgung der Fruchtanlage von entscheidender Bedeutung (INSKEEP 2004, MEIER et al. 2009b). Die Produktion und der Abbau von P4 variieren im Laufe des Zyklusgeschehens. Zunächst ist die Synthese nach der Kalbung basal, bis der Beginn der lutealen Aktivität durch eine steigende Progesteronkonzentration den Eintritt in ein reguläres Zyklusgeschehen widerspiegelt (siehe Kapitel 2.1.5) (DARWASH et al. 1997). Die zyklische Aktivität, welche sich bis zum Eintritt der Gravidität durch einen regelmäßigen An- und Abstieg des peripheren P4-Gehaltes auszeichnet, ist in Abbildung 1 vereinfacht schematisch dargestellt (LAMMING und BULMAN 1976, HOMMEIDA et al. 2004, RIOUX 2004, MARTIN et al. 2013, TALUKDER et al. 2015).

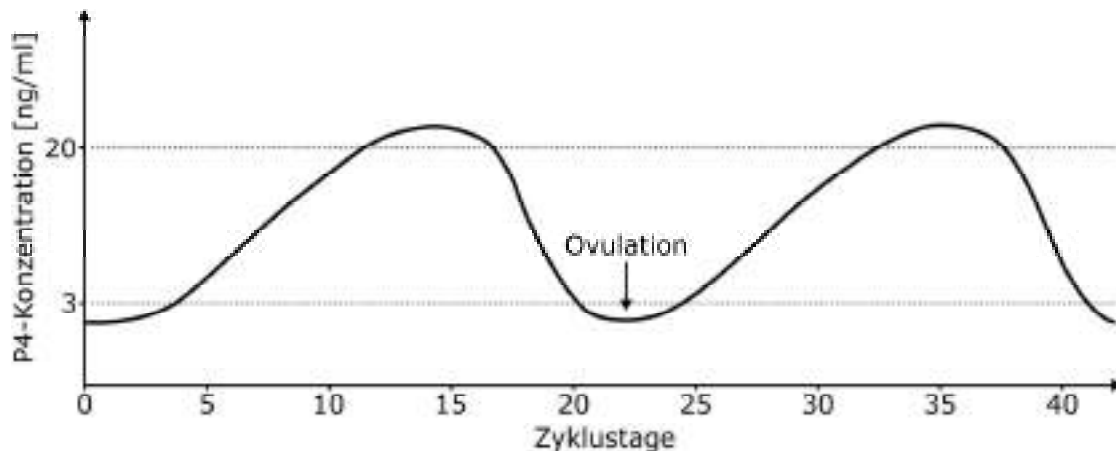


Abbildung 1: schematische Darstellung des Progesteronverlaufs während des Zyklus (Abbildung modifiziert nach RIOUX (2004), MARTIN et al. (2013) und TALUKDER et al. (2015))

Die Progesteronkonzentration vor, als auch direkt zum Zeitpunkt der Brunst ist entscheidend für den weiteren Verlauf des Hormons innerhalb eines Zyklus bzw. für die Trächtigkeitschancen im Falle einer stattfindenden Besamung (ERB et al. 1976, WALDMANN et al. 2001, GHANEM et al. 2006). So korreliert der P4-Gehalt 12 Tage vor der künstlichen Besamung (KB) positiv mit der Ausprägung der späteren Brunstsymptomatik (Progesteron-*Priming*) und der Konzeptionsrate (FONSECA et al. 1983, FABRE-NYS und GELEZ 2007). Eine kurze Follikelphase vor der KB, das heißt nur wenige Tage andauernde basale Progesteronwerte, steht in Zusammenhang mit einem besseren Trächtigkeitserfolg (RIOUX 2004, GORZECKA et al. 2011, WILTBANK et al. 2014). Auch die für das Entstehen und den Erhalt der Gravidität ausschlaggebende Hormonkonzentration zum Zeitpunkt des Eisprungs und deren schneller Anstieg in der frühen lutealen Phase wird in der Literatur mehrfach beschrieben (MORRIS und DISKIN 2008, MEIER et al. 2009a, PARR et al. 2012). Die Angaben zum Milchprogesterongehalt während der Brunst variieren sowohl in Abhängigkeit der analysierten Milchfraktion (COLAZO et al. 2008) als auch zwischen den verschiedenen Studien. So ist der Progesterongehalt im Anfangsgemelk, vorrangig bestehend aus fettarmer Zisternenmilch, deutlich niedriger als im Endgemelk, welches hauptsächlich fettreiche Alveolarmilch repräsentiert (WALDMANN et al. 1999a). In Tabelle 1 sind die Progesteronwerte nach Milchfraktion und Zyklusphase unterschieden dargestellt (DÖCKE 2001).

Tabelle 1: Progesteronkonzentrationen in verschiedenen Milchfraktionen zu verschiedenen Zyklusphasen (DÖCKE 2001)

Milchfraktion	Progesteronkonzentration in ng/ml Milch	
	Östrus	Interöstrus bzw. Trächtigkeit
Gesamtgemelk	$\leq 3,0$	$\geq 10,0$
Fettfraktion	$\leq 30,0$	$\geq 90,0$
Magermilch	$\leq 0,5$	$\geq 1,0$
Nachgemelk	$\leq 5,0$	$\geq 10,0$

Die meisten Autoren legten übereinstimmend den Grenzwert für im Östrus befindliche Tiere bei ≤ 3 ng/ml Milch fest (LAMMING und BULMAN 1976, BULMAN und LAMMING 1978, ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985, DARWASH et al. 1997, PETERS et al. 1999, GARMO et al. 2009). Aber auch Angaben wie 0-2 ng/ml Milch (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE 1999, OBRITZHAUSER und JANACEK 2012), $1,5 \pm 1,3$ ng/ml Milch (ELDON 1991), ≤ 4 ng/ml Milch (FRIGGENS et al. 2008) und ≤ 5 ng/ml Milch (NEBEL et al. 1987, WINDIG et al. 2008, RANASINGHE et al. 2011) sind in der Literatur als definierte Progesteronwerte für die Brunst zu finden. Die Phase der niedrigen Progesteronwerte im Rahmen des Brunstgeschehens sollte ein bis drei

Tage, höchstens aber vier bis sieben Tage andauern (ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985, RIOUX 2004). In der Regel kommt es ab dem vierten bis einschließlich zum 12. Tag zu einem Anstieg von P4 (RIOUX 2004), wobei die Steilheit des Anstiegs zwischen Tag vier und sieben besonders wichtig für die Fertilität ist. Es besteht ein quadratischer und linearer Zusammenhang zwischen Progesteron und der Trächtigkeitsrate an diesen Tagen nach der KB (STRONGE et al. 2005, MEIER et al. 2009a, PARR et al. 2012). Während am fünften Tag ein Progesteronwert von 3-9 ng/ml Milch als optimal gilt (MEIER et al. 2009a, OBRITZHAUSER und JANACEK 2012), sollten die Konzentrationen an den Tagen sechs und sieben 13,2 ng/ml Milch bzw. 16,8 ng/ml Milch betragen (STRONGE et al. 2005). In dieser frühen Lutealphase werden Tageszunahmen der P4-Konzentration von 4,7 ng/ml Milch als ideal für embryonales Überleben definiert (STRONGE et al. 2005). Der stärkste Anstieg der Progesteronproduktion ist bis zu Tag neun nach der Brunst zu verzeichnen (COOLS et al. 2014), wobei dessen Konzentration zwischen dem 13. und dem 14. Tag, der sogenannten Blütephase des Cl, kulminiert (MARTIN et al. 2013, BLAVY et al. 2016). Der Anstieg des P4-Gehaltes kann bis zum 16. Tag andauern, wobei er in der Regel deutlich flacher als zu Beginn der Gelbkörperphase verläuft (RIOUX 2004, COOLS et al. 2014). Folglich ist der Progesteronspiegel in der mittleren Lutealphase in Abhängigkeit von der Größe des Gelbkörpers am höchsten und kann bis zu 40 ng/ml Milch erreichen (HOMMEIDA et al. 2004, LÜTTGENAU et al. 2011, THIJSEN et al. 2011, OBRITZHAUSER und JANACEK 2012). Ab Tag 16 bis 18 beginnt bei ausgebliebener Trächtigkeit im Rahmen der Luteolyse die P4-Konzentration wieder zu sinken (RIOUX 2004). Zwischen Tag 20 und Tag 23 werden dann erneut basale Werte im Rahmen der Brunst erreicht (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE 1999). Die Abnahme der Konzentration erfolgt innerhalb von 3 ± 1 d und ist somit in der Regel schneller als der Anstieg (ELDON 1991). Mit Beginn der Reduktion der P4-Produktion steigt parallel der Estradiolspiegel an, was zur Ausprägung des nächsten Brunstgeschehens führt (MARTIN et al. 2013). Im Falle einer erfolgreichen Besamung wird aus dem Corpus luteum cyclicum definitionsgemäß ein Corpus luteum graviditatis, welches die weitere Progesteronproduktion über den 19. Zyklustag hinaus übernimmt (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE 1999, OBRITZHAUSER und JANACEK 2012).

Vor allem in Milchviehbetrieben mit einer unzureichenden Fruchtbarkeit ist es sinnvoll, Progesteronprofile zur Beurteilung der Fruchtbarkeit zu erheben und im Falle von erkannten Abweichungen einzugreifen (BLAVY et al. 2016). Abnorme Profilverläufe sind dabei häufig die Ursache für gestörte Fertilität (PETERSSON et al. 2006). HOMMEIDA et al. (2004) konnten in ihrer Studie zeigen, dass bei 83 % der Tiere, die nach der KB nicht tragend wurden, abnorme Progesteronprofile vorlagen. Allerdings wiesen auch 28 % der später als tragend diagnostizierten Tiere Abnormitäten auf (HOMMEIDA et al. 2004). Pathologische Abweichungen sind z. B. dann vorhanden,

wenn zwischen regulären Zyklen über 12 bzw. 14 Tage andauernd ausschließlich basale Progesteronwerte erhoben werden. Ebenso eine verlängerte Lutealphase ≥ 20 d ohne Vorliegen einer Trächtigkeit gilt als abnormer Progesteronverlauf (LAMMING und DARWASH 1998, MANN et al. 2005, PETERSSON et al. 2006, GARMO et al. 2009).

Sowohl durch eine tägliche Progesteronmessung in Milch oder Serum als auch über mathematische Modelle kann eine Bewertung des Fortpflanzungsstatus und eine Vorhersage zum P4-Verlauf bzw. über die daraus resultierenden Konsequenzen getroffen werden (ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985, FRIGGENS und CHAGUNDA 2005). Dabei liefern die Form des Profils, die Eigenschaften und die Variabilität Vorgaben und Maßstäbe für die Beurteilung (BLAVY et al. 2016). MEIER et al. (2009a) entwickelten ein Modell, das die Sekretion und den Metabolismus von P4 gleichermaßen integriert. Sie fanden heraus, dass die alleinige Länge der lutealen Phase nicht aussagekräftig genug ist, um eine Voraussage über die Fruchtbarkeit zu treffen (MEIER et al. 2009a, MEIER et al. 2009b). Es existieren diverse Modelle, die zwischen drei bis sechs Formen von Profilverläufen unterscheiden (HOMMEIDA et al. 2004, FRIGGENS und CHAGUNDA 2005, MEIER et al. 2009b, MARTIN et al. 2013, BLAVY et al. 2016). MARTIN et al. (2013), MEIER et al. (2009b) und BLAVY et al. (2016) unterscheiden unabhängig voneinander drei ähnliche Formen der Progesterondynamik. Der erste Profiltyp ist durch einen steilen An- und Abstieg von Progesteron und einem deutlich definierten *Peak* gekennzeichnet. Der zweite Typ wird mit einem seichterem Anstieg und einem *Peak* mit Plateaubene (Glockenform) beschrieben und der dritte Profilverlauf zeichnet sich durch ein wellenartiges Muster mit keinem eindeutigen *Peak* der Progesteronkonzentration aus. FRIGGENS et al. (2005) entwickelten zusätzlich ein dynamisches Modell, in welches neben dem ermittelten Progesteronwert auch Rasse, Parität, letzte Kalbung, Besamungsdatum, *Body Condition Score* (BCS) und Erkrankungen aus dem aktuellen und dem vorangegangenen Zyklus einbezogen werden können. Solche Modelle sind in der Lage, durch rechnerische Vorhersagen an verschiedenen Zeitpunkten im Zyklus potentiell abnorme Hormonverläufe bei Rindern gezielt zu ermitteln. Somit stellen sie ein wichtiges Instrument für das Fruchtbarkeitsmanagement eines modernen Hochleistungsbetriebes, welches Ernährung, Laktations- und Gesundheitsstatus integrieren kann, dar (MEIER et al. 2009a).

2.2.3 Einflussfaktoren auf Progesteron, Brunstverhalten und Fruchtbarkeit

Viele verschiedene endo- und exogene Faktoren, wie Klima, Haltungssystem bzw. Aufstallung, Management, Stress, Fütterung, *Body Condition Score* (BCS), Energiebilanz (EB), Gesundheitsstatus, Leistung, Rasse und Alter der Tiere können einzeln oder in Kombination Einfluss auf den Progesteronhaushalt, das Brunstverhalten und die Fruchtbarkeit nehmen (FONSECA et al. 1983,

LOTTHAMMER 1999, LOPEZ et al. 2004, MAHLKOW-NERGE et al. 2005, SHELDON et al. 2006, CHAGAS et al. 2007, BLAVY et al. 2016).

Die Form der **Aufstallung und Haltung** hat dabei eine wichtige Bedeutung für das Sexualverhalten und die Brunsterkennung (MAHLKOW-NERGE et al. 2005, PALMER et al. 2010). So ist bei Tieren, die in einem Anbindestall gehalten werden, die Fertilität im Vergleich zur Laufstall- oder Weidehaltung aufgrund mangelnder Bewegung und Interaktion zwischen den Kühen sowie erschwelter Östrusdetektion für den Landwirt reduziert (DE KRUIF 1978). Auch die Größe der Laufbox sowie Tierdichte und Bodenbeschaffenheit nehmen Einfluss auf das Brunstverhalten (BECKER et al. 2005, MAHLKOW-NERGE et al. 2005). Die während der Brunst auftretende Aktivitätssteigerung der Tiere, welche als Hauptmarker der visuellen Brunstbeobachtung gilt, wird durch rutschigen Fußboden verringert bzw. kaum ausgeprägt (VAILES und BRITT 1990). Neben der Brunstintensität wird auch die Brunstdauer durch ungünstigen Boden negativ beeinflusst (STEVENSON 2001). Nach BECKER et al. (2005) könnte die Brunsterkennung über eine tiergerechte Anpassung der Laufgänge vor allem vor dem Melkstand verbessert werden. Durch unzureichende Bodeneigenschaften erhöht sich der Anteil klauenerkrankter und lahrender Kühe. Im Zuge einer Erkrankung des Bewegungsapparates kommt es durch erhöhte Stress- und Schmerzlevel zum Herabsetzen der Brunstintensität, keine Teilnahme bei sexuell aktiven Tiergruppierungen, vermehrtes Liegen und dadurch begünstigte Verschlechterung der Brunsterkennungsrate (ROELOFS et al. 2010, WALKER et al. 2010, HOLMAN et al. 2011). Folglich bewirken Probleme mit den Gliedmaßen eine Verlängerung von Rast- und Günstzeit (O'CONNOR 1993). DOBSON und SMITH (2000) stellten fest, dass krankheitsbedingter Stress die Hypothalamus-Hypophysenachse negativ beeinflusst, was sich durch niedrigere GnRH- und LH-Impulse verdeutlicht. Dadurch können die Ausprägung des Brunstverhaltens bzw. auch die luteale Genese und Funktion massiv gestört werden (GARVERICK et al. 1992, BUTLER 2000, DOBSON und SMITH 2000). WALKER et al. (2010) fanden heraus, dass lahrende Tiere im Vergleich zu klauengesunden Kühen sechs Tage vor der Brunst bei gleichen E2 Werten signifikant niedrigere Progesteronspiegel aufwiesen ($p < 0,05$). Daraus lässt sich die reduzierte Brunstsymptomatik der lahrenden Tiere über ein vermindertes oder gar ausbleibendes Progesteronpriming vor dem Östrus ableiten (WALKER et al. 2010, MORRIS et al. 2011).

Der Einfluss der **Tageszeit** auf die Östrusausprägung wird kontrovers diskutiert (DRANSFIELD et al. 1998, DISKIN und SREENAN 2000). Während bei DRANSFIELD et al. (1998) der Zeitpunkt des Brunstbeginns zu jeder Tages- und Nachtzeit liegen kann, zeigten DISKIN und SREENAN (2000) eine vermehrte Östrusdetektion in den frühen Morgen- und späten Abendstunden. Die Erklärung dafür könnte in erhöhter Aufmerksamkeit und in einer managementbedingt intensiver durchgeführten Brunstbeobachtung zu genau diesen Zeiten sein (BECKER et al. 2005). BECKER et al. (2005) konnten

weder im Blutplasma noch in der Follikelflüssigkeit einen gerichteten Zusammenhang zwischen Progesteron- sowie Estradiolspiegel und dem Tagesverlauf feststellen.

Weniger nehmen die Tageszeiten direkt als **klimatische Faktoren** indirekt Einfluss auf die Brunsterkennung im Tagesverlauf (SARTORI et al. 2002). So können hohe Umgebungstemperaturen tagsüber dazu führen, dass die Tiere deutlich häufiger in der Nacht in Brunst kommen (TUCKER 1982). Stalltemperaturen über 32°C und eine hohe Luftfeuchtigkeit reduzieren die Brunstaktivität und damit deren Detektion am Tag signifikant (GWAZDAUSKAS et al. 1983, O'CONNOR 1993, SARTORI et al. 2002). Die Konzeptions- und Nidationsraten sind daher in den Sommermonaten deutlich reduziert, was auf eine hitzebedingte Qualitätsreduktion der Oozyte und niedrigere Progesteronspiegel zurückgeführt wird (ROSENBERG et al. 1982, SARTORI et al. 2002, BROWN et al. 2016). Eine durch Hitzestress bedingte Fertilitätsreduktion kann dabei bis zu mehreren Wochen nach der erhöhten Umgebungstemperatur andauern (FONSECA et al. 1983). FONSECA et al. (1983) fanden heraus, dass lang einwirkende Hitze ein verlängertes Intervall bis zum Beginn der lutealen Aktivität nach der Kalbung begünstigen kann. Aktuelle Studien zeigen, dass Hitzestress in den letzten Wochen der Gravidität auch die Fertilität und Leistungsfähigkeit der nachfolgenden Generation negativ beeinflussen kann (BROWN et al. 2016, MONTEIRO et al. 2016).

Laut BLAVY et al. (2016) ist die individuelle Fruchtbarkeit das Resultat einer Kette von Ereignissen, die innerhalb des Tieres ablaufen. Wenn es zu einer Störung bzw. einer Veränderung oder zur Beeinflussung einer oder mehrerer Ereignisse kommt, können die Auswirkungen abhängig davon, an welcher Stelle die Beeinträchtigung stattfand, mehr oder weniger einflussreich auf die gesamte Fertilität sein. Reduktion der Oozytenentwicklung oder der Befruchtungsfähigkeit der Eizelle, Nidationsstörungen und auch Begünstigung des embryonalen Fruchttods können dabei mögliche Folgen sein (BLAVY et al. 2016). So werden z. B. Tiere mit **postpartalen Störungen** nachweislich deutlich später erneut besamt und tragend (FONSECA et al. 1983). Die Zeit zwischen der Kalbung und dem Laktations-*Peak* stellt eine wichtige Phase für die individuelle reproduktive Leistung eines jeden Tiers dar (BUTLER und SMITH 1989). Vor allem die in den ersten postpartalen Wochen vorkommende negative Energiebilanz (NEB) hat großen Einfluss auf die Ausprägung des Sexualverhaltens und den Wiedereintritt in den Zyklus (BUTLER und SMITH 1989, WILTBANK et al. 2006). So liegt laut BUTLER und SMITH (1989) bei bis zu 92 % der Tiere eine NEB nach der Kalbung vor, welche in Dauer und Ausprägung sehr variabel sein kann. Die durchschnittliche NEB beträgt $69,6 \pm 5,9$ Tage, wobei die Spanne zwischen vier bis 98 Tagen liegen kann (VILLA-GODOY et al. 1988). In extremen Fällen kann sie sogar bis zu 20 Wochen anhalten (BEEVER et al. 2001). Der Energiebedarf zu Beginn der Laktation bis einschließlich in der Hochlaktation ist nahezu dreimal höher als der Erhaltungsbedarf eines Rindes. Die Energiebilanz ist maßgeblich von der aufgenommenen Energiemenge abhängig

(VILLA-GODOY et al. 1988). Kann die benötigte Energie nicht aus dem Futter gewonnen werden, kommt es zur Mobilisation körpereigener Reserven (BUTLER und SMITH 1989). Durch Zucht und Selektion auf Milchleistung sind heutige Hochleistungsrinder deutlich schneller in der Lage, eigene Körperreserven zu mobilisieren, was automatisch mit einem schnellen Körpermasseverlust einhergeht (PRYCE et al. 2004). Im ersten Laktationsdrittel wird ein *Body Condition Score* (BCS) von 2,75-3,0 als optimal angegeben (SPANN 2007). Die Mobilisation körpereigener Reserven ist durch den Prozess der Lipolyse gekennzeichnet, welche durch endogene Glukokortikoide stimuliert wird (COOK et al. 1987, SALLMANN und FUHRMANN 2005). Erhöhte Stresshormonspiegel und andauernde NEB führen zur Reduktion der Ausprägung des Brunstverhaltens (COOK et al. 1987, ALLRICH 1994). Tiere mit hohem BCS-Verlust haben einen erhöhten Spiegel an freien, unveresterten Fettsäuren (NEFAs) (MEIKLE et al. 2004, SALLMANN und FUHRMANN 2005, WATHES et al. 2007b). Nach SALLMANN und FUHRMANN (2005) ist die Lipolyserate umso größer, je länger die Phase der NEB anhält. Ein gravierendes Problem, welches daraus entstehen kann, ist die Verfettung und damit Funktionsbeeinträchtigung der Leber (BUTLER und SMITH 1989). Die NEFAs werden aus den Fettspeichern entlassen und dienen der Energie- bzw. Ketonkörperproduktion. Damit reflektiert ihr Gehalt im Blut die Fettsäureoxidationsrate (WATHES et al. 2007b). Eine Prädisposition, um postpartal Verdauungs- oder Infektionskrankheiten wie auch metabolische Störungen, z. B. Ketosen, zu entwickeln, die die fertile Leistung beeinträchtigen, haben vor allem Tiere, die am sogenannten „*fat cow syndrome*“ leiden (BUTLER und SMITH 1989). Diese Tiere sind in der späten Laktation und in der Trockenstehphase über den Bedarf hinaus gefüttert worden. Sie neigen dazu, aufgrund hoher postpartaler NEB und assoziiert mit den genannten Erkrankungen Nachgeburtsverhaltungen, Endometritiden, gestörte Uterusinvolutionen und ovarielle Zysten zu entwickeln (BUTLER und SMITH 1989, BLAVY et al. 2016). Einige Studien fanden einen direkten Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht zum Zeitpunkt der Kalbung und der Höhe der BCS-Reduktion in den ersten Laktationstagen (VILLA-GODOY et al. 1988, RÖMER 2011). Laut RÖMER (2011) bauen schwere Kühe in den ersten fünf Laktationstagen deutlich mehr Gewicht ab als leichtere Tiere. Eine starke Reduktion der Körperkondition und hohe NEB im peripartalen Zeitraum führen dazu, dass die CLA und die Wartezeit verlängert sind (BUTLER und SMITH 1989, BUTLER 2005, SHAMSUDDIN et al. 2006, ROCHE et al. 2007, WINDIG et al. 2008). Der Beginn des Zyklus korreliert negativ mit dem *Body Condition Score* (BCS) zum Zeitpunkt der Kalbung (DECHOW et al. 2002). Auch PETERSSON et al. (2006) und WATHES et al. (2007b) bestätigen das verlängerte Zwischentrage- und Zwischenkalbeintervall bei BCS-Reduktion. Tiere, welche eine Gewichtsreduktion über 50 kg in den ersten Tagen nach der Kalbung hatten bzw. als sehr mager eingestuft wurden (BCS von $1,5 \pm 0,15$), zeigten dabei einen signifikant späteren Beginn der lutealen Aktivität (CLA) im Vergleich zu Tieren mit

einem moderaten Gewichtsverlust ($p < 0,05$) (PETERSSON et al. 2006). Je besser sich die energetische Situation in den ersten 28 d p.p. darstellt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die luteale Aktivität frühzeitig nach der Kalbung wieder einsetzt ($p = 0,04$) (PATTON et al. 2007). Bis zu 45-55 % der Tiere, die eine stark ausgeprägte NEB aufweisen, zeigen irreguläre Zyklen nach der Kalbung (ROYAL et al. 2000, TAYLOR et al. 2004). Metabolisches Resultat der NEB ist neben dem erhöhten Ketosevorkommen, hohen NEFA- und Blutharnstoffgehalten auch ein reduzierter Spiegel an Plasmaglukose, *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) und Insulin (BUTLER und SMITH 1989, JUENGEL et al. 1997, TAYLOR et al. 2004, WATHES et al. 2007b). Die Glukose wird dabei vor allem für die Milchproduktion, im Speziellen für die Laktosesynthese benötigt (BUTLER und SMITH 1989, RADCLIFF et al. 2003). WATHES et al. (2007b) fanden heraus, dass ein Blutharnstoffgehalt über 7,5 mmol/l nach der Kalbung zu einer Verzögerung der CLA beiträgt. Der Harnstoffgehalt führt zu einer intrauterinen pH-Wert-Senkung, die das Uterusmilieu verändert und die PGF 2α -Sekretion erhöht (BUTLER et al. 1996). Sowohl COOLS et al. (2014) als auch MANN et al. (2005) konnten hingegen keinen Zusammenhang zwischen Blutharnstoff- und Progesteronkonzentration in der Puerperalphase feststellen. Aufgrund der NEB in den ersten postpartalen Wochen wird die Leber vermehrt belastet. Das führt dazu, dass nicht ausreichend IGF-1 synthetisiert werden kann (SPICER et al. 1990, KANITZ et al. 2003). Die Senkung von Glukose, IGF-1 und Insulin führt zu einer Reduktion der LH-Impulse, das wiederum negativen Einfluss auf die Ovulation und die nachfolgende luteale Funktion hat (RUTTER und MANNS 1987, BUTLER und SMITH 1989, BUTLER 2000, LUCY 2001, BUTLER 2003, ROBINSON et al. 2006). Insulin hat auf allen Ebenen der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse eine regulierende Wirkung (LUCY 2001). Auch die Freisetzung von endogenen Opioiden, assoziiert mit der Futteraufnahme, kann die LH-Ausschüttung modulieren (BUTLER und SMITH 1989). SHELTON et al. (1990) fanden heraus, dass Tiere, die einen verzögerten Progesteronanstieg in der frühen lutealen Phase aufwiesen, nachweislich häufiger umrindern. Die luteale Unzulänglichkeit oder Insuffizienz wird mit einer mangelnden LH-Unterstützung in Zusammenhang gebracht und tritt gehäuft in Kombination mit NEB auf (SHELTON et al. 1990, MANN und LAMMING 2001).

ROCHE et al. (2000) schlussfolgerten aus vorangegangenen Studien, dass das Vorhandensein der **NEB** dazu führt, dass der im Östrus angebildete dominante Follikel kleiner ist. Als Ursachen gelten sowohl ein verändertes Milieu durch erhöhte NEFA und β -Hydroxybutyrat (BHB)-Spiegel in der Follikelflüssigkeit als auch reduzierte Estradiolgehalte (LANDAU et al. 2000, JORRITSMA et al. 2003, LEROY et al. 2004, LOPEZ et al. 2004, VANHOLDER et al. 2005). Unveresterte freie Fettsäuren haben einen negativen Effekt auf die Funktion und die Proliferation von Granulosa- und Theca-Follikelzellen durch erhöhte Induktion der Apoptose (VANHOLDER et al. 2005). Aus einem in der NEB herangereiften Graafschen Follikel entsteht ein kleineres Corpus luteum mit geringerer P4-

Sekretionsleistung (VILLA-GODOY et al. 1988, VANDEHAAR et al. 1995, ROCHE et al. 2000). Die NEB hat einen modulierenden Effekt auf die Progesteronproduktion (VILLA-GODOY et al. 1988), welcher sich in der Reduktion des peripheren P4-Spiegels verdeutlicht (SPICER et al. 1990, BLAVY et al. 2016). Auch die verminderte luteale Angiogenese durch erhöhte NEFAs und die gesteigerte hepatische Steroidclearance durch vermehrte Trockenmasseaufnahme (*Dry Matter Intake*, DMI) und der dadurch verstärkte Leberblutfluss während der NEB korrelieren negativ mit dem peripheren Progesteron- und Estradiolwerten (CUMMING et al. 1971, HOMMEIDA et al. 2004, LEROY et al. 2004, LOPEZ et al. 2004, VANHOLDER et al. 2005, WILTBANK et al. 2006, COOLS et al. 2014). Fütterungsversuche konnten zeigen, dass sowohl der verwendete Eiweißträger (Raps vs. Sojaextraktionsschrot) als auch die Futtermengen und die Frequenz, in denen das Futter vorgelegt wird, Einfluss auf den Steroidmetabolismus haben (VASCONCELOS et al. 2003, SARTORI et al. 2004, COOLS et al. 2014). So war in der Studie von COOLS et al. (2014) die luteale Angiogenese und die Steroidsyntheseleistung in der mit Rapsschrot gefütterten Gruppe signifikant besser, als bei den Tieren, die Sojaschrot erhielten ($p < 0,001$). Vier Stunden postprandial kommt es zu einer Durchblutungssteigerung im Bereich der Lebergefäße um bis zu 58 % (SANGSRITAVONG et al. 2002). So führt mehrmalige Futtervorlage in kleineren Mengen zu einem moderaten und kontinuierlichen Anstieg der Leberdurchblutung und folglich zu einem verringerten hepatischen Abbau der Steroidhormone (VASCONCELOS et al. 2003). Neben der vermehrten Verstoffwechselung von P4 durch erhöhten Lebermetabolismus gibt es bei Hochleistungsrindern einen Verlust von Progesteron über die Fettfraktion in der Milch (SANGSRITAVONG et al. 2002, SARTORI et al. 2004, COOLS et al. 2014). Des Weiteren führen niedrige P4-Werte vor und nach der künstlichen Besamung zu reduzierten Trächtigkeitserfolgen (FONSECA et al. 1983, HOMMEIDA et al. 2004). An Schafen konnte gezeigt werden, dass ein verminderter IGF-1 Gehalt zur Reduktion der P4-Synthese führt (JUENGEL et al. 1997). Die Länge der lutealen Phase im Zyklus bleibt dabei in der Regel unbeeinträchtigt (VILLA-GODOY et al. 1988).

Auch der Einfluss von Leptin auf die Reproduktion wird diskutiert (BLACHE et al. 2000, SPICER 2001, WATHES et al. 2007b). So fanden BLACHE et al. (2000) heraus, dass erhöhte präpartale Leptinspiegel zu einer Appetitreduktion führen, was wiederum eine reduzierte DMI und damit den BCS-Abbau postpartal begünstigt. Des Weiteren weisen Tiere mit einem höheren Leptinspiegel häufiger eine verlängerte Zwischentragezeit auf (MANN et al. 2005, WATHES et al. 2007b). Niedrige Trächtigkeitsraten, schlechte Oozytenreifung, persistierende dominante Follikel und geringe embryonale Qualität können mit hoher postpartaler NEB, erhöhtem Ketonkörperspiegel sowie reduziertem IGF-1 Gehalt in Verbindung gebracht werden (INSKEEP 2004, TAYLOR et al. 2004, WALSH et al. 2007, BLAVY et al. 2016). WALSH et al. (2007) fanden reduzierte Besamungserfolge und bis zu 20 %

reduzierte Konzeptionschancen bei Tieren, die an klinischen oder subklinischen Ketosen nach der Kalbung litten. Hohe DMI nach der Kalbung wirkt sich hingegen positiv auf den Erstbesamungserfolg und die Zwischentragezeit aus (PATTON et al. 2007).

Um die energetische Situation eines Tieres näher klassifizieren zu können, wird der monatlich über die Milchleistungsprüfung (MLP) ermittelte Milcheiweißgehalt als indirekter Parameter genutzt, wobei niedrige Milcheiweißgehalte hinweisend für eine negative Energiebilanz sowie das Vorkommen subklinischer oder klinischer Ketosen sind (SPOHR und WIESNER 1991, LOTTHAMMER 1999). Ist in der Milch postpartal die Eiweißfraktion hoch, ist die Phase bis zum Beginn der lutealen Aktivität kürzer als bei niedrigem postpartalem Milcheiweißgehalt ($p > 0,05$). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Milchproteingehalt die CLA positiv beeinflusst (PATTON et al. 2007, WINDIG et al. 2008).

Auch die **Milchleistung** ist ein wichtiger Einflussfaktor auf die Fertilität eines Rindes. Eine steigende Milchleistung korreliert negativ mit dem Erstbesamungserfolg (LYIMO et al. 2000, LUCY 2001, HOMMEIDA et al. 2004). Da die Leberdurchblutung, welche den Steroidstoffwechsel unmittelbar beeinflusst, bei laktierenden Kühen fast doppelt so hoch wie bei nicht laktierenden ist, kommt es zu Reduktion des Estradiolgehaltes, was zur Verkürzung der Brunstdauer und einer geringeren Östrusintensität führt (SANGSRITAVONG et al. 2002, WILTBANK et al. 2006, RANASINGHE et al. 2010). LOPEZ et al. (2004) bestätigen in ihren Untersuchungen dieses Ergebnis. Tiere mit einer durchschnittlichen Tagesmilchleistung von 28 kg befanden sich 11,1 h im Östrus, während bei Rindern mit einer Leistung von 40,4 kg/d die Brunst mit 6,9 h signifikant kürzer andauerte (LOPEZ et al. 2004). WILTBANK et al. (2006) ermittelten für Tiere mit ≥ 55 kg Milch pro Tag sogar eine Brunstdauer von unter drei Stunden. Ferner hat die genetische Voraussetzung für die Milchproduktion Einfluss auf reproduktive Merkmale (GARMO et al. 2009). In einer Studie von GARMO et al. (2009) konnte nachgewiesen werden, dass Kühe, die genetisch ein großes Potential für hohe Milchleistung haben, eine signifikant längere CLA hatten, als Tiere ohne diese Voraussetzungen. Zwischen laktierenden und nicht laktierenden Milchkühen unterscheidet sich die Gelbkörperaktivität signifikant ($p < 0,05$). Rinder mit einer hohen Gesamtlaktationsleistung haben im Vergleich zu Tieren, die weniger Milch produzieren, eine signifikant längere CLA ($p < 0,01$; $41,7 \pm 8,0$ d vs. $24,1 \pm 1,1$ d) sowie häufiger unterbrochene oder verlängerte luteale Phasen (MANN et al. 2005, WATHES et al. 2007b, WINDIG et al. 2008). WILTBANK et al. (2006) resümierten aus mehreren Studien, dass der Brunstfollikel bei hochleistenden Rindern signifikant größer ist, aber der Estradiolgehalt dennoch niedriger als bei Tieren mit geringer Milchleistung ist. Damit lässt sich die kürzere Östrusdauer bei hochleistenden Tieren erklären (WILTBANK et al. 2006). FAUST et al. (1988) fassten bereits zusammen, dass, eingeteilt nach der gesamten Laktationsleistung, Hochleistungsrinder schlechtere Erstbesamungserfolge (EBE) als Tiere mit geringerer Milchleistung zeigten. Bei Tieren mit < 7250 kg Milch pro Laktation waren 56,5 % nach

der ersten KB tragend. Bei einer Leistung von 7250-9750 kg Milch war der Erstbesamungserfolg mit 37,8 % bereits niedriger und bei Tieren, die über 9750 kg Milch pro Laktation hatten, war ein EBE von nur noch 17,4 % zu verzeichnen (FAUST et al. 1988). Folglich ist die Zwischentragezeit (ZTZ) bei hochproduzierenden Tieren deutlich länger (WATHES et al. 2007b). Andere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen der Milchleistung, CLA, Progesteronproduktion und Zwischentragezeit bei schwarzbunten Milchrindern feststellen. Allerdings wurden dafür wenig Versuchstiere (z.B. 8 Färsen, 24 Kühe) bzw. ausschließlich Tiere der ersten Laktation in die Studien integriert und somit einen Vergleich erschwert oder nicht möglich macht (VILLA-GODOY et al. 1988, DE LA SOTA et al. 1993, PATTON et al. 2007, WINDIG et al. 2008). STRONGE et al. (2005) stellten die Vermutung auf, dass aufgrund einer hohen produzierten Milchmenge das Progesteron darin verdünnt werden würde. So kann über die Milch bestimmtes P4 bei Hochleistungsrindern eventuell niedriger sein, als der im peripheren Blut vorhandene Spiegel (STRONGE et al. 2005).

Auch der **rasseabhängige Einfluss** auf die Fruchtbarkeit wird vielfach diskutiert. Die Milchleistung wie die daraus resultierende Energiebilanz sind durch die Rasse genetisch festgelegt (FRIGGENS et al. 2007, WINDIG et al. 2008). So wird die Reproduktive Leistung bei Jerseykühen durch die Menge und Qualität der produzierten Milch deutlicher als bei schwarzbunten Milchrindern beeinflusst (FONSECA et al. 1983). Kühe der Rasse *Danish red* haben einen signifikant kürzeren Zyklus als Jerseys und einen signifikant längeren Zyklus als Holstein Friesians (FRIGGENS et al. 2007). Die Östrusdauer und -intensität ist bei Tieren der Rasse Jersey kürzer und weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu anderen Rinderrassen (LÖVENDAHL und CHAGUNDA 2010). Die CLA hingegen ist nach FRIGGENS et al. (2007) nicht signifikant unterschiedlich zwischen den genannten drei Rassen. In einer Studie von PETERSSON et al. (2006) hatten Schwedisch Rotbunte eine höhere Wahrscheinlichkeit irreguläre Zyklen zu entwickeln als Schwedisch Holstein-Kühe. Nordamerikanische Holstein Friesian zeigten im Vergleich zu Neuseeländischen Artgenossen signifikant mehr atypische Progesteronverläufe während des Zyklusgeschehens und eine schlechtere Fruchtbarkeit (MEIER et al. 2009b).

Des Weiteren spielt auch die **Parität der Tiere** für die fertile Leistung eine wichtige Rolle. So gibt es z. B. metabolisch und hormonell signifikante Unterschiede zwischen Erstkalbinnen und multiparen Tieren (MEIKLE et al. 2004, WATHES et al. 2007a, THOMPSON et al. 2012). Die Anzahl der Kalbungen steht in direkter Verbindung zur Fähigkeit Reserven zu mobilisieren. Kühe ab der dritten Laktation nutzen deutlich intensiver die Lipolyse körpereigener Speicher als die der ersten und zweiten Laktation (FRIGGENS et al. 2007). Somit schwankt die Ausprägung der NEB mit dem Alter und der Anzahl der Kälber, die geboren werden (VILLA-GODOY et al. 1988). VILLA-GODOY et al. (1988) konnten zeigen, dass nach der neunten Kalbung die NEB bei bis zu 81 % der Tiere sehr deutlich und langanhaltend ausgeprägt war im Vergleich zu Kühen mit weniger Kälbern. WATHES et al. (2007b)

konnten nachweisen, dass erstgebärende Kühe weniger Milch produzieren und somit die BHB-Spiegel niedriger und die IGF-1 Konzentrationen deutlich höher waren als bei multiparen Tieren. Primipare Rinder haben einen fast doppelt so hohen IGF-1-Spiegel, sodass sich ein geringgradiger Mangel weniger stark auf die Fertilität auswirkt (TAYLOR et al. 2004). Wie die Energiebilanz verändert sich ebenso der Lebersteroidmetabolismus mit dem Alter und der Parität. So ist bei primiparen Kühen sowohl der Progesteron- als auch der Estradiolspiegel im ersten Zyklus nach der Kalbung signifikant höher als bei multiparen Tieren (WOLFENSON et al. 2004, COOLS et al. 2014). Kühe ab der vierten Laktation haben einen signifikant späteren Eintritt in die luteale Aktivität nach der Kalbung (ROYAL et al. 2000, FRIGGENS et al. 2007). Ferner zeigt die luteale Angiogenesefähigkeit eine sinkende Tendenz mit zunehmendem Alter, was häufig im Zusammenhang mit erhöhtem Verlust von Trächtigkeiten bei älteren Tieren genannt wird (LUCY 2001, SANGSRITAVONG et al. 2002, COOLS et al. 2014).

Weitere Faktoren, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird, beeinflussen die Fertilität. So haben geburtsassoziierte Erkrankungen, Infektionen und puerperale Involutionsstörungen des Uterus sowie chronische uterine Veränderungen eine modulierende Bedeutung für die Fruchtbarkeit und können den Wiedereintritt in ein reguläres Zyklusgeschehen behindern (WILTBANK et al. 2002, SHELDON et al. 2006). Der Anteil an ovariellen Zysten oder persistierenden Corpora lutea ist bei uterinen Störungen, aufgrund mangelnder hormoneller Rückkopplung der Gebärmutter, deutlich erhöht (FONSECA et al. 1983). Somit können die Follikelreifung und Ovulation beeinträchtigt werden (BULMAN und LAMMING 1978). Auch systemische Infektionen wie BVD oder Neosporose haben Einfluss auf die fertile Leistung (SHELTON et al. 1990, SANTOS et al. 2004). Spermaqualität, Besamungsregime und Können des Besamungstechnikers sind weitere Gründe, die zu reduzierter Fruchtbarkeit und damit verbunden zu schlechteren Fruchtbarkeitskennzahlen des Betriebes führen können (MAHLKOW-NERGE et al. 2005).

2.3 Fruchtbarkeitskennzahlen und Brunstbeobachtung

2.3.1 Erläuterung der wichtigsten Fruchtbarkeitskennzahlen

Zur Beurteilung der reproduktiven Situation eines Milchviehbetriebes werden mittels Besamungsdaten z. T. auch in Zusammenhang mit der MLP verschiedene Kennzahlen erhoben bzw. berechnet und entsprechend bewertet. Diese Daten können genutzt werden, um Defizite im Fruchtbarkeitsmanagement zu entdecken und mit entsprechenden Maßnahmen an geeigneter Stelle zu intervenieren. Folgende Parameter sind dabei die geläufigsten:

Der **Besamungsindex** (BI), auch als Gesamtindex (GI) bezeichnet, entspricht der Gesamtanzahl an aufgewendeten Inseminationen je erreichter Trächtigkeit. Als eine Abwandlung dieses Wertes ist der

Erstbesamungsindex zu nennen, welcher sich ausschließlich aus den durchgeführten Erstbesamungen errechnet. Der BI (gesamt) sollte innerhalb der Herde zwischen 1,8 und 2,0 liegen, wobei bei Kühen <1,8 und bei Färsen <1,7 als Optimum angegeben wird (MAHLKOW-NERGE et al. 2005, ANON. 2017).

Die **Trächtigkeitsrate** (TR) ist eine Kenngröße, die sich aus dem Anteil tragend gewordener Tiere im Vergleich zur Anzahl der aufgewendeten Besamungen ermitteln lässt. Abwandlungen dieses Wertes können errechnete Trächtigkeitsraten, ausschließlich bezogen auf die Erstbesamung („Erstbesamungserfolg“), bzw. Nachbesamungen darstellen. Angestrebt wird eine TR von 80-85 % für den gesamten Bestand, wobei idealer Weise bei Kühen 75-80 % und bei Färsen 90-95 % TR zu verzeichnen sein sollten (ANON. 2017).

Die **Non-Return-Rate** (NRR) bezeichnet eine Größe, die die Anzahl der Tiere integriert, welche innerhalb von 56 (bei NRR 56) bzw. 90 Tagen (bei NRR 90) nach Erstbesamung keine erneute Belegung benötigten. Diese Tiere gelten als voraussichtlich tragend. Die erstrebenswerten Richtwerte liegen dabei für die NRR 56 ≥ 75 % bzw. bei der NRR 90 ≥ 65 % (ANON. 2017).

Im Anschluss an eine Trächtigkeit und Kalbung folgt die sogenannte **Warte- oder Rastzeit** (WZ bzw. RZ), welche sich aus der Pflichtwartezeit und der freiwilligen Wartezeit zusammensetzt und mit der Durchführung der ersten KB beendet wird. Sie beträgt im Regelfall 60 bis 85 Tage (MANSFELD et al. 1999, MAHLKOW-NERGE et al. 2005). Als physiologisch bedingte **Mindestrast- bzw. Pflichtwartezeit** werden die Tage nach der Kalbung bezeichnet, in denen das Puerperium klinisch und histologisch abgeschlossen wird bzw. die uterine Involution stattfindet. In dieser Phase sollte aufgrund reduzierter Trächtigkeitschancen und potentiell negativen Einflusses auf die Regeneration der Gebärmutter keine Besamung stattfinden. Die Mindestwartezeit beträgt in der Regel 42 Tage (ANON. 2017). Daran schließt sich eine sogenannte **freiwillige Wartezeit** an, welche betriebsintern, orientiert an Kondition und Leistung der Tiere, festgelegt wird und oftmals zwischen 20-40 Tage beträgt.

Eine weitere wichtige Kenngröße stellt die **Verzögerungszeit** (VZ) dar. Sie schließt sich direkt an die WZ an und bezeichnet die Zeitspanne, die zwischen Erstbesamung (EB) und der Besamung, die zum Trächtigkeitserfolg führte, liegt (VIT 2017). Im optimalen Fall werden die Tiere bei der EB tragend und die VZ beträgt null. Als Richtwert gilt, dass sie für Kühe unter 30 und für Jungrinder unter 20 Tagen liegen sollte (ANON. 2017).

Zusammen aus WZ und VZ ergibt sich die **Zwischentrage- oder Günstzeit** (ZTZ) bzw. auch als Serviceperiode bezeichnete Phase. Sie gibt Auskunft darüber, wie viele Tage zwischen der letzten Kalbung und dem ersten Trächtigkeitstag liegen (MANSFELD et al. 1999). Für den gesamten Bestand wird dabei eine ZTZ von 85-125 Tagen als ideal angesehen (LYIMO et al. 2000, ANON. 2017). Daraus

kann die **Zwischenkalbezeit** (ZKZ), d. h. der Zeitraum, der zwischen zwei Kalbungen liegt, abgeleitet werden. Die ZKZ sollte zwischen 365 und 400 Tagen betragen (LYIMO et al. 2000, BOSTEDT 2006).

Die **Brunsterkennungsrate** bezeichnet den Anteil erkannter Brunsten, ungeachtet dessen, ob diese für die Besamung genutzt werden oder nicht, im Verhältnis zu den in der Brunstbeobachtung befindlichen Kühe, d.h. Tiere nach Ablauf der WZ. Diese Kenngröße ist maßgeblich von der Qualität der genutzten Brunstbeobachtungsmethode abhängig.

2.3.2 Bedeutung der Brunstbeobachtung für einen Milchviehbetrieb

Zur Erhaltung eines effizient leistenden Milchviehbetriebs spielt die Überwachung der Brunst eine essentielle Rolle. Um den Brunst- und Besamungszeitpunkt optimal zu gestalten, ist die engmaschige Kontrolle eines jeden Einzeltiers notwendig (MAHLKOW-NERGE et al. 2005). Nicht erkannte Brunsten oder falsch terminierte, künstliche Besamungen bedeuten somit große wirtschaftliche Einbußen (ROBBINS et al. 1978, BECKER et al. 2005, BORSBERRY 2011). Als Hauptproblem der Fruchtbarkeit in modernen Hochleistungsherden wird die Reduktion von Duldungsreflex und -dauer genannt, was die Brunsterkennung über die Verhaltensveränderung deutlich erschwert (WILTBANK et al. 2006, DOBSON et al. 2008). Ebenso ist die Intensität wie auch das Auftreten mehrerer Brunstsymptome in solchen Herden vermindert oder kaum noch vorhanden (VAN EERDENBURG et al. 1996, VAN VLIET und VAN EERDENBURG 1996, LYIMO et al. 2000, ROELOFS et al. 2005a, ROELOFS et al. 2005b). DOBSON et al. (2008) beschrieben eine Dezimierung der erfolgreichen Erstbesamungen von 70 % auf 40 % in den letzten 25 Jahren. Laut ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT (1985) liegt der Anteil falsch erkannter und besamter Brunsten zwischen 4,5-30 %. Die Brunsterkennungsrate liegt durchschnittlich bei 51,9 % und könnte aber in gut kontrollierten Herden bei deutlich über 70 % sein (ESSLEMONT 1992). Zusätzlich weisen hochleistende Milchkühe gehäuft abweichende Zykluslängen auf, was im Beobachtungsregime noch zu wenig Beachtung findet (SHELDON et al. 2006, WILTBANK et al. 2006). Die Konsequenz aus den genannten Faktoren ist eine Abnahme der Trächtigkeitsrate um bis zu ein Prozent pro Jahr (SHELDON et al. 2006).

Die Auswahl geeigneter Brunsterkennungsmethoden und die Interpretation der erhobenen Parameter ist die Grundvoraussetzung, um Kosten durch ungeeignete Methoden oder falsch positive Ergebnisse zu reduzieren (BORSBERRY 2011). Unter Anbetracht der vielfältigen Einflüsse, die das Brunstverhalten und somit dessen Registrierung beeinträchtigen können, sollten alle Möglichkeiten genutzt werden, um die Brunstkontrolle möglichst effizient zu gestalten (ROELOFS et al. 2010). Speziell das genaue Feststellen des Brunstbeginns und der darauf abgestimmte Besamungszeitpunkt sind entscheidend für eine gute Brunstnutzungsrate (DRANSFIELD et al. 1998). Aus diesem Grund ist eine kontinuierliche

Beobachtung über den gesamten Zyklus oder zumindest im brunstnahen Zeitraum sinnvoll (SENGER 1994). Empfohlen wird die Kombination von mehreren Verfahren, um die Detektion und die Brunstnutzungsrate mit dem Ziel der Verbesserung der Trächtigkeitsrate und Reduktion der fruchtbarkeitsbedingten Abgänge zu optimieren (LEHRER et al. 1992, SENGER 1994, DISKIN und SREENAN 2000, NEBEL et al. 2000, RORIE et al. 2002, ROELOFS et al. 2010, BORSBERRY 2011, HOLMAN et al. 2011, CHANVALLON et al. 2014). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der prozentualen Brunsterkennungsraten einzelner Methoden, welche im Abschnitt 2.3.3 näher erläutert werden (ZIEGER 2004, BECKER et al. 2005, HOLMAN et al. 2011).

Tabelle 2: Trefferquoten verschiedener Brunsterkennungsmethoden (modifiziert nach ZIEGER (2004) BECKER et al. (2005) und HOLMAN et al. (2011))

Brunsterkennungsmethode	Anteil richtig erkannter Brunsten
Visuelle Brunstbeobachtung	
Permanente visuelle Beobachtung	89 – 100 %
3x täglich für je 20 Minuten	74 – 85 %
2x täglich (früh/spät) für je 20 Minuten	60 – 80 %
Aktivitätsmessung	
Pedometer oder Respektoren	55 – 95 %
Videoanalyse	75 – 80 %
Farbmarkierungssysteme	
Kreide oder <i>Scratchpads</i>	70 %
KAMAR® - System	61 – 87 %
Drucksensoren	
HEAT WATCH® - System	90 – 98 %
DEC® - System	90 %
Impedanzmessung	
Vaginalschleimsonden	70 – 85 %
Milchleistung	
Milchmengenerfassung	33 %
Hormonbestimmung	
Progesteronmessung	99 %

2.3.3 Auswahl einzelner Methoden zur Brunstbeobachtung

2.3.3.1 Visuelle Brunstbeobachtung

Die traditionellste und am einfachsten durchzuführende Form der Brunstdetektion ist die visuelle Brunstbeobachtung. Sie gilt als globale Standardmethode in der Brunstüberwachung (HURNIK et al. 1975, O'CONNOR 1993, GRUNERT 1999b, DISKIN und SREENAN 2000, MAHLKOW-NERGE et al. 2005, HOEDEMAKER et al. 2007). Eine deutliche Tierkennzeichnung, gute Klauengesundheit und Bodenbeschaffenheit sowie geschultes Personal, welches die erhobenen Daten gewissenhaft aufzeichnet und auswertet, sind Grundvoraussetzung für die Effizienz dieser Methodik (O'CONNOR 1993, ROELOFS et al. 2005a, ROELOFS et al. 2010, WALKER et al. 2010). Als spezifischstes und genauestes primäres Brunstsymptom bei der visuellen Beobachtung gilt die Duldungsbereitschaft (VAN EERDENBURG et al. 1996, PALMER et al. 2010). Ein Tier, welches den Schwanz zur Seite neigt und sich bespringen lässt, also „steht“, befindet sich zu 90-95 % in Brunst (sogenannte „standing heat“) (HEUWIESER 1994). Liegt dieses Hauptsymptom der Brunst vor, kommt es kaum zu falsch positiven Brunstbeurteilungen (BORSBERRY 2011). Eine Duldungsphase dauert im Schnitt drei bis sieben Sekunden an und kann während der Hauptbrunst zwischen 20 bis 55 Mal erfolgen (O'CONNOR 1993). Da sich allerdings in den letzten 50 Jahren die Intensität, Länge und die Symptomatik der Brunst einschließlich der Ausprägung des Duldungsreflexes deutlich reduziert haben, müssen auch weitere Parameter, sogenannte sekundäre Brunstanzeichen in der visuellen Brunstbeobachtung Beachtung finden (O'CONNOR 1993, VAN EERDENBURG et al. 1996, DRANSFIELD et al. 1998, RORIE et al. 2002, DOBSON et al. 2008, ROELOFS et al. 2010, SAKAGUCHI 2011). Dazu zählen neben vermehrtem Umherlaufen und Unruhe, Kontaktsuche zu Artgenossen und Stallpersonal, Aufspringen auf andere Tiere, was besonders im Proöstrus zum Ausdruck kommt, mit dem Kopf streichen und Kinn auflegen, Lautäußerungen, Beschnüffeln des Schambereichs anderer Tiere sowie vestibuläre und labiale Schwellung und Rötung mit Brunstschleimabgang, welcher zum Teil an Schwanzunterseite und Hüfthöckern anhaftend sichtbar wird (KIDDY 1977, PENNINGTON et al. 1986, O'CONNOR 1993, CAVALIERI et al. 2003b, ROELOFS et al. 2005b). Auch die Bildung sogenannter sexuell aktiver Gruppen kann für die Beurteilung der Brunst genutzt werden. Je größer die Herde und je mehr Tiere sich in einem ähnlichen Zyklusstand befinden, umso höher ist die Chance der Ausbildung einer deutlich erkennbaren sexuell aktiven Gruppe, das heißt Tiere, die zeitgleich in Brunst sind und vermehrt Kontakt zueinander suchen (VAN VLIET und VAN EERDENBURG 1996, PALMER et al. 2010, ROELOFS et al. 2010). Auch die Brunstsymptomatik ist innerhalb einer sich gegenseitig durch Pheromone stimulierenden Tiergruppe wesentlich intensiver ausgeprägt und anhaltender (FABRE-NYS und

GELEZ 2007, SVEBERG et al. 2011, SVEBERG et al. 2013). So kann die Östrusdauer von ca. 7,5 h auf bis zu 10,1 h verlängert werden (HURNIK et al. 1975). Die Schrittzahl, die Aktivität sowie auch Aufspring- und Duldungsverhalten sind dabei die markantesten Merkmale, die innerhalb einer solchen Gruppierung potenziert werden (ROELOFS et al. 2005b). In Tabelle 3 sind die Auswirkungen der Erhöhung des Anteils von brünstigen Kühen auf das Aufspringverhalten innerhalb einer Herde dargestellt.

Tabelle 3: Auswirkungen der Anzahl gleichzeitig brünstiger Kühe auf das Aufspringverhalten (MAHLKOW-NERGE et al. 2005)

Anzahl brünstiger Kühe in einer Herde	Durchschnittliche Anzahl der Aufsprünge pro brünstiger Kuh
1	11,2
2	36,6
3	52,8
≥ 4	49,8

Das bedeutet konkret, dass durch die stärkere Östrusexpression auch die Chancen der Brunsterkennung durch visuelle Brunstbeobachtung steigen (ROELOFS et al. 2005a). Dies birgt allerdings auch die Gefahr, dass ebenso eine Erhöhung falsch positiver Ergebnisse bei nur flüchtiger oder sporadischer Beurteilung innerhalb einer sexuell aktiven Gruppierung stattfinden kann (FORSTER et al. 2007).

Der Erfolg der visuellen Brunstbeobachtung ist demnach maßgeblich von der Erfahrung des Beobachters, der Beobachtungsfrequenz und der Intensität der Brunst abhängig (HURNIK et al. 1975, DISKIN und SREENAN 2000, MAHLKOW-NERGE et al. 2005, WANGLER et al. 2005, ROELOFS et al. 2010). Die Angaben in der Literatur, welche Intervalle und welche Zeiten im Betrieb sinnvoll für die Durchführung dieses Brunsterkennungsverfahrens genutzt werden sollten, schwanken. Die wohl am häufigsten vertretene Empfehlung, welche sich in der Regel in jedem Betrieb mit einem zufriedenstellenden Brunsterkennungsergebnis gut umsetzen lässt, lautet zwei bis drei Mal täglich, für mindestens 20 bis 30 Minuten, wobei somit ≥ 70 % der Kühe korrekt als „in Brunst befindlich“ erkannt werden können (O'CONNOR 1993, HEUWIESER 1994, SENGER 1994, VAN EERDENBURG et al. 1996, VAN VLIET und VAN EERDENBURG 1996, HOEDEMAKER et al. 2007, DE KRUIF et al. 2007, PALMER et al. 2010). Höhere Frequenzen in der Brunstbeobachtung können die Erkennungsrate verbessern, wobei die vermeintlich gesteigerte Effizienz für den Mehraufwand häufig nicht gerechtfertigt ist (HEUWIESER 1994, VAN EERDENBURG et al. 1996). Die Beobachtungssequenzen sollten nicht in der Zeit um den Melkprozess bzw. zu Fütterungszeiten, sondern während der Ruhe- und Entspannungsphasen der Tiere stattfinden (PENNINGTON et al. 1986, VAN VLIET und VAN

EERDENBURG 1996, DISKIN und SREENAN 2000, DE KRUIF et al. 2007). Der korrekt gewählte Besamungszeitraum bewegt sich zwischen 4-18 Stunden nach Beginn der beobachteten Hauptbrunst, wobei sich 12 Stunden als optimal erwiesen haben (AUNGIER et al. 2012). Laut LYIMO et al. (2000) ist die visuelle Brunstbeobachtung eine sehr gute, einfache und effiziente Methode, um den richtigen Besamungszeitpunkt zu finden. Sinnvoll ist es, um einen Überblick über die Herde zu behalten, einen Brunstkalender (Chronolactor) zu führen. Moderne Herdenmanagementprogramme beinhalten Kalkulationsmöglichkeiten für verschiedene Fruchtbarkeitsparameter, die es ermöglichen, dass der Landwirt automatisch auf den brunstnahen Zeitraum eines jeden Einzeltiers bei entsprechender Datenpflege hingewiesen wird (O'CONNOR 1993, WANGLER et al. 2005).

Allerdings kann die visuelle Brunstbeobachtung als alleinige Methode zur Östrusdetektion bei reduzierter Brunstsymptomatik zu ineffizient sein (LYIMO et al. 2000). Erschwerend kommt hinzu, dass in Großbetrieben häufig aufgrund personellen Mangels und wachsenden Herdengrößen die gezielte visuelle Brunstbeobachtung nur unzureichend bzw. an falschen Zeitpunkten durchgeführt wird (FIRK et al. 2002). Deshalb wird oftmals eine Kombination mit anderen technisierten Verfahren empfohlen, um die Brunsterkennungsrate zu erhöhen (VAN VLIET und VAN EERDENBURG 1996, KERBRAT und DISENHAUS 2004, YÁÑIZ et al. 2006)

2.3.3.2 Aktivitätsmessung (Bewegungs- und Wiederkauverhalten)

Die neben der visuellen Brunstbeobachtung am häufigsten genutzte Methode zur Identifikation brünstiger Tiere ist deren Aktivitätsmessung. Wie in Abbildung 2 dargestellt, zeigen in Brunst befindliche Tiere neben Ruhelosigkeit und Duldungsbereitschaft eine deutlich erhöhte Bewegungsaktivität. Das heißt eine Steigerung zwischen 30-400 % der Grundaktivität im Vergleich zu nicht brünstigen Tieren ist möglich (KIDDY 1977, LEWIS und NEWMAN 1984, PENNINGTON et al. 1986, SCHOFIELD et al. 1991, ALLRICH 1993, KERBRAT und DISENHAUS 2004, ROELOFS et al. 2005b, WANGLER et al. 2005, BOSTEDT 2006).

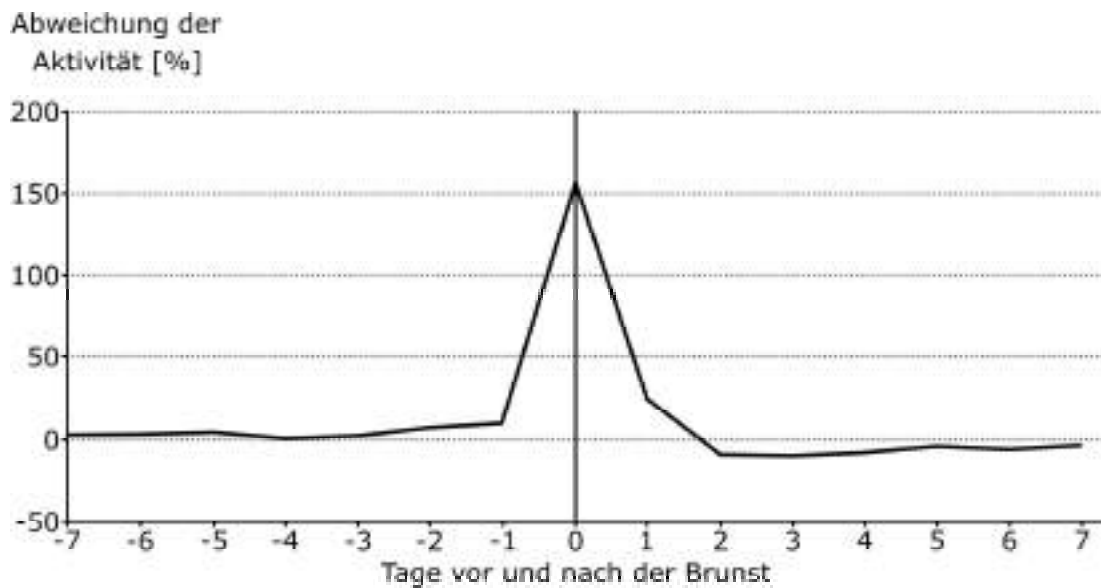


Abbildung 2: Darstellung der Aktivitätssteigerung zur Brunst (modifiziert nach WANGLER et al. (2005))

Diese subtile Steigerung beginnt in etwa vier Stunden vor dem deutlich sichtbaren Brunstbeginn (NEBEL et al. 2000). Im Allgemeinen gilt jedoch, dass die Aktivität von Rindern nachmittags höher ist als vormittags und somit nicht jede Aktivitätssteigerung in Zusammenhang mit einer präovulatorischen Zyklusphase stehen muss (NEBEL et al. 2000, AUNGIER et al. 2012). Ohne technische Hilfsmittel ist die Steigerung der Aktivität als Kennzeichen der Brunst kaum objektiv zu beurteilen bzw. kann der Brunstbeginn, wenn er in der Nacht liegt, auch übersehen werden (HURNIK et al. 1975, KIDDY 1977, MAATJE et al. 1997, LÓPEZ-GATIUS et al. 2005, WANGLER et al. 2005, ROELOFS et al. 2010). Eine permanente Aufzeichnung der Aktivität jedes Einzeltiers, unter Berücksichtigung störender Komponenten, die bei bis zu 55 % zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen können, wie Tiergruppenveränderung, Lahmheiten oder Behandlungen, ist sinnvoll und erleichtert die Interpretation der Daten (PENNINGTON et al. 1986, FIRK et al. 2002, BECKER et al. 2005, WANGLER et al. 2005, HOLMAN et al. 2011). Somit kann es unter Nutzung dieser Methodik zu einer Brunsterkennungsrate von 75 % bis 90 % kommen (NEBEL et al. 2000, FIRK et al. 2002, MAHLKOW-NERGE et al. 2005). Es gibt verschiedene Aktivitätsmesser, die sich in der Lokalisation der Anbringung der Sensoren und im Prinzip der Detektion der Bewegung unterscheiden.

Die wohl in dieser Kategorie bekannteste und am weitesten verbreitete Anwendung stellt die Pedometer Technik dar (KIDDY 1977, PETER und BOSU 1986, SENGER 1994, AT-TARAS und SPAHR 2001, ROELOFS et al. 2005b, LÖVENDAHL und CHAGUNDA 2010, MOTTRAM 2015). Das Pedometer wird am Fesselgelenk des Tieres angebracht und fungiert in der Regel als einfacher

Schrittzähler (MAHLKOW-NERGE et al. 2005, SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012). Dies stellt ein Problem in der Sensitivität und Anwendbarkeit der Technik bei lahmen Tieren dar (WALKER et al. 2010). Moderne Systeme können zusätzlich zu der kontinuierlichen Zählung der Schritte auch das Liege- sowie Stehverhalten der Tiere über 3D-Beschleunigungssensoren (Accelerometer) erfassen, und somit auch neben der Brunsterkennung zur Registrierung von Minderaktivität bzw. Lahmheit beitragen (SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012, KOKIN et al. 2014, SILPER et al. 2015). Auch am Halsband angebrachte Transponder, sogenannte Respaktoren oder Aktiometer, werden als Hilfsmittel zur Brunsterkennung eingesetzt (z. B. Heatime® der Firma Milkline) (MAHLKOW-NERGE et al. 2005, MICHAELIS et al. 2013).

Des Weiteren kommt es im Rahmen des Brunstgeschehens nachweislich zur Reduktion der Wiederkauaktivität. Insgesamt ist die Wiederkauzeit um bis zu 75 min am Tag der Brunst verringert, was sich durch kürzere Aufenthaltszeiten am Futtertisch und weniger Ruhephasen zum Wiederkauen erklären lässt (HURNIK et al. 1975, PAHL et al. 2015). Somit kann als Erweiterung des genutzten Systems über die Anbringung von Dehnungs- und Drucksensoren bzw. von Mikrofonen am Halsband, die die Regurgitationsgeräusche erfassen, auch das Wiederkauverhalten ergänzend gemessen und zur Brunsterkennung mit genutzt werden (SCHIRMANN et al. 2009, REITH und HOY 2012, PAHL et al. 2015).

Um die Aktivität registrieren zu können, wird in einfacheren Systemen die elektrische Spannung ermittelt, welche via Induktion, beispielsweise vermittelt durch einen Quecksilberschalter oder eine magnetische Kugel, die sich zwischen Kupferspulen bewegt, entsteht (WANGLER et al. 2005). Abhängig vom Hersteller und vom genutzten technischen System werden die aufgezeichneten Aktivitäten entweder in einer bestimmten Frequenz an eine Station bzw. ein Empfangsgerät geschickt (z.B. 5 min Intervalle), oder die Sensoren werden beim Vorbeigehen an Geräten, die an bestimmten Standorten im Stall, wie im Bereich der Melkanlage, Tränkeeinrichtungen oder am Kraftfutterautomaten angebracht sind, passiv ausgelesen. Bei einigen Systemen ist auch ein manuelles Ablesen der Werte mittels eines transportablen Lesegerätes am Einzeltier möglich (WANGLER et al. 2005, SCHIRMANN et al. 2009). Danach erfolgt die Datenverarbeitung in der Regel mittels einer speziellen von der Herstellerfirma bereitgestellten Software am Computer. Die ermittelten Werte werden mit tierindividuellen Referenzbereichen oder mit dem Herdendurchschnitt verglichen und bei Überschreitung eines eingestellten Grenzwertes als „brünstig“ angezeigt (SENGER 1994, WANGLER et al. 2005, SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch Tiere mit einer kurzen Brunst damit detektiert werden können (LYIMO et al. 2000). Die Schwierigkeit, solche Bewegungsmesssysteme effizient zu gestalten, ist die korrekte Einstellung und Festlegung der Grenzwerte, ab welcher Aktivitätssteigerung ein Tier als „in Brunst befindlich“

angezeigt wird (SAUMANDE 1981, LØVENDAHL und CHAGUNDA 2010, CHANVALLON et al. 2014). Bei zu sensibler Einstellung kann es zur Anzeige falsch positiver Tiere kommen und damit zu einer hohen Fehlerrate, was aufgrund eines erhöhten Kontrollaufwandes dieser Tiere zu unnötigen Kosten führt. Im Falle eines zu hoch gewählten Grenzwertes ist zwar die Chance, dass die dann als „brünstig“ erkannten Tiere tatsächlich in Brunst sind, sehr hoch, aber Tiere, deren Aktivitätssteigerung nicht deutlich ausgeprägt ist, bleiben unerkannt und werden nicht besamt (WANGLER et al. 2005). Die Mitteilung „Brunst“ erfolgt, abhängig vom Hersteller und dem genutzten System z. B. rot blinkend auf einem Anzeigemonitor oder per Nachricht auf das Mobiltelefon des Landwirts (RORIE et al. 2002, SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012, CHANVALLON et al. 2014).

Ungefähr 30 h nach Beginn der Aktivitätserhöhung findet die Ovulation statt, das heißt 17-19 Stunden nach dem Aktivitätsmaximum (ROELOFS et al. 2005b). In einer Studie von MAATJE et al. (1997) wurde an 171 Kühen getestet, nach welchem Grad an Steigerung der Bewegungsaktivität man den optimalen Besamungszeitpunkt festlegen kann. Als Referenzmethode zur Ermittlung der Brunst wurde die rektale Untersuchung angewendet (siehe Abschnitt 2.3.3.6). Als Brunstbeginn ist mindestens eine Verdopplung der Bewegungsaktivität innerhalb der letzten 12 Stunden, im Vergleich zu den beiden Vortagen definiert. Somit liegt der optimale Besamungszeitpunkt 6-17 Stunden nach der so ermittelten Brunstdetektion (MAATJE et al. 1997). Bei ca. 5 % der Tiere findet eine Ovulation unter 80 % Aktivitätssteigerung im Vergleich zu den Mittelwerten der letzten zwei Tage statt. Dann spricht man von einer stillen Brunst (Sub- oder Anöstrus), die abhängig von den Einstellungen der Grenzwerte zum Teil nur schwer registriert werden kann (WANGLER et al. 2005, RANASINGHE et al. 2010). Treten Unregelmäßigkeiten bei Einzeltieren auf, wie zum Beispiel in sehr kurzen Abständen wiederkehrend erhöhte Aktivitäten, können diese ein Hinweis auf hormonelle Störungen durch ovarielle Abnormitäten, wie Ovarzysten, sein. Solche Veränderungen können über Aktivitätsmessgeräte registriert werden und bei korrekter Auswertung der Daten werden diese Tiere entsprechend einer tierärztlichen Untersuchung zugeführt (WANGLER et al. 2005).

Als neuere Technik auf dem Gebiet der Aktivitätsmessung stehen Ohrclips, mit Videokameras gestützte Brunstbeobachtung (*cow tracking*) oder intraruminale Systeme, wie z.B. smaXtec animal care®-Sensoren zur Verfügung. Neben der Bewegungsregistrierung werden beispielsweise auch die Temperatur an verschiedenen Körperstellen oder Lautäußerungen in die Messungen integriert (O'CONNOR 1993, DOLECHECK et al. 2015, TALUKDER et al. 2015). Wie bei modernen Pedometern werden ebenso bei den Ohrclipsensoren mittels 3D-Beschleunigungsmesstechnik die Bewegungen und das Ohrenspiel registriert und an eine Station entsprechend übermittelt. Dieses System konnte sich gegenüber anderen Verfahren bisher noch nicht etablieren. Es bedarf weiterer Entwicklung und Verbesserung (SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012, BIKKER et al. 2014).

2.3.3.3 Farbmarkierung und Drucksensoren

Eines der bereits genannten Hauptbrunstsymptome gegen Ende des Östrus ist die Reduktion der Aktivität und die Bereitschaft zur Duldung des Aufspringens durch andere Artgenossen (NEBEL et al. 2000, BOSTEDT 2006). Dieses Verhalten kann genutzt werden, um über Farbmarkierungssysteme und Drucksensoren die Brunstdektektion effizienter zu gestalten (ROELOFS et al. 2010). Farbmarkierungen oder sogenannte Tailpaints aus Kreide oder mit speziellen Stiften werden im Bereich der Schwanzwurzel angebracht. Durch das Aufreiten anderer Tiere kommt es zur Abnutzung der Farbe. Laut PALMER et al. (2010) wird die Hauptbrunst bei >75 % Farbabnutzung definiert. Falsch positive Ergebnisse können durch im Stall angebrachte Bürsten, intensiven Tierkontakt bei hoher Gruppendichte oder Witterungseinflüsse bei der Weidehaltung hervorgerufen werden (O'CONNOR 1993). In Abhängigkeit von der Erfahrung der Landwirte kann diese einfache und kostengünstige Methode eine gute Ergänzung der visuellen Brunstbeobachtung, vor allem bei Weidehaltung, darstellen (MACMILLIAN et al. 1988, RORIE et al. 2002, PALMER et al. 2010). Eine Abwandlung der einfachen Farbmarkierungen stellt ein sogenanntes selbstklebendes *Scratchpad* (z.B. ESTROTECT® HEAT DETECTORS, DairyMac, Wickham Hampshire, England) dar. Es besteht aus einer leuchtenden Farbschicht, die mit einem silbergrauen Film überdeckt ist, und wird ebenfalls im Schwanzwurzelbereich des Tieres angebracht. Bei Reibung durch Aufreiten von Artgenossen kommt es nun, ähnlich wie bei einem Rubbellos, zum Abrieb des Films und Freilegen der für den Landwirt deutlich sichtbar farbigen Fläche. Der negative Einfluss durch Witterung auf die Aussagefähigkeit kann bei dieser Art der Anwendung reduziert werden (CAVALIERI et al. 2003b). Ein weiteres Hilfsmittel zur Brunstbeobachtung, welches mit einer Farbmarkierung arbeitet, ist das KAMAR®-System (KAMAR® Heatmount Detectors, Colorado, USA). Die enthaltene Farbkapsel, welche mit einem speziellen Hüllgewebe ummantelt ist, wird über einen Spezialkleber zwischen den Sitzbeinhöckern auf dem Kreuzbein des Tieres fixiert. Nach mehrmaligem Bespringen bzw. ab einer gewissen Druckeinwirkung zerplatzt die Farbpatrone und der Detektor verfärbt sich rot. Je länger das Zerplatzen und damit die Duldung her ist, umso intensiver und dunkler wird der Detektor gefärbt (CAVALIERI et al. 2003b, BECKER et al. 2005).

Neben den genannten Farbmarkierungssystemen werden zur Registrierung des Duldungsreflexes auch Drucksensoren, die ebenfalls oberflächlich oder auch subkutan am Tier angebracht werden können, angewendet (SENGER 1994). Das französische DEC®-System (Détection électronique de chevauchement, IVM, Frankreich), welches im Sakralbereich des Tieres fixiert wird, beinhaltet die Sensor- und Anzeigeeinheit in einem. Mit steigender Druckeinwirkung kommt es zur Erhöhung der Frequenz des Blinksignals vom Detektor, welches direkt am Tier abgelesen werden kann. Die Sensoren

sind mehrfach verwendbar (bis zu 30 Zyklen) und aufgrund des direkten Ablesens an der brünstigen Kuh ist kein zusätzlicher apparativer Aufwand notwendig (BECKER et al. 2005). Ein Pendant zum französischen Drucksensor stellt das HEAT WATCH®-System aus den USA dar. Das wasserdichte drucksensible Pad wird ebenfalls mittels speziellem Kleber im Sakralbereich angebracht. Die durch das Aufspringen von Artgenossen ausgelösten Impulse werden über eine Antenne per Radiowellen an eine zentrale Auswertereinheit geleitet (PERALTA et al. 2005, SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012). PALMER et al. (2010) definierten die Hauptbrunst mit diesem System, wenn über drei Mal eine länger als eine Sekunde lang andauernde Duldung in einem Zeitraum von 4 Stunden stattfindet. Zwischen 4 und 12 Stunden nach Beginn der Brunst kann dann die Besamung erfolgen (DRANSFIELD et al. 1998). Vorteil dieses Systems ist, dass die Daten, wie Datum, Dauer und Zeitpunkt der Druckeinwirkung, tierbezogen registriert werden und somit ohne Informationsverlust gut nachvollziehbar sind (NEBEL et al. 2000). Auch die Möglichkeit zur Echtzeitübertragung und die direkte Bearbeitungs- und Interpretationshilfe mittels Software machen dieses System anwenderfreundlich (RORIE et al. 2002). Als Nachteile dieser Methodik sind die in Deutschland nicht zugelassenen Radiowellen, die das System zur Versendung der Daten nutzt (PERALTA et al. 2005), und die verminderte Eignung bei Hochleistungsrindern, welche aufgrund reduzierter Brunstdauer und -intensität bei bis zu 24 % der Tiere zu Fehlinterpretationen und falsch terminierten Besamungen unter Nutzung von HEAT WATCH® führen kann (DRANSFIELD et al. 1998), zu nennen. Fehlerhaft positionierte oder verrutschte Pads sowie eine ausschließlich zwei- oder dreimalige Auslesung der Daten pro Tag können ebenfalls die Brunsterkennungsrate unter Anwendung solcher Systeme reduzieren (NEBEL et al. 2000, RORIE et al. 2002, PALMER et al. 2010).

2.3.3.4 Elektrische Leitfähigkeit im Vaginalsechleim

Eine weitere Methode, um die Brunsterkennung zu optimieren, stellt die Messung von elektrochemischen Veränderungen im Genitaltrakt dar. Die elektrische Leitfähigkeit des Vaginalsekretes, bzw. deren Kehrwert, der elektrische Widerstand (CMR – *Cervical Mucus Resistance*), variiert im Rahmen des Zyklusgeschehens (LEIDL und STOLLA 1976). Ovarsterioide führen während der Brunst zur Ödematisierung und Durchsaftung der Vaginalsechleimhaut sowie zur Veränderung der chemischen und zellulären Zusammensetzung der Sekrete aus dem Reproduktionstrakt. Folglich kommt es zu einer zyklusabhängigen Schwankung der elektrischen Leitfähigkeit und dem Widerstand im Vaginal- bzw. Zervikalsechleim (FELDMANN et al. 1978, SAUMANDE 1981, EZOV et al. 1990, SENGGER 1994). Während der Follikelphase ist die CMR unter Östrogeneinfluss niedrig und der geringste Widerstand ist mit dem LH-*Peak*, welcher die Ovulation einleitet, vergesellschaftet (LEIDL und STOLLA 1976). Ungefähr 25 h vor der Ovulation reduziert sich

der Widerstand um über 20 Ohm und ist mit etwa einem Drittel des Ausgangswertes während dieser Phase am Tiefpunkt angelangt (SAUMANDE 1981, RAJAMAHENDRAN et al. 1989, FIRK et al. 2002). Postovulatorisch nimmt der Widerstand während der Anbildung und Anwesenheit eines Gelbkörpers unter Progesterondominanz wieder zu (LEIDL und STOLLA 1976). Diese Veränderungen können mithilfe von Vaginalsonden in mobiler oder implantierter Form registriert und zur Brunsterkennung genutzt werden (FELDMANN et al. 1978). Die Messung sollte mindestens in 2 h-Intervallen stattfinden, da die Methodik sonst als unzuverlässig beschrieben wird (GARTLAND et al. 1976). Die Anwendung dieser Technik zur Bestimmung des Besamungszeitpunktes kann zu effektiven Konzeptionsraten von 52-88 % führen, wobei die Angaben stark variieren (LEHRER et al. 1992, BECKER et al. 2005). Probleme und Störungsmöglichkeiten in der Durchführung und Interpretation sind mannigfaltig. So eignen sich mobile Geräte im Vergleich zu implantierten Vaginalsonden kaum für die flächenhafte Brunsterkennung in größeren Milchviehanlagen, aufgrund eines hohen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwandes (FIRK et al. 2002, BECKER et al. 2005). Des Weiteren muss strengstens auf die Einhaltung von hygienischen Maßnahmen bei der Applikation der Sonde in die Vagina geachtet werden (SAUMANDE 1981, O'CONNOR 1993). Auch tierindividuelle Schwankungen, Harnabsatz, Entzündungen des Urogenitaltraktes oder Ovarialzysten können zur Beeinflussung des elektrischen Widerstandes führen (FELDMANN et al. 1978, SAUMANDE 1981, SENGGER 1994, FIRK et al. 2002). Abschließend kann gesagt werden, dass die Widerstands- bzw. Leitfähigkeitsbestimmung eine wenig praktikable Methode zur Östrusdetektion im größeren Maßstab darstellt. Individuelle Messungen hingegen können im Einzelfall zur Bestätigung bei unklaren Östrusanzeichen ergänzend hinzugezogen werden (RORIE et al. 2002).

2.3.3.5 Milchleistung

Auch die Milchleistung kann unter Umständen als indirekte Brunsterkennungsmethode genutzt werden. Die Milchmengenerfassung erfolgt über moderne Melksysteme in der Regel standardmäßig. Ergänzend dazu können in speziellen Anlagensystemen auch Inhaltsstoff- oder Enzymmessungen direkt während des Melkvorgangs durchgeführt werden (ASMUSSEN 2010). Diese Daten stehen dem Landwirt täglich zur Verfügung und können einen Hinweis auf Störungen in der Fütterung oder gesundheitliche Probleme geben. KING (1977) fand heraus, dass die absolute Milchmenge als solche im brunstnahen Zeitraum auch zur Östrusdetektion genutzt werden kann. Im Rahmen einer Brunst kommt es zu einem Milchleistungsabfall von 2-6 %, was mit erhöhter Aktivität und reduzierter Futteraufnahme in Verbindung gebracht werden kann (KING 1977). SCHOFIELD et al. (1991) hingegen vermuten als Ursache für die Verringerung der Milchmenge eine Reduktion der Milchejektion und nicht der Milchproduktion, was über eine verminderte Milchflussrate am Tag der Brunst beim Melken

nachgewiesen werden konnte. Der über die Mengenerfassung feststellbare Milchrückgang tritt allerdings nur bei 20 bis ca. 33 % der Kühe tatsächlich zum Vorschein und ist deutlicher bei hochleistenden und älteren Kühen ausgeprägt (SAUMANDE 1981, SCHOFIELD et al. 1991, WANGLER et al. 2005). Andere Studien fanden hingegen keinen erkennbaren Milchleistungsabfall im brunstnahen Zeitraum (HOLMAN et al. 2011, PAHL et al. 2015). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Milchmengeninterpretation mit dem gegebenenfalls zur Brunst stattfindenden Leistungsabfall als alleiniges Hilfsmittel nicht zur Brunsterkennung geeignet ist, höchstens zu anderen Methoden hinzugezogen werden kann (LEWIS und NEWMAN 1984).

2.3.3.6 Brunstdiagnose durch den Tierarzt

Die tierärztliche rektale manuelle und/oder auch ultrasonographisch durchgeführte Untersuchung des Uterus und der Ovarien ermöglicht eine gute Beurteilung des reproduktiven Status eines Rindes (LÓPEZ-GATIUS und CAMÓÓN-URGEL 1991, ROELOFS et al. 2004, HANSAR et al. 2014). So können in Abhängigkeit vom Hormon- und Zyklusstand Gelbkörper oder Follikel an den Eierstöcken palpiert bzw. die Kontraktilität der Uteruswandung bestimmt werden (PIERSON und GINTHER 1987). Ergänzend zur Beurteilung des Zyklusstandes kann eine vaginoskopische Untersuchung hinzugezogen werden (LÓPEZ-GATIUS und CAMÓÓN-URGEL 1991). Wie bereits im Kapitel 2.1 beschrieben, kann im Rahmen der Brunst palpatorisch in der Regel ein unter 10 mm in Rückbildung befindlicher Gelbkörper und ein Graafscher Follikel zwischen 12-25 mm auf den Eierstöcken festgestellt werden (GÜMEN et al. 2003). Letzterer produziert Östrogene, was zu einer gesteigerten Kontraktionsbereitschaft der Gebärmutter, klarer, fadenziehender Brunstschleimproduktion und Öffnung bzw. Passierbarkeit der Zervix führt (LÓPEZ-GATIUS und CAMÓÓN-URGEL 1991, BONAFOS et al. 1995, LÓPEZ-GATIUS et al. 1997, GRUNERT 1999a). Regelmäßige und konsequente rektale Untersuchungen und Befunderfassungen mit entsprechenden therapeutischen Konsequenzen bzw. termingerechten Besamungen können zur Verbesserung der Fruchtbarkeitskennzahlen führen (PHATAK und WHITMORE 1991). Somit ist in geeigneten Untersuchungsintervallen, welche abhängig vom Zyklusstand zum Vorstellungszeitpunkt des Tieres angepasst werden müssen, eine korrekte Diagnose der Brunst bzw. des Ovulationszeitraumes möglich (RAJAMAHENDRAN et al. 1989). Die Genauigkeit der erhobenen Palpationsbefunde hängt allerdings von der Erfahrung des Untersuchers ab (BICALHO et al. 2008). So liegt nach BICALHO et al. (2008) die Sensitivität bei 68 % und die Spezifität bei 93 %, dass erfahrene Tierärzte ein funktionelles Corpus luteum ertasten konnten. Gerade bei der Überwachung von Problemtieren in einer engmaschigen Untersuchungsfrequenz hat sich die transrektale Ultraschalluntersuchung begleitend zur manuellen Befundung bewährt (RAJAMAHENDRAN und TAYLOR 1990, HANSAR et al. 2014). Wiederholte

rektale ultrasonographische Untersuchungen stellen dabei keinen negativen Einfluss auf das Brunstgeschehen dar (ROELOFS et al. 2004). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es empfehlenswert ist, vor einer anstehenden Besamung eine rektale Kontrolluntersuchung mit der Beurteilung von Uterus und Ovarien und kritisches Hinterfragen der korrekten Brunstdiagnose durchzuführen (ROELOFS et al. 2010). Allerdings kann die tierärztliche Brunstdiagnose im Rahmen einer vollständigen gynäkologischen Befunderhebung nur bei Einzeltieren in einer Herde, bei denen herkömmliche Methoden kein eindeutiges Ergebnis liefern, durchgeführt werden.

2.3.3.7 Progesteronmessung

Ein in der buiatrischen Gynäkologie mittlerweile sehr wichtiges Hilfsmittel zur Zyklusstandbestimmung ist die Progesteronmessung geworden. Bereits in den 1980er-Jahren wurden Vergleiche zwischen der Brunsterkennungsrate durch visuelle Brunstbeobachtung und Progesteronanalytik durchgeführt (CLAUS et al. 1983). CLAUS et al. (1983) fanden in ihrer Studie heraus, dass bis zu 32 % der Brunsten, die über Progesteronmessungen nachgewiesen werden konnten, in der üblichen Brunsterkennung nicht eindeutig oder überhaupt nicht als solche identifiziert worden sind. Als Untersuchungsmedium für die Analytik eignet sich sowohl Blut (SAUMANDE 1981) als auch Milch (SVEBERG et al. 2013). Bedingt durch die pulsatile GnRH-Ausschüttung unterliegt P4 im Blut wesentlich deutlicher tageszeitlichen Schwankungen als in der Milch. Da der Milchentzug nur zwei bis drei Mal täglich von im Euter „gesamelter“ Milch erfolgt, werden die tageszeitlichen P4-Schwankungen somit ausgeglichen (HOEDEMAKER et al. 1984). Des Weiteren werden feine Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit von der Blutentnahmestelle und auf welchem Ovar der mehr oder weniger produktive Gelbkörper vorliegt, vermutet (MORRIS und DISKIN 2008). Der Progesteronnachweis im Blut spielt heutzutage aus Praktikabilitätsgründen nur noch eine untergeordnete Rolle. Die Überwachung des Progesteronspiegels über die Milch hingegen liefert für die Probenentnahme eine Alternative (ARNSTADT 2006).

Progesteron besitzt lipophile Eigenschaften und reichert sich in der MilCHFettfraktion an (siehe 2.2.1). Somit ist eine positive Korrelation zwischen P4 und dem in der Milch enthaltenen Fett feststellbar (HOFFMANN und HAMBURGER 1973, GINTHER et al. 1976, HOEDEMAKER et al. 1984). Der messbare Progesterongehalt ist in Milch daher signifikant höher als im Blut ($p < 0,005$) (GINTHER et al. 1976). Jedoch gilt es, den variierenden Fettgehalt (im Vorgemelk ist weniger Fett als im Endgemelk und im Morgengemelk mehr als im Abendgemelk (siehe 2.2.2)) der Milchproben bei der Interpretation der gemessenen Hormonkonzentration zu beachten (HOFFMANN und HAMBURGER 1973, GINTHER et al. 1976, SAUMANDE 1981, COMIN et al. 2005, SHRIVASTAV et al. 2010). Um die Ergebnisse von Analysen miteinander vergleichbar zu machen, wird empfohlen, entweder immer eine bestimmte

Fraktion zu nutzen, z. B. die Magermilchfraktion, um unabhängig von Fettschwankungen zu sein, oder eine Standardisierung beim Entnahmezeitpunkt der Milchproben vorzunehmen. Beispielsweise werden ausschließlich Endgemelk bzw. Milchproben, die bis spätestens zwei Stunden nach dem Melken entnommen werden, für die Progesteronanalyse verwendet (HOEDEMAKER et al. 1984, BYSZEWSKA-SZPOCIŃSKA und MARKIEWICZ 2006). Laut HOEDEMAKER et al. (1984) erübrigt sich dadurch der wesentlich höhere Aufwand für die Extraktion und P4-Bestimmung aus Milchfett oder Magermilch.

Hohe gemessene Progesteronwerte repräsentieren den Diöstrus oder die Gravidität und schließen eine Brunst sicher aus (GINTHER et al. 1976, NEBEL et al. 1987). Dahingegen geben niedrige Konzentrationen nicht direkt einen Hinweis auf eine stattfindende Brunst, nur auf die Abwesenheit eines produktiven Gelbkörpers (GINTHER et al. 1976). Führt man Verlaufsuntersuchungen durch bzw. liegt ein gynäkologisch gesundes Tier vor, kommt es physiologisch zu einem relativ steilen Abfall auf <3 ng/ml Milch Progesteron rund um die Brunst bzw. an dem Tag der Ovulation, wodurch sich dieser sehr gut bestimmen lässt (AUNGIER et al. 2012). Steigt in den Folgetagen der P4 wieder ≥ 10 ng/ml Milch an, kann von einer stattgefundenen Ovulation ausgegangen werden (PLOTKA et al. 1967, VAN EERDENBURG et al. 1996). Zahlreiche Autoren nutzten in ihren Studien den Progesteronnachweis für die genaue Östrus-Detektion als Referenzmethode, um andere Brunsterkennungsverfahren zu überprüfen und zu evaluieren (VAN EERDENBURG et al. 1996, CAVALIERI et al. 2003b, FRIGGENS et al. 2008, LÖVENDAHL und CHAGUNDA 2010, PALMER et al. 2010, HOLMAN et al. 2011, SVEBERG et al. 2013, CHANVALLON et al. 2014, DOLECHECK et al. 2015). Neben der Zyklusstand- bzw. Brunstdiagnostik kann die Progesteronanalyse auch unterstützend zur Ursachenforschung bei Ovarabnormitäten und ergänzend zur Trächtigkeitsuntersuchung genutzt werden (LAMMING und BULMAN 1976, MORTON und WYNN 2010). Ab dem 19. Tag nach einer Belegung lässt sich über die Untersuchung von P4 eine Tendenz erkennen, ob die Tiere potentiell tragend sind oder sich erneut in Brunst befinden. Eine niedrige Hormonkonzentration schließt dabei eine Trächtigkeit eindeutig aus und kann auch bei einer sogenannten stillen Brunst, das heißt ohne Brunstsymptomatik, für eine Nachbesamung genutzt werden (ARNSTADT 2006, SHAMSUDDIN et al. 2006). Entspricht der Progesteronwert nicht der Brunst, aber die Tiere sind dennoch nicht trächtig, so können Gründe wie eine verlängerte Lutealphase oder frühembryonaler Fruchttod ursächlich dafür sein (RAJAMAHENDRAN et al. 1993). Wendet man den Milchprogesterontest nach der Kalbung frühzeitig und regelmäßig an, kann der postpartale Wiedereintritt in den Zyklus registriert werden und die Erstbesamung kann nach Ablauf der Wartezeit gezielt erfolgen (RUIZ et al. 1992).

Als **Nachweismethoden für Progesteron** finden vor allem immunologische Verfahren Anwendung. Dabei wird zwischen einem Radioimmunoassay (RIA) und einem enzymgekoppeltem Immunoassay

(EIA oder ELISA) unterschieden. Der RIA ist eine quantitative Methode, um eine Antigen(Ag)-Antikörper(Ak)-Reaktion mittels radioaktiv markiertem Progesteron nachzuweisen (FRIEMEL 1991). Um die in der Milchprobe zu untersuchende unbekannte Menge an natürlichem Progesteron (P4) zu ermitteln, werden eine definierte Menge an spezifischem Antikörper (Ak) und radioaktiv gekoppeltem Progesteron (P4*), in der Regel findet das Isotop ^{125}I Anwendung, hinzugefügt (RAJAMAHENDRAN et al. 1993). Es entsteht nun eine Konkurrenzsituation zwischen markiertem und natürlichem Progesteron um die Bindung am Antikörper. Da die Bindungskapazität des Antikörpers begrenzt ist, entsteht nach Ablauf von Teilreaktionen ein kompetitiv wirkendes Gleichgewicht, welches in Abbildung 3 dargestellt ist (OTTO 2006, SQUIRES 2010).



Abbildung 3: Kompetitives Gleichgewicht im Immunoassay (modifiziert nach SQUIRES (2010));
P4: Progesteron, P4*: radioaktiv markiertes Progesteron, Ak: Antikörper

Wie in Abbildung 3 erkennbar, ist der Anteil des P4*-Ak-Komplexes umso höher, je niedriger die Konzentration des natürlichen Progesterons aus der Milchprobe ist. Nach Abtrennung der Reaktionsprodukte kann der Anteil des radioaktiven Komplexes mittels eines Gammazählers ermittelt werden (RAJAMAHENDRAN et al. 1993, SQUIRES 2010). Die Ermittlung des absoluten Progesterongehaltes der Probe erfolgt dann über den Vergleich mit einer Standard- bzw. Kalibrationskurve, die im Voraus über eine Verdünnungsreihe mit dem verwendeten Antikörper und dem markiertem Progesteron ermittelt wird (OTTO 2006). Die Vorteile vom Radioimmunoassay sind eine einfache Durchführung, ein sehr empfindliches und sensibles Testverfahren, welches sogar Progesteronwerte unter 2,5 pg/ml nachweisen kann (SAUMANDE 1981, COMIN et al. 2005). Als deutlicher Nachteil der Methode ist der Umgang mit radioaktiven Nachweisreagenzien und die dadurch verbundene potentielle Gesundheitsstörung sowie die Laborgebundenheit des Tests mit einzuhaltenden hohen Sicherheitsauflagen aufzuführen (MEYER 1989, COMIN et al. 2005).

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Nachweisverfahren zu Progesteron immer weiter entwickelt. Somit entstanden Enzymimmunoassays, welche nicht mehr mit radioaktiven Markierungsverfahren und laborgebundener Technik, sondern als sogenannte *on-farm*-Tests arbeiten (ARNSTADT und CLEERE 1981, NEBEL 1988, RIOUX 2004). Anstelle des radioaktiven Progesterons wird beim EIA P4 an ein Enzym meist Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase gekoppelt (MEYER 1989). Nach Zugabe der zu analysierenden Probe und der spezifischen Antikörper entsteht ein ähnliches Reduktionsgleichgewicht wie in Abbildung 3 dargestellt. Die Antikörper sind dabei in der Regel an eine Matrix gebunden, welche z. B. an der Oberfläche eines Reagenzröhrchens oder auf einer

Mikrotitrierplatte angebracht wird (RIOUX 2004). Je weniger P4 in der Milchprobe enthalten ist, umso mehr bindet markiertes Progesteron an die Antikörper. Nach einem Waschschrift, bei dem überschüssige Probenlösung und Substrate entfernt werden, wird ein Nachweisreagenz zugesetzt. Dieses wird dann von dem gekoppelten Enzym katalytisch umgesetzt, und es entsteht eine gefärbte Lösung welche photometrisch ausgewertet werden kann (MEYER 1989, OTTO 2006). Somit kann die Farbänderung, welche umso intensiver ist, je weniger Progesteron in der Ausgangsprobe enthalten war, genau quantifiziert werden, und eine Ermittlung des in der Probe enthaltenen Progesterons ist über Ablesen an einer Kalibrierungskurve oder einer digitalen Anzeige am Photometer möglich (siehe auch 3.2.2.2) (RIOUX 2004, SQUIRES 2010, MOTTRAM 2015). Der EIA ist somit eine kostengünstige adäquate Alternative zum RIA und arbeitet so präzise, dass eine Brunst genauso zuverlässig erkannt werden kann (ARNSTADT und CLEERE 1981, NEBEL et al. 1987, COLAZO et al. 2008). Die Übereinstimmung in der Brunsterkennungsrate zwischen beiden Testverfahren lag laut einer Studie von NEBEL et al. (1987) bei bis zu 89,9 %. Dabei ist es allerdings abhängig davon, welche *on-farm*-Tests Anwendung finden, bzw. ob ausschließlich eine visuelle oder eine photometrische Beurteilung durchgeführt wird (NEBEL et al. 1989, SOBIRAJ et al. 1989, SOBIRAJ et al. 1995, WALDMANN und RAUD 2016). Der Vorteil dieser Methodik ist, dass ohne aufwendige Probenaufbereitung, wie z. B. der MilCHFettextraktion, und in der Regel auch mit kürzeren Inkubationszeiten eine Analyse der Probe möglich ist (HOEDEMAKER et al. 1984, ARNSTADT 2006). Eine Vereinfachung der Methodik bzw. eine Verkürzung der Testdauer ist mittels Verzicht auf die photometrische Bestimmung durch die Anwendung optischer „Schnelltests“ möglich. Dabei werden die Intensität des Farbumschlags und damit der in der Probe enthaltene Progesteronwert lediglich visuell anhand einer mitgelieferten Farbtabelle bewertet und interpretiert. Der EIA kann neben der Anwendung beim Milchrind auch bei laktierenden Wasserbüffelkühen zur Verbesserung der Brunstüberwachung angewendet werden (BANU et al. 2012). Als neueste Technik auf diesem Gebiet gilt der Einsatz von Biosensoren bzw. der automatischen *in-line* Messtechnik (Herd Navigator, Lattec I/S, Hillerød, Dänemark), bei der in Kombination mit einem automatischen Melksystem (AMS, z. B. von der Firma DeLaval) via Immunoassay während des Melkvorgangs neben Stoffwechselfparametern wie MilChharnstoff, β -Hydroxybutyrat und Laktatdehydrogenase auch Progesteron gemessen werden kann (CLAYCOMB und DELWICHE 1998, DELWICHE et al. 2001, RORIE et al. 2002, FRIGGENS et al. 2008, ASMUSSEN 2010, MOTTRAM 2015). Durch regelmäßige P4-Ermittlung kann somit von jedem Tier ein Verlaufsprofil erstellt werden, welches daraufhin nach einem Algorithmus in drei Stadien eingeteilt wird: „postpartaler Anöstrus“, „zyklierend“ oder „potentiell tragend“ (FRIGGENS und CHAGUNDA 2005, SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012). Bei einem MilChprogesteronwert $\leq 4\text{ng/ml}$ wird ein Alarm auf der Anzeigetafel sichtbar, welcher den Landwirt darauf hinweist, dass sich das Tier voraussichtlich in

Brunst befindet. Bei stillbrünstigen Tieren sowie bei Tieren mit vermuteten Ovarabnormitäten oder bei Verdacht auf embryonalen „Fruchttod“ kann somit potentiell schneller reagiert werden als mit anderen Systemen der Brunstüberwachung (SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012). Seit 2010 ist diese in Dänemark etablierte Methode auch auf dem deutschen Markt verfügbar (ASMUSSEN 2010). Vorteil ist die sehr hohe durchschnittliche Brunsterkennungsrate von rund 95 %. Allerdings ist dieses Verfahren noch sehr kostenintensiv sowie bislang nur in Betrieben mit einem AMS installierbar und somit nicht für jeden Betrieb geeignet (ØSTERGAARD et al. 2005, FRIGGENS et al. 2008, ASMUSSEN 2010, MOTTRAM 2015).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

3.1.1 Versuchsbetrieb

Der Versuchsbetrieb Agrargenossenschaft Hohenroda e.G. liegt im Norden Leipzigs und umfasste zum Beginn der Studie (April 2014) ca. 1200 Tiere, darunter ungefähr 550 milchgebende Kühe der Rasse Schwarzbunte Holstein Friesian. Diese wurden in einem modernen Melkkarussell der Firma DeLaval mit 32 Plätzen zwei Mal täglich (07:00 Uhr und 19:00 Uhr) gemolken, wobei durchschnittlich 27 l Milch pro Kuh und Tag gewonnen wurden. Als Futter wurde eine totale Mischration (TMR) bestehend aus betriebseigenen Grundfutter (Gras- und Maissilage), strukturwirksamen Bestandteilen wie Heu oder Stroh sowie Kraftfutter und Mineralstoffzusatz, im Stall und während des Melkens im Karussell angeboten. Die Tiere wurden durchschnittlich in 50er Gruppen auf Vollspaltenboden und mit Matten ausgekleideten Liegebuchten gehalten, wobei der Abkalbebereich (Einzel- und Gruppenbuchten) mit Stroh eingestreut war. Sowohl die Tiere der ersten, als auch die Tiere der zweiten Laktation wurden in eigenständigen Gruppen gehalten. Ab der dritten Laktation gab es gemeinsame Altersgruppen. Der Betrieb war Leukose-, Brucellose- und BHV-I-frei.

Die Brunstbeobachtung wurde visuell mindestens zwei- bis dreimal täglich durch den Betriebsleiter bzw. in seltenen Fällen durch eine von ihm beauftragte Person durchgeführt. Dabei wurden das Verhalten, Aufspringen bzw. Dulden sowie Abgang von Brunstschleim als Marker für eine Brunst genutzt. Ergänzend dazu kam bei einigen Tieren die Pedometertechnik der Firma DeLaval zum Einsatz. Diese wurde täglich am Morgen ausgewertet.

Die Fruchtbarkeitskennzahlen des Betriebes wurden zu Beginn der Studie erhoben. Der Besamungsindex (BI) der Färsen betrug 1,9, wobei hier die Besamungen ausschließlich mit gesextem Sperma erfolgten, der BI der Kühe lag bei 2,4. Die Zwischenkalbezeit (ZKZ) und die Zwischentragezeit (ZTZ) lagen bei 427 Tagen bzw. bei 138 Tagen. Etwa 32 % der gesamten Abgänge beruhen auf Unfruchtbarkeit und Zyklusstörungen. Die NRR 56 lag bei 50,2 % und die NRR 90 betrug 38,4 %. Zur Zyklusbeeinflussung wurden in dem Betrieb ausschließlich homöopathische Präparate, die bei den Versuchstieren keine Anwendung finden sollten, eingesetzt. Die vom Betrieb gewählte freiwillige Wartezeit betrug 40 Tage. Sobald die Tiere danach eine Brunst zeigten und dabei gynäkologisch ohne auffällige Befunde waren, wurden sie durch den Besamungstechniker besamt. Einzelne Kühe, die eine Krankengeschichte bzw. eine gesundheitliche Beeinträchtigung während der Brunst aufwiesen, wurden individuell behandelt und erst nach der Genesung wieder in die Brunstbeobachtung aufgenommen. Die

Trächtigkeitsuntersuchung wurde durch die bestandsbetreuende Tierärztin manuell palpatorisch ab 42 Tagen post inseminationem durchgeführt.

3.1.2 Auswahlkriterien für die Versuchs- und Kontrolltiere

Die Versuchs- und die Kontrolltiere wurden alle nach demselben Kriterienschlüssel vorausgewählt. Nur Tiere ohne besonderen Befund bei der klinischen und klinisch-gynäkologischen Untersuchung wurden in den Versuch aufgenommen. Das bedeutete speziell, dass bei der allgemeinen Untersuchung die Futteraufnahme ungestört war, die aktuelle Milchleistung die Erwartung erfüllte, keine Symptome für eine klinische Mastitis oder eine auffällige Lahmheit vorlagen, das Verhalten, die Kotbeschaffenheit und die Körperhaltung physiologisch waren und es keine Anzeichen von Schmerzen, Intoxikationen oder Sepsis gab. Der *Body Condition Score* (BCS) lag zwischen $\geq 2,5$ und $\leq 4,5$ (nach EDMONSON et al. 1989).

Bei der äußeren gynäkologischen Beurteilung wurde auf die Länge und die Position des Dammes, die Schamspalte und die Schamlippen sowie auf unphysiologischen Ausfluss aus der Scham geachtet. Hierbei durften keine Narben, Verletzungen oder sonstige Pathologien erkennbar sein. Auch die innere gynäkologische Untersuchung sollte ohne besonderen Befund sein, damit nur geschlechts gesunde Tiere in den Versuch aufgenommen wurden. Jedes Tier wurde mittels Vaginoskop voruntersucht. Die Beurteilungskriterien waren das Vorhandensein des Hymenalschlusses und die Abwesenheit von Rötungen, offensichtlichen Narben oder Verletzungen der Schleimhaut von Vestibulum und Vagina. Außerdem durfte keine pathologische Sekretion (zum Beispiel Eiter oder trüber Schleim) vorhanden sein. Der äußere Muttermund wurde kontrolliert und nur Tiere „ohne besonderen Befund“ wurden in den Versuch aufgenommen. Bei stichprobenartig durchgeführten rektalen Untersuchungen wurden die bereits erhobenen Befunde noch ergänzt. Dabei war der Uterus nicht vergrößert, ohne fühlbaren Inhalt und frei beweglich. Der Tonus der Gebärmutter musste gemäß zum späten Proöstrus bzw. Östrus passend sein. Die Ovarien sollten eine physiologische Größe haben, eine zyklische Aktivität aufweisen und ohne Abnormitäten, wie Zysten oder Verwachsungen, vorliegen. Anhand einer Euteruntersuchung und grobsinnlichen Milchsekretbeurteilung (nach WINTER und ZEHLE 2009) wurde das Vorliegen von klinischen Mastitiden ausgeschlossen.

Wenn sich bei den genannten Untersuchungen ein pathologischer Befund ergab, wurde dieses Tier nicht in den Versuch einbezogen. Tiere, die Störungen bei der letzten Geburt (Schwergeburt, Totgeburt), Geburtsverletzungen, Gebärmuttervorfall, Nachgeburtsverhaltung, puerperale/postpuerperale Endometritis, fieberhafte behandlungswürdige Puerperalstörung, Festliegen nach der Geburt, z. B. durch Kalzium- oder Phosphormangel bedingt, sowie Stoffwechselstörungen (klinische Ketose,

Pansenazidose, oder -alkalose), Labmagenverlagerung nach links oder rechts, Klauenerkrankungen und/oder andere schwerwiegende Erkrankungen des Stützapparates mit Lahmheit oder sonstige fieberhafte Allgemeinerkrankungen aufwiesen, bzw. Kühe, bei denen eine hormonelle Zyklus- und Brunstinduktion durchgeführt worden war, wurden vom Versuch ausgeschlossen. Die Anzahl der bisherigen Kalbungen, sowie Erkrankungen und Milchleistungen (exklusive operative Eingriffe) in vorangegangenen Laktationen stellten keine Kriterien bei der Tierausswahl dar.

3.1.3 Versuchs- und Kontrolltiere

Im ersten Versuch fiel die Entscheidung, ob ein Tier Versuchs- oder Kontrolltier wurde, aus praktikablen Gründen über den Wochentag, an dem die Kuh zum ersten Mal mit Brunstsymptomatik vorgestellt wurde. Kühe, die von Dienstag bis einschließlich Freitag besamt wurden, gehörten der Versuchstiergruppe an. Fand die Besamung Samstag bis Montag statt, so wurden sie der Kontrollgruppe zugeteilt. Die Versuchstiere unterlagen einem festen Probennahme-Plan (siehe 3.3.2). Bei den Kontrolltieren wurden lediglich die Brunst und der Besamungszeitpunkt sowie das Trächtigkeitsergebnis erfasst, ohne jegliche Einflussnahme auf das Brunsterkennungs- und Besamungsregime.

Anhand der oben genannten Auswahlkriterien wurden im ersten Versuch ursprünglich 223 Versuchs- und Kontrolltiere in die Studie integriert, entsprechend 137 Tiere als Versuchstiere und 86 als Kontrolltiere. Aufgrund von systemischen Erkrankungen während des Versuchs, Überschreitung der festgelegten Versuchsbedingungen oder Schlachtung mussten insgesamt 71 Tiere aus der Studie vorzeitig ausscheiden. Somit konnten 84 Versuchstiere und 68 Kontrolltiere in die statistische Auswertung eingehen, wobei jedoch noch eine Kuh aus der Versuchstiergruppe nach Prüfung der Milchprogesterondaten mittels Grubbs-Tests (GraphPad, *outlier calculator*, $\alpha=0,05$) als extremer Ausreißer erkannt und nicht in die weiteren Datenanalysen einbezogen werden konnte.

Im zweiten Versuch gab es ausschließlich Versuchstiere, bei denen begleitend zum Probennahme-Plan verschiedene Untersuchungen durchgeführt wurden (siehe 3.3.3). Hierbei gingen 21 Tiere, die ebenfalls den Auswahlkriterien entsprechen mussten, in die Studie ein. Zwei Kühe wurden aufgrund von Klauenproblemen, die sich erst kurz nach dem Versuchszeitraum deutlich zeigten und gegebenenfalls Einfluss auf die Studie hatten, nachträglich gestrichen. Auch hier musste eine Kuh nach Durchführung des Grubbs-Tests (GraphPad, *outlier calculator*, $\alpha=0,05$) als extremer Ausreißer identifiziert und aus der Datenanalyse entfernt werden.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Milchprobengewinnung

Die erste Milchprobenentnahme erfolgte am Tag der Besamung eines jeden Versuchstiers zur zweiten Melkzeit des Tages. Dafür wurden ca. 10 ml Endgemelk des entsprechenden Versuchstiers in ein steriles Zentrifugenröhrchen der ReboPharm Arzneimittelvertriebsgesellschaft mbH gewonnen. Die Röhrchen wurden jeweils mit der Halsbandnummer des Tieres, der Gruppe in der sich das Tier befand, und dem Entnahmedatum beschriftet. Nach der Probengewinnung wurden die Röhrchen in einem handelsüblichen Kühlschrank bei ca. 5-7°C bis zur Analyse, die innerhalb der nächsten 12 h erfolgte, gelagert. Vom selben Tier wurden auf identische Art und Weise am Tag 6 und am Tag 20 nach der Besamung erneut Milchproben gewonnen und untersucht.

3.2.2 Testsystem Hormonost® Farmertest

3.2.2.1 Allgemeines zum Hormonost® Farmertest

Für die Studie wurde das Testsystem Hormonost® Farmertest der Firma Biolab GmbH (München, Deutschland) verwendet, welches mittels EIA und photometrischer Bestimmung der Farbintensität den Progesterongehalt einer Milchprobe ermittelt und als Set kommerziell erhältlich ist.

Dieses Set besteht, wie in Abbildung 4 dargestellt, aus:

- einem Gerätekoffer
- einem elektronischen Photometer zur Progesteronmessung „FertilityBox® Milchkuh“ mit einer digitalen Anzeige inklusive Netzteil
- einem elektronischen Aufwärmgerät „Microtherme®“ mit Platzhaltern für bis zu sechs Teströhrchen inklusive Netzteil
- einem Plastikteströhrchenhalter für bis zu sechs Teströhrchen
- einem wasserfesten Stift zur Beschriftung der Teströhrchen
- einem Testset mit 12 Teströhrchen



Abbildung 4: Testsystem Hormonost® Farmertest der Firma Biolab GmbH

Zusätzlich wurden eine Mikropipette und dazugehörige Pipettenspitzen der Firma Microlit (Lucknow, Indien) verwendet. Die für die Studie notwendigen Testpackungen entsprachen dem handelsüblichen Hormonost® Microlab Farmertest mit je 36 Teströhrchen. Diese Packungen enthielten ähnlich wie das Testset zum Starterpaket mit Gerätekofter, ein Fläschchen mit einer gelbe Banderole „Milchverdünner“ (enthält 15 ml), ein Fläschchen mit grüner Banderole „Enzym“ (enthält 8 ml) und ein Fläschchen mit blauer Banderole „Substrat“ (enthält 15 ml), zwei Kontrolllösungen „Kontrolle tragend – Anzeigebereich im microlab-Display 20 ± 4 ng/ml“ und „Kontrolle Brunst – Anzeigebereich im microlab-Display $<1-3$ ng/ml“ sowie 36 Teströhrchen. Alle Teströhrchen sind im oberen Drittel mit einer kleinen Rille als Markierung für das Photometer versehen. (Genaue Zusammensetzung der Substanzen werden vom Hersteller nicht angegeben)

3.2.2.2 Testdurchführung und Messprinzip

Die Durchführung des Hormonost® Farmertests erfolgte nach Herstellerangaben. Es konnten maximal sechs Proben in einem Testdurchgang angesetzt werden, wobei regelmäßig (anfangs bei jedem, später

bei jedem dritten Messdurchgang) Messungen mit Kontrolllösungen erfolgten. Jede Messung wurde unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt.

Zu Beginn der Milchprogesteronuntersuchung wurden das Photometer und die Microtherme® mit ihren Netzteilen ausgestattet und das Photometer beim Erklängen des ersten Signaltons angeschaltet und zum entsprechenden Menü „Farmer Test, max. 6 Röhrchen“ durchgewählt. Die Substanzen „Milchverdünner“ und „Substrat“ wurden in der Microtherme® auf Raumtemperatur (20-25°C) aufgewärmt. Die Anzahl der benötigten Teströhrchen wurde aus der Verpackung entnommen, beschriftet und in den Plastikröhrchenhalter gesetzt. Die zu untersuchenden Milchproben wurden aus dem Kühlschrank genommen, sechs Mal geschwenkt und in einen Halter gestellt. Durch Signaltöne des Photometers wurden dessen Bereitschaft, eine Messung starten zu können, sowie Ablauf von Inkubationszeiten und Anweisungen für folgende Arbeitsschritte signalisiert. Die Teströhrchen werden laut Herstellerangaben mit einer speziellen Technik mit Antikörpern gegen Progesteron beschichtet.

Der Beginn einer jeden Messung erfolgte durch Zugabe von 100 µl der zu testenden Milch und sechs Tropfen aus dem Fläschchen „Milchverdünner“. In diesem Schritt wird das in der Probe enthaltene Progesteron an der Oberfläche des Teströhrchens gebunden. Als nächstes erfolgten ein zehn Sekunden langes, schnelles Schwenken der Proben und damit ein Vermischen der Substanzen in jedem Teströhrchen. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde im nächsten Schritt durch die Zugabe von 100 µl der Substanz „Enzym“ P4, welches mit einem Enzym gekoppelt ist, an die noch freien Antikörper im Teströhrchen gebunden. Danach folgte erneut ein rasches Schwenken des Röhrchenhalters mit den Teströhrchen für zehn Sekunden und eine Inkubation von drei Minuten.

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen, die Röhrchen sechs Mal mit kühlem Wasser gespült und anschließend drei Mal kräftig ausgeschüttelt, um ein Verbleiben von Restwasser im Röhrchen zu verhindern. Nach Abtrocknen der außen anhaftenden Wassertropfen erfolgte nun die Zugabe von zwölf Tropfen „Substrat“ in das erste Teströhrchen. Nach kurzem Schwenken des Röhrchens wurde es sofort in das Photometer eingestellt. Das Gerät führt in diesem Schritt eine erste Messung für das entsprechende Teströhrchen durch, um nachher den Farbumschlag bewerten zu können (Abbildung 5, links). Nach der Messung konnte das Röhrchen entnommen und in die Microtherme® überführt werden. Mit weiteren Teströhrchen desselben Ansatzes wurde ebenso verfahren. Hier wurde als Ort für die Inkubation immer die Microtherme® gewählt, um einheitliche Analysebedingungen realisieren zu können. Nun erfolgte eine weitere Inkubationszeit, deren Ende wieder durch einen Tonsignal des Gerätes gekennzeichnet war. Nacheinander wurden, wie auf dem Display aufgeführt, die Teströhrchen in das Photometer eingestellt.

Durch die Zugabe von „Substrat“ wird der P4-Enzymkomplex, welcher an den freien Bindungsstellen im Röhrchen anhaftet, umgesetzt, und es kommt zu einem blauen Farbumschlag. Das bedeutet, je

deutlicher die Blaufärbung, umso weniger Progesteron war in der Milchprobe enthalten (Abbildung 5, rechts). Im Umkehrschluss zeigte eine Probe mit einem hohen P4 nach der Inkubationszeit keine Farbveränderung. Der Farbumschlag bzw. die Intensität des Farbtönen wird mittels Extinktionsmessung im Photometer ermittelt und direkt in den daraus resultierenden Gehalt an Progesteron umgerechnet. Nach der Messung aller Teströhrchen wurden die Ergebnisse der einzelnen Proben nacheinander im Display angezeigt. Die Darstellung des P4-Wertes erfolgte in ng/ml Milch bis auf eine Stelle hinter dem Komma.



Abbildung 5: Teströhrchen vor und nach dem Farbumschlag: **links:** Teströhrchen nach der Zugabe von 12 Tropfen „Substrat“, **rechts:** Teströhrchen nach der Inkubationszeit (links: ohne Farbumschlag mit entsprechend hohem P4 der Ausgangsprobe, rechts: deutliche Blaufärbung, hervorgerufen durch niedrigen P4-Gehalt der Ausgangsprobe)

3.2.2.3 Überprüfung der Messgenauigkeit und Durchführungssicherheit unter Anwendung der Kontrolllösungen

Vor Beginn der Untersuchung der Studienmilchproben wurden die Messgenauigkeit bzw. die Reproduzierbarkeit sowie die Durchführungssicherheit des Tests mittels der mitgeführten Kontrolllösungen überprüft. Es wurden je sechs Teströhrchen mit der Kontrolllösung „Brunst“ und der Kontrolllösung „trächtig“ durchgeführt. Die ermittelten P4-Werte lagen stets im angegebenen Bereich von 20 ± 4 ng/ml Lösung für die Kontrolle „trächtig“ und $<1-3$ ng/ml Lösung für die Kontrolle „Brunst“. In regelmäßigen Abständen, das heißt bei jeder dritten Messreihe, wurde während der Datenerhebungen je eine Kontrolle „Brunst“ und eine Kontrolle „trächtig“ mitgeführt. Die Analyse erfolgte nach den geschilderten Herstellerangaben.

3.2.3 Betriebsdaten aus dem Herdenmanager

Das im Versuchsbetrieb benutzte Herdenmanagementprogramm „Herde“ von der Firma dsp-Agrosoft GmbH (Ketzin/Havel, Deutschland) wurde freundlicher Weise vom Betrieb zur Erhebung tierspezifischer Daten zur Verfügung gestellt. Hieraus wurden das Erstkalbealter, die Anzahl der Kalbungen bzw. Laktationen, die Wartezeit (Zeit zwischen der letzten Kalbung bis zur ersten Besamung), die Zwischentragezeit (Zeit zwischen zwei Trächtigkeiten), die Anzahl der bereits durchgeführten Besamungen, Ergebnisse der Trächtigkeitsuntersuchung und die Milchmengen in einem Zeitraum von zwei Tagen vor bis einschließlich zwei Tagen nach den durchgeführten künstlichen Besamungen (KB) für jedes Versuchstier erhoben. Die Milchdaten beider Melkzeiten wurden vom verwendeten Melksystem der Firma DeLaval (Glinde, Deutschland) einmal täglich um 02:00 nachts über eine Kopplung in das Herdenmanagementprogramm eingelesen.

3.3 Versuchsaufbau und Ablauf

3.3.1 Vorversuch

Im Februar 2014 wurde im Vorfeld zu den Hauptversuchen von vier sicher in Brunst befindlichen Tieren und von vier sicher tragenden Tieren einmalig Milch gewonnen. Diese Milchröhrchen lagerten im Kühlschrank und über einen Zeitraum von sechs Tagen wurde einmal täglich mit dem Testsystem Hormonost[®] Farmertest der Milchprogesteronwert jeder der sechs Proben gemessen und die Ergebnisse entsprechend notiert. Dieser Vorversuch wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine Interpretation des Messwertes nicht verfälscht werden würde, sollte die Probe nicht am Tag der Entnahme untersucht werden können.

3.3.2 Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1)

Der erste bzw. der Hauptversuch der Arbeit fand im Zeitraum von Anfang April 2014 bis Ende Dezember 2014 statt. Tiere, die den Auswahlkriterien entsprachen, wurden am Tag der Besamung (entsprechend dem Zeitpunkt eins (ZP1)), sechs Tage nach der Besamung (entsprechend dem Zeitpunkt zwei (ZP2)) und 20 Tage nach der Besamung (entsprechend dem Zeitpunkt drei (ZP3)) beprobt. Abhängig vom Gehalt des Milchprogesterons an ZP1 wurde jedes Versuchstier wie in Abbildung 6 dargestellt in einen Probennahme-Plan eingegliedert.

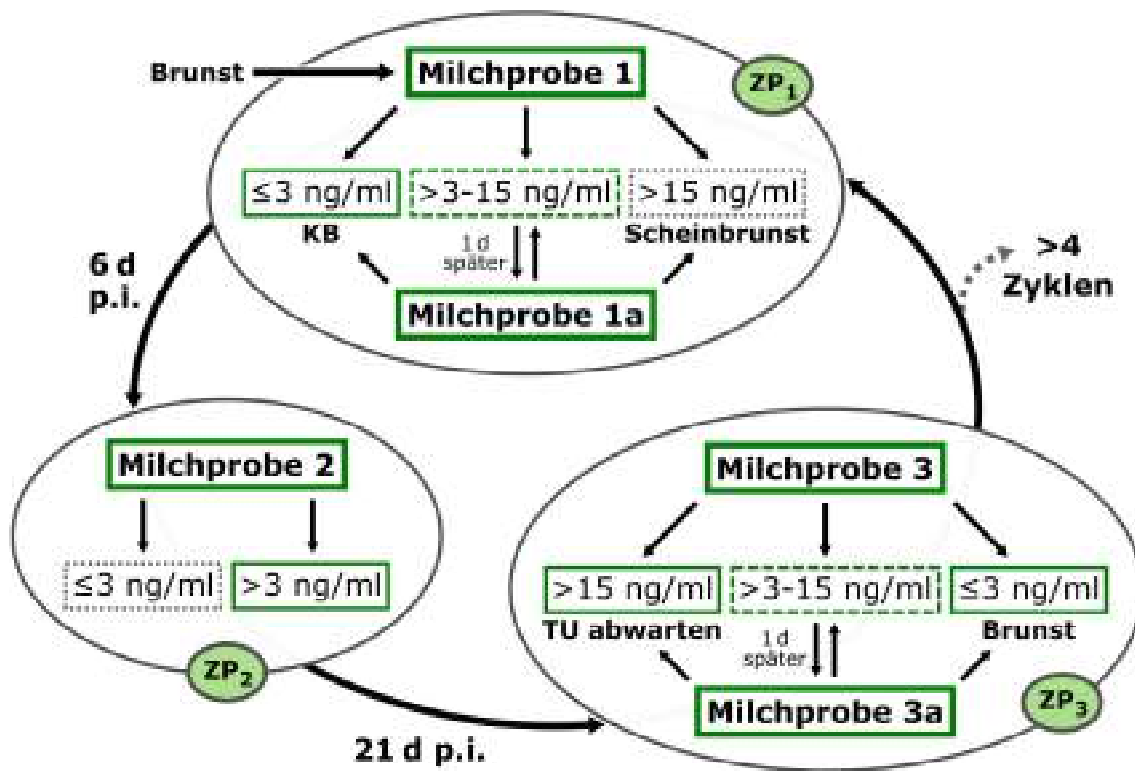


Abbildung 6: Probennahmeplan und Milchprogesterongehalte innerhalb eines Messzyklus (ZP = Zeitpunkt, KB = künstliche Besamung, d = Tage, p.i. = post inseminationem, ng/ml = Milchprogesteronwert in Nanogramm pro Milliliter Endgemelk, grau gepunktete Linie = aus dem Versuch ausgeschieden, grün gestrichelte Linie = weitere Proben notwendig, dünne grün durchgezogene Linie = optimal, weiter im Versuchsplan)

Sollte am Tag der Besamung (KB₁) der Progesteronwert der Milchprobe 1 nicht passend, d.h. nicht ≤ 3 ng/ml Milch, gewesen sein und/oder die Verhaltensbrunst am Folgetag noch sehr deutlich, erfolgte am nächsten Tag erneut eine Probenahme (Milchprobe 1a) und gegebenenfalls eine weitere KB (entsprechend der KB₂ im ersten Besamungszyklus). Im Falle von weiteren Besamungen innerhalb einer Brunst wurde die zur letzten KB gewonnene Milchprobe als Probe für **ZP1** gewählt und danach die entsprechenden Folgetermine für die weiteren P4-Beprobungen festgelegt. Ebenso wurde verfahren, wenn am zweiten Tag nach der ersten Besamung eine KB (entsprechend der KB₃) stattfand und der Progesteronwert entsprechend der Definition passend war. Rund 63 % der Versuchstiere wurden somit durch die Mitteilung über den ermittelten P4-Wert, welcher über dem vorgesehenen Grenzwert zum initialen Besamungstag lag, einer KB₂ am Folgetag zugeführt. Wenn ein Tier innerhalb von drei Tagen in Folge dem Besamungstechniker vorgestellt sowie gegebenenfalls bereits besamt wurde und ein viertes Mal zur Brunstuntersuchung kam, schied es wegen zu vermutender Zyklusstörungen aus dem Versuch, unabhängig vom P4-Wert, aus. Diese Situation kam, ebenso wie die Notwendigkeit einer KB₃ zum ZP1, im Rahmen der durchgeführten Studie nicht vor.

Betrag der P4 zum ZP1 >15 ng/ml Milch, wurde dieses Tier nicht in die Studie integriert, da der Verdacht bestand, dass keine echte Brunst sondern eine sogenannte Scheinbrunst vorlag. Zusätzlich wurde die Empfehlung gegeben, dieses Tier tierärztlich untersuchen zu lassen. Abweichend vom standardisierten Verfahren konnte der vorgegebene P4-Grenzwert zum ZP1 innerhalb des Brustzeitraums der Tiere aus betrieblichen Gründen während des Feldversuchs nicht immer eingehalten werden.

Zum **ZP2** wurde der P4-Wert lediglich gemessen sowie registriert (Milchprobe 2). Im Fall von einem P4 ≤ 3 ng/ml Milch schieden die Tiere aufgrund vermuteter hormoneller Störungen aus der Studie aus.

Der letzte Messzeitpunkt (**ZP3**) mit der Milchprobe 3 21 Tage p.i. entschied dann, ob ein Tier einen weiteren Zyklus im Versuch verblieb oder die Trächtigkeitsuntersuchung abgewartet wurde. Betrag der Progesteronwert >15 ng/ml Milch, wurde die TU bei diesem Tier abgewartet. Bei einem Wert zwischen 3-15 ng/ml Milch wurde am Folgetag erneut eine Milchprobe (Milchprobe 3a) gezogen und ebenso wie an ZP1 verfahren. Lag der P4-Wert ≤ 3 ng/ml Milch, erfolgte die Besamung zu dem Zeitpunkt.

Die einzelnen Versuchstiere durften dabei maximal vier Zyklen, die mit Progesteronmessungen und Kontrolle bzw. Einflussnahme auf das Besamungsregime begleitet wurden, durchlaufen. Alle Kühe, die nach Ablauf von vier Zyklen im Versuchszeitraum nicht tragend waren, schieden automatisch aus. Das galt ebenso für die Kontrolltiere. Die Durchführung der Brunstbeobachtung und der Besamung erfolgte durch dieselben Personen. Das Besamungsmanagement während der Versuche wurde wie sonst im Betrieb üblich durchgeführt.

3.3.3 Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch-gynäkologischer Befunde (Versuch 2)

Im Anschluss an den Hauptversuch wurde im August 2015 (Tageshöchsttemperaturen von 28-32°C) über drei Wochen ein ergänzender Versuch (Versuch 2) durchgeführt. Die Festlegung der Messzeitpunkte für die Ermittlung des Milchprogesterons erfolgte nach demselben Schema wie in Kapitel 3.3.2. dargestellt. Parallel zum Zeitpunkt der Besamung wurden eine Beurteilung vom äußeren Genitale und eine rektale sowie eine vaginoskopische Untersuchung durchgeführt und die Befunde notiert. Die Befunderhebung erfolgte, wie in Tabelle 4 dargestellt, angelehnt an den Befundungsschlüssel der Rektalisierung von GÖTZE 1949 (modifiziert nach GRUNERT (1999b)).

Tabelle 4: Gynäkologische Untersuchung und Befunderhebung (vereinfacht dargestellt)

Untersuchungsmethode	Inhalt der Untersuchung	Befunde bei Brunst
Visuelle Beurteilung des äußeren Genitals (ÄG)	Ödematisierung und Fältelung der Labien	ödematisiert
	Färbung der Labien	gerötet
	Färbung der Vestibularschleimhaut	gerötet
	Position der Scham	physiologisch
	Sekretabgang	klarer, fadenziehender Brunstschleim
	Pathologien	keine
Vaginoskopische Untersuchung (VU)	Hymenalschluss	vorhanden
	Farbe und Feuchtigkeit der Vaginalschleimhaut	rosarot und feucht
	Farbe, Formation und Öffnungsgrad des äußeren Muttermundes	ödematisiert, gerötet und geöffnet
	Inhalt/Sekret im Bereich der Vagina	klarer, fadenziehender Brunstschleim
Manuelle und ultrasonografische rektale Untersuchung (RU)	Größe, Lage, Inhalt, Tonus, Verschieblichkeit und Symmetrie der Gebärmutter	Keine Anomalien, kontraktile
	Größe der Ovarien und deren Funktionskörper	Keine Anomalien, Graafscher Follikel

Für jeden Parameter wurde unabhängig voneinander die Entscheidung „in Brunst befindlich“ mit ja oder nein dokumentiert. Diese Befunderhebung wurde 21 Tage nach der KB, der sogenannten „Umrinderkontrolle“, wiederholt, wobei es Einschränkungen bei der vaginalen Untersuchung gab. Sollten die anderen Parameter gegen eine Brunst gesprochen haben, wurde auf Wunsch des Betriebes keine vaginale Untersuchung (VU) an diesem Tier durchgeführt. Zur transrektalen ultrasonografischen Beurteilung, bei der Inhalt sowie Größe der Gebärmutter als auch Größe und Funktionskörper der Ovarien beurteilt wurden, fand ein HONDA HS-101 V mit einem 5 MHz Linearschallkopf Anwendung.

3.4 Statistische Methoden

Aus dem Vorversuch konnten insgesamt 48 Milchprogesteronmessergebnisse in die statistische Analyse einbezogen werden.

Im ersten Versuch, dem Hauptversuch, wurden von allen 83 Versuchstieren und 68 Kontrolltieren sowie im zweiten Versuch von allen 18 Versuchstieren die tierspezifischen Daten aus dem Herdenmanager erhoben und ausgewertet.

Im ersten Versuch lagen insgesamt 126 auswertbare, mittels Testgerät bestimmte Brunstzyklen (Testzyklen), davon 83 mit positivem Trächtigkeitsergebnis und 43 mit negativem Trächtigkeitsergebnis, vor. Da einige Proben falsch gelagert wurden, die Behältnisse einen Riss aufwiesen oder nicht richtig verschlossen wurden und deshalb ausliefen, sowie bei vier Proben der Verdacht auf Verwechslung der Röhrchen während der Entnahme vorlag, wurden diese Proben bzw. Messwerte nicht mit in die statistischen Berechnungen integriert.

Somit gingen insgesamt 117 Milchproben für den ZP1, 108 Milchproben für den ZP2 und 117 Milchproben für den ZP3 in die Auswertung ein. Für eine altersabhängige Analyse wurden die Tiere abhängig von ihrer Laktationsnummer in Laktationsgruppen mit den Bezeichnungen LG1 (der ersten Laktation entsprechend), LG2 (zweite Laktation) und LG3 (ab der dritten Laktation) eingeteilt. Des Weiteren mussten im ersten Versuch sechs Datensätze für die Milchmenge der Versuchstiere und zwei der Kontrolltiere gestrichen werden, da technische Probleme dazu führten, dass nur eine Melkzeit des jeweiligen Tiers in der Milchmengenerfassung erhoben werden konnte.

Im zweiten Versuch kamen bei jedem der 18 Tiere für alle drei P4-Messzeitpunkte Milchproben in die Auswertung. Zusätzlich wurden 18 Ergebnisse der RU, VU und der Beurteilung des äußeren Genitals (ÄG) zum Zeitpunkt der Besamung erhoben. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Umrinderkontrolle (21 d post inseminationem (p.i.)) konnten ebenso 18 Ergebnisse von RU und Beurteilung des äußeren Genitals, sowie sechs Ergebnisse von durchgeführten vaginalen Untersuchungen statistisch ausgewertet werden.

Die Datenauswertung und die Diagrammerstellung erfolgten unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 23.0. Dafür wurden die Daten aus dem Vorversuch, dem ersten und dem zweiten Versuch zunächst mittels SHAPIRO-WILK-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Ergebnisse des Tests sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht zum SHAPIRO-WILK-Test auf Normalverteilung in den Versuchen

Versuche	nicht normalverteilte Daten	normalverteilte Daten
Vorversuch	Milchprogesteron	
Versuch 1	Erstkalbealter Wartezeit Verzögerungszeit Zwischentragezeit Zykluslänge Milchprogesteron	Milchmenge
Versuch 2	Erstkalbealter Milchprogesteron Beurteilungen des ÄG, der RU, der VU und des P4	Milchmenge Wartezeit Verzögerungszeit Zwischentragezeit

Für normalverteilte Daten wurden parametrische Tests durchgeführt, für nichtnormalverteilte Daten parameterfreie Tests. Als deskriptive Statistiken wurden sowohl für Versuch 1 als auch für Versuch 2 Häufigkeiten, Mittelwerte, Standardabweichungen und -Fehler, Mediane, erstes und drittes Quartil, Minimum und Maximum berechnet.

Für die Stückzahl $N \leq 30$ Tiere wird die exakte Signifikanz und für $N > 30$ Tiere wird die asymptotische Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben. Die Kennzeichnung der Signifikanzen in den Tabellen erfolgt über das Sternchensymbol *. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Daraus folgt: $p > 0,05$ ist nicht signifikant, $p \leq 0,05$ ist schwach signifikant (*), $p \leq 0,01$ signifikant (**) und $p \leq 0,001$ (***) ist hoch signifikant.

3.4.1 Statistische Tests des Vorversuchs

Um zu überprüfen, ob sich die Milchprogesterondaten von jeweils ein und derselben Milchprobe innerhalb von sechs Tagen nach der Entnahme, bei Lagerung im Kühlschrank, signifikant unterschieden, wurden sie mittels FRIEDMAN-Test analysiert.

3.4.2 Statistische Tests der Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1)

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die Kontroll- oder die Versuchstiere früher tragend wurden, fanden der U-Test nach MANN und WHITNEY und der χ^2 -Test Anwendung.

Um den Verlauf der Milch-P4-Konzentration genauestens nachvollziehen zu können, wurde zunächst verifiziert, ob das Testgerät Veränderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten feststellen kann. Dazu wurden initial der FRIEDMAN-Test und im Anschluss der WILCOXON-Test mit BONFERRONI-Korrektur (notwendig bei multipler Testdurchführung) bei den jeweils ersten Messzyklen aller Versuchstiere, und im Anschluss daran, getrennt nach dem Ergebnis „tragend“ bzw. „nicht tragend“, durchgeführt.

Um feststellen zu können, ob es signifikante Unterschiede an den einzelnen Messzeitpunkten zwischen tragenden und nicht tragenden Kühen nach der KB gab, wurde der U-Test nach MANN und WHITNEY verwendet.

Um die Laktationsgruppen miteinander zu vergleichen, wurde mittels U-Test nach MANN und WHITNEY geschaut, ob die Zykluslängen im Gruppenvergleich unterschiedlich waren. Des Weiteren wurde bei den Versuchstieren der Vergleich von Milchprogesteronwerten zu den drei Messzeitpunkten in den Laktationsgruppen untereinander mittels KRUSKAL-WALLIS-Test und dem U-Test nach MANN und WHITNEY getätigt. Dabei erfolgte eine Trennung zwischen tragend und nicht tragend resultierenden Testzyklen. Unter Anwendung des Chi²-Tests wurde ermittelt, ob eine Laktationsgruppe signifikant früher tragend wurde.

Mit Hilfe einer *one-way repeated measures ANOVA (Analysis Of Variance*, allgemein lineares Modell zur Varianzanalyse mit Messwiederholungen), einem Innersubjektfaktor von fünf und der BONFERRONI-Korrektur wurde kontrolliert, ob sich innerhalb eines Zeitraums von fünf Tagen um die Besamung die Milchmenge bei den Versuchs- und Kontrollkühen signifikant reduzierte.

3.4.3 Statistische Tests der Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch-gynäkologischer Befunde (Versuch 2)

Um zu überprüfen, ob der Test auch mit weniger Tieren evident ist, wurde die Verifizierung mittels FRIEDMAN-Test und WILCOXON-Test aus dem ersten Versuch wiederholt.

Die Übereinstimmung der Beurteilung „in Brunst befindlich“ zwischen dem nach Herstellerangaben interpretierten Milchprogesteronwert und der rektalen Untersuchung, der vaginalen Untersuchung bzw. der Beurteilung des äußeren Genitals wurde über Kreuztabellen ermittelt und in Prozentangaben verfasst. Diese Analyse wurde sowohl für den Zeitpunkt der künstlichen Besamung (KB) und der Beurteilung zum Zeitpunkt der Umrinderkontrolle (UK) durchgeführt.

Auch im Versuch 2 wurde mittels einer *one-way repeated measures* ANOVA, einem Innersubjektfaktor von fünf und der BONFERRONI -Korrektur berechnet, ob sich die Milchmenge signifikant rund um den Brunstzeitraum veränderte.

3.4.4 Erläuterung zur grafischen Darstellung der Ergebnisse

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte, wie in Abbildung 7 dargestellt, in einfachen Balkendiagrammen und in Boxplots. Im Boxplot ist der Median als stärkste Querlinie im Diagramm abgetragen. Die abgebildete Box beinhaltet die mittleren 50 % der Daten. An den Enden der Whisker (vertikale Linien, welche höchstens bis zu 1,5 fach so hoch sind wie die Box selbst) ist jeweils der kleinste bzw. der größte Datenpunkt, der keinem Ausreißer entspricht, abgetragen. Die Box wird durch das 25 % und das 75 % Quartil begrenzt, dem sogenannten Interquartilsabstand (IQR). Milde Ausreißer ($1,5-3 \times \text{IQR}$) werden mit einem kleinen Kreis und extreme Ausreißer ($>3 \times \text{IQR}$) mit einem kleinen Stern gekennzeichnet (nicht dargestellt) (WEBINGER et al. 2014).

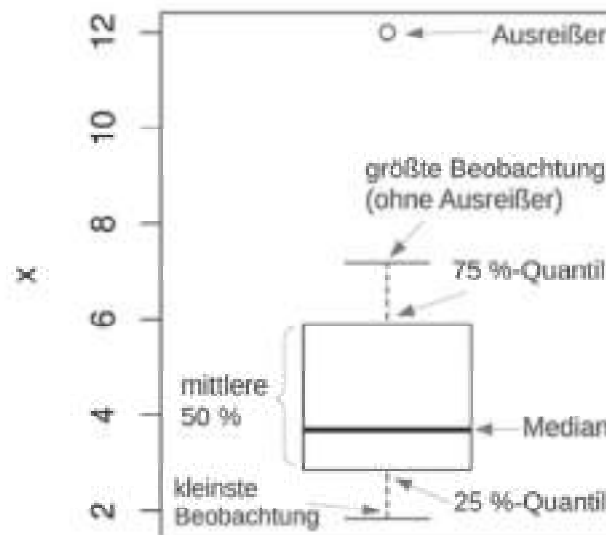


Abbildung 7: Muster eines Boxplot-Diagramms (WEBINGER et al. 2014)

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des Vorversuchs

In Tabelle 6 sind die Messergebnisse zum durchgeführten Vorversuch dargestellt. Über den FRIEDMAN-Test ergab sich zwischen den wiederholten Messungen eine Signifikanz von $p=0,316$. Damit lässt sich sagen, dass es keinen Unterschied zwischen den gemessenen Werten von jeweils ein und derselben Milchprobe an sechs aufeinander folgenden Tagen gibt. Das bedeutet, dass die Interpretation des ermittelten Milchprogesterons aufgrund der Tatsache, dass eine Probe gegebenenfalls erst ein oder zwei Tage später bestimmt werden kann, statistisch zu keinen abweichenden Ergebnissen führt.

Tabelle 6: Datensatz zu den täglich gemessenen Progesteronwerten jeweils der gleichen Milchprobe über eine Woche (Vorversuch)

Kuhnummer	Milchprogesteron [ng/ml Milch]					
	Entnahmetag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag
6217	26,0	27,0	27,1	26,7	25,9	26,3
49	22,9	21,7	23,8	22,3	22,0	21,8
1096	29,0	27,9	28,5	28,1	27,7	28,5
7208	25,5	25,0	26,8	25,4	25,8	26,0
5704	2,4	2,5	3,3	2,7	2,8	2,7
1835	3,2	3,1	2,9	2,0	1,3	2,5
6619	<1	1,9	1,7	1,4	2,1	1,9
6261	2,8	<1	<1	<1	2,3	1,9

4.2 Ergebnisse zur Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1)

Insgesamt wurde die Milchprogesteronmessung über drei Zeitpunkte innerhalb eines Zyklusgeschehens 126 Mal durchgeführt. Dabei waren für sieben Tiere vier Besamungszyklen, für 12 Tiere drei Zyklen, für 23 Tiere zwei Zyklen und für 41 Tiere ein Zyklus bis zum positiven Trächtigkeitsergebnis notwendig.

Die 151 Versuchs- und Kontrolltiere befanden sich zwischen der ersten und der neunten Laktation. Die Anzahl und der prozentuale Anteil innerhalb der Zuordnung der Tiere zur Laktationsgruppe ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Anteil der Tiere in den Laktationsgruppen (N = Anzahl der Tiere)

	Laktationsgruppe 1		Laktationsgruppe 2		Laktationsgruppe 3		gesamt
	N	%	N	%	N	%	N
Versuchstiere	43	51,8	19	22,9	21	25,3	83
Kontrolltiere	32	47,1	11	16,2	25	36,8	68
Gesamt	75	49,7	30	19,9	46	30,5	151

Die deskriptive Statistik zur Wartezeit, Verzögerungszeit (Zeit zwischen der Erstbesamung und der Besamung, die zur Trächtigkeit führt), Zwischentragezeit sowie zum Erstkalbealter ist in Tabelle 8 dargestellt. Im Median wurde vom Betrieb für die im Versuch befindlichen Tiere einer Wartezeit von 69 Tagen gewählt. Mit einer medianen Verzögerungszeit von 25 Tagen kam es zu einer Zwischentragezeit von 116 Tagen. Die Zykluslänge lag durchschnittlich bei $22,88 \pm 1,68$ Tagen.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik aus Versuch 1 zur Zwischentragezeit (ZTZ), Wartezeit (WZ), Verzögerungszeit (VZ), Zykluslänge (ZL) und Erstkalbealter (EKA) (N = Anzahl der Tiere, MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, SF = Standardfehler, KI (95 %) = 95 %iges Konfidenzintervall, Min = Minimum, Max = Maximum, d = Tage, m = Monate)

	N	MW \pm σ	SF	KI (95 %)	Median (25.-; 75. Perzentil)	Min	Max
WZ [d]	151	80,84 \pm 32,708	2,662	75,58-86,10	69,00 (54,00; 106,00)	40	172
VZ [d]	151	39,95 \pm 43,023	3,501	33,03-46,86	25,00 (0; 71,00)	0	177
ZTZ [d]	151	120,79 \pm 54,040	4,398	112,10-129,48	116,00 (78,00; 151,00)	40	267
ZL [d]	58	22,88 \pm 1,676	0,220	22,44-23,32	23,00 (21,00; 24,00)	19	26
EKA [m]	151	26,58 \pm 2,591	0,211	26,17-27,00	26,00 (25,00; 28,00)	22	36

Die prozentuale Verteilung des Erstkalbealters der Versuchs- und Kontrolltiere ist in Abbildung 8 dargestellt. Der Median des EKA betrug 26 Monate.

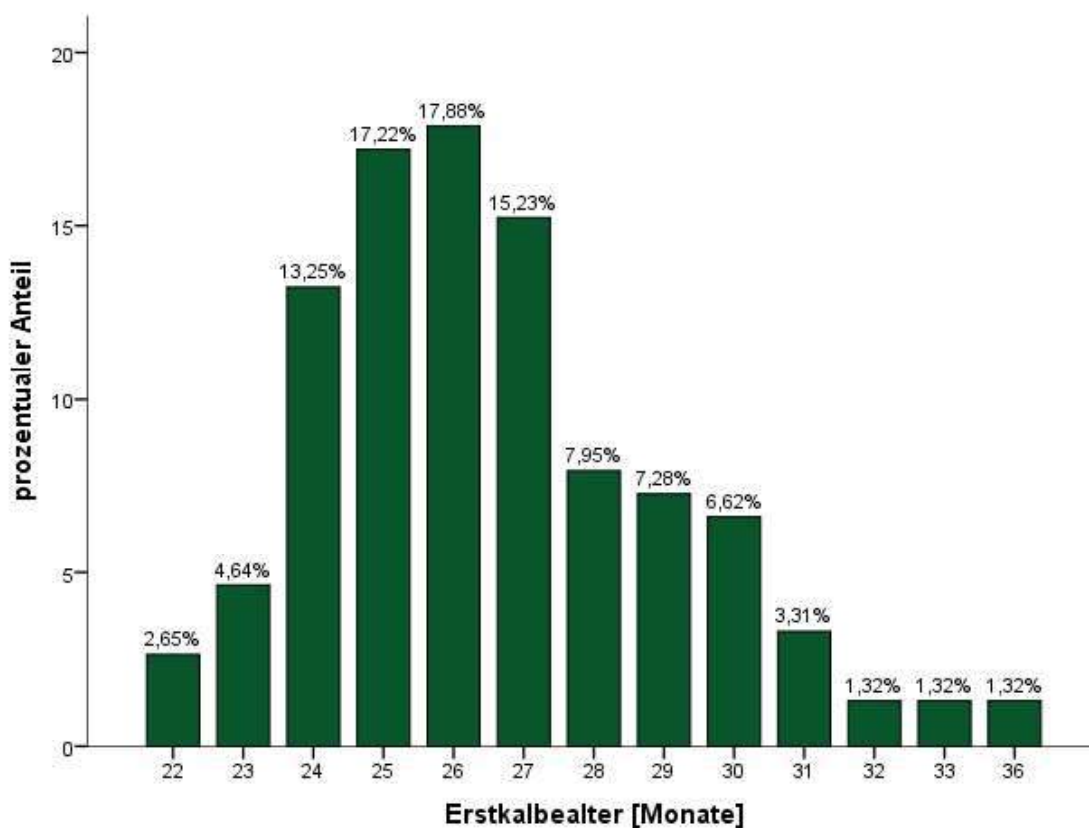


Abbildung 8: Übersicht zur prozentualen Häufigkeit des EKA der im Versuch befindlichen Tiere

Da sich die Versuchstiere (VT) und die Kontrolltiere (KT) in Wartezeit, Verzögerungszeit und Zwischentragezeit unterschieden, sind diese Fruchtbarkeitskennzahlen in Tabelle 9 dargestellt. Der Median der Wartezeit betrug sowohl bei den Versuchs- als auch bei den Kontrolltieren 69 Tage. Die Verzögerungszeit betrug im Schnitt elf Tage bei den Versuchstieren, aber 49 Tage bei den Kontrolltieren. Bei den Versuchstieren lag die Zwischentragezeit im Median bei 109 Tagen und 122 Tage bei den Kontrolltieren.

Tabelle 9: Deskriptive Statistik zur Wartezeit (WZ), Verzögerungszeit (VZ) und Zwischentragezeit (ZTZ) in Unterscheidung Versuchstiere (VT) und Kontrolltiere (KT) (N = Anzahl der Tiere, MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, SF = Standardfehler, KI (95 %) = 95 %iges Konfidenzintervall, Min = Minimum, Max = Maximum, d = Tage)

	N	MW $\pm\sigma$	SF	KI (95 %)	Median (25.-; 75. Perzentil)	Min	Max
WZ (VT) [d]	83	81,08 \pm 32,847	3,605	73,91-88,26	69,00 (45,00; 103,00)	40	172
WZ (KT) [d]	68	80,54 \pm 32,779	3,975	72,61-88,48	69,00 (54,25; 112,00)	41	166
VZ (VT) [d]	83	26,84 \pm 35,190	3,863	19,16-34,53	11,00 (0; 49)	0	177
VZ (KT) [d]	68	55,94 \pm 46,433	5,631	44,70-67,18	49,00 (5,25; 95,00)	0	153
ZTZ (VT) [d]	83	107,93 \pm 44,203	4,852	98,28-117,58	109,00 (68,00; 143,00)	40	245
ZTZ (KT) [d]	68	136,49 \pm 60,759	7,368	121,78-151,19	122,50 (88,50; 183,75)	41	267

Zur Fragestellung, welche der beiden Tiergruppen im Versuchszeitraum durchschnittlich früher tragend wurde, konnte der in Abbildung 9 gewonnene optische Eindruck sowohl im MANN-WHITNEY-U Test als auch im Chi²-Test durch einen signifikanten Unterschied bestätigt werden. Im U-Test nach MANN und WHITNEY ergab sich eine asymptotische Signifikanz von $p < 0,001$ und im Chi²-Test $p = 0,005$. Die Versuchstiere, welche mit der Milchprogesteronmessung begleitet und im Besamungszeitpunkt beeinflusst werden konnten, sind signifikant eher tragend geworden. Der Hauptunterschied ist dabei innerhalb der ersten Besamung nach Versuchsbeginn erkennbar, bei der 41 von 83 Versuchstieren (entsprechend 49,4 %) und 16 von 68 Kontrolltieren (entsprechend 23,5 %) tragend wurden.

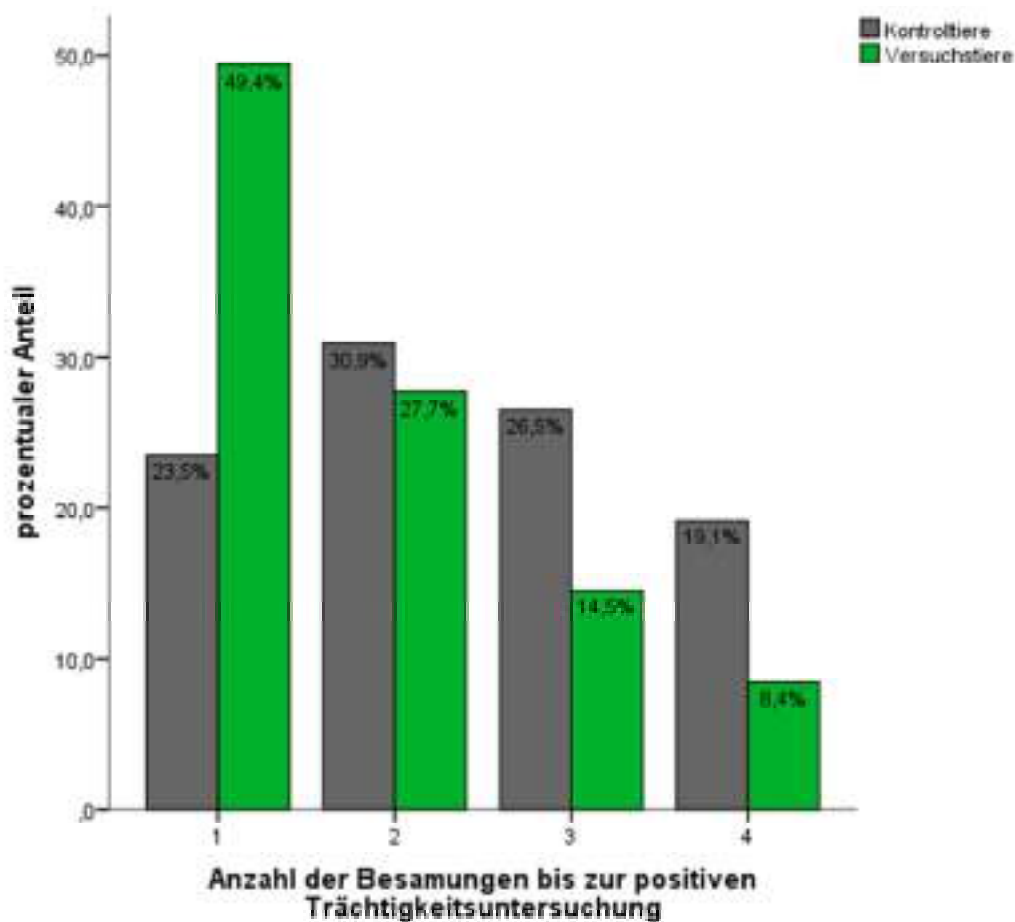


Abbildung 9: Anteil der trächtig gewordenen Versuchs-(N = 83) und Kontrolltiere (N = 68) in Abhängigkeit zur Anzahl an Besamungen nach Versuchsbeginn

Für die Verifizierung, ob das Testsystem Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten feststellen kann, wurden die im ersten Testdurchlauf gemessenen vollständigen Zyklen genutzt (N=70). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Mittels FRIEDMAN-Test konnte eine asymptotische Signifikanz von $p < 0,001$ ermittelt werden. Unter Zuhilfenahme des WILCOXON-Tests und Anwendung der BONFERRONI-Korrektur wurden die drei Messzeitpunkte untereinander verglichen. Zwischen allen drei Zeitpunkten gab es hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$). Aufgeteilt in „tragend“ und „nicht tragend“ gewordene Tiere nach der Besamung wurden die Tests wiederholt. Ausschließlich im Vergleich zwischen ZP2 und ZP3 der nicht tragend gewordenen Tiere gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,927$). Das durch BONFERONI korrigierte Signifikanzniveau liegt für diese Analyse bei $p < 0,017$.

Tabelle 10: Signifikanzen zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten im ersten Testdurchlauf zur Verifizierung des Gerätes (N = Anzahl der Tiere, ZP = Messzeitpunkt)

	N	Signifikanz im FRIEDMAN-Test zwischen allen 3 ZP	Signifikanz im WILCOXON-Test (nach BONFERRONI – Korrektur)		
			ZP1 zu ZP2	ZP1 zu ZP3	ZP2 zu ZP3
Tiere gesamt	70	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Tragende Tiere	47	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Nicht tragende Tiere	23	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,927

Die sich daraus ergebende Fragestellung, ob es signifikante Unterschiede innerhalb der Messzeitpunkte zwischen Tieren gibt, die später für „tragend“ bzw. „nicht tragend“ befundet worden sind, wurde mittels MANN-WHITNEY-U-Test beantwortet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 und grafisch in Abbildung 10 dargestellt. Der Medianwert zum Besamungszeitpunkt (ZP1) lag bei den später als tragend diagnostizierten Tieren bei 3,7 ng/ml Milch und bei denen, die aus dieser Besamung nicht trächtig wurden, bei 4,3 ng/ml Milch. Zum Zeitpunkt drei (20 Tage nach der KB) lag der Median der trächtig gewordenen Tiere bei 25,2 ng/ml Milch und der Median der nicht für trächtig befundenen Tiere bei 20,1 ng/ml Milch. Innerhalb der ersten zwei Messzeitpunkte, das heißt am Tag der Besamung und sechs Tage nach der Besamung, ergab sich kein signifikanter Unterschied (p=0,078 bzw. p=0,526) zwischen den als „tragend“ oder als „nicht tragend“ befundenen Tieren. Zum Zeitpunkt 3 war ein signifikanter Unterschied zwischen tragenden und nicht tragenden Kühen feststellbar (p=0,002).

Tabelle 11: Vergleich der Milchprogesteronwerte zwischen den drei Messzeitpunkten in Unterscheidung zwischen tragend und nicht tragend gewordenen Tieren (N = Anzahl der Tiere, ZP = Messzeitpunkt)

	Milchprogesteron zum ZP 1		Milchprogesteron zum ZP 2		Milchprogesteron zum ZP 3	
	+	-	+	-	+	-
Trächtigkeitsergebnis						
N	77	40	73	35	79	38
Median [ng/ml]	3,7	4,3	20,5	17,5	25,2	20,1
25. Perzentil [ng/ml]	2,3	2,15	14,25	11,6	23,8	5,15
75. Perzentil [ng/ml]	5,75	6,225	22,75	22,9	27,0	26,225
Min	1,0	1,0	3,5	3,1	18,6	1,0
Max	12,2	12,7	30,0	27,7	30,0	30,0
Signifikanz nach MANN-WHITNEY-U	p = 0,078		p = 0,526		p = 0,002	

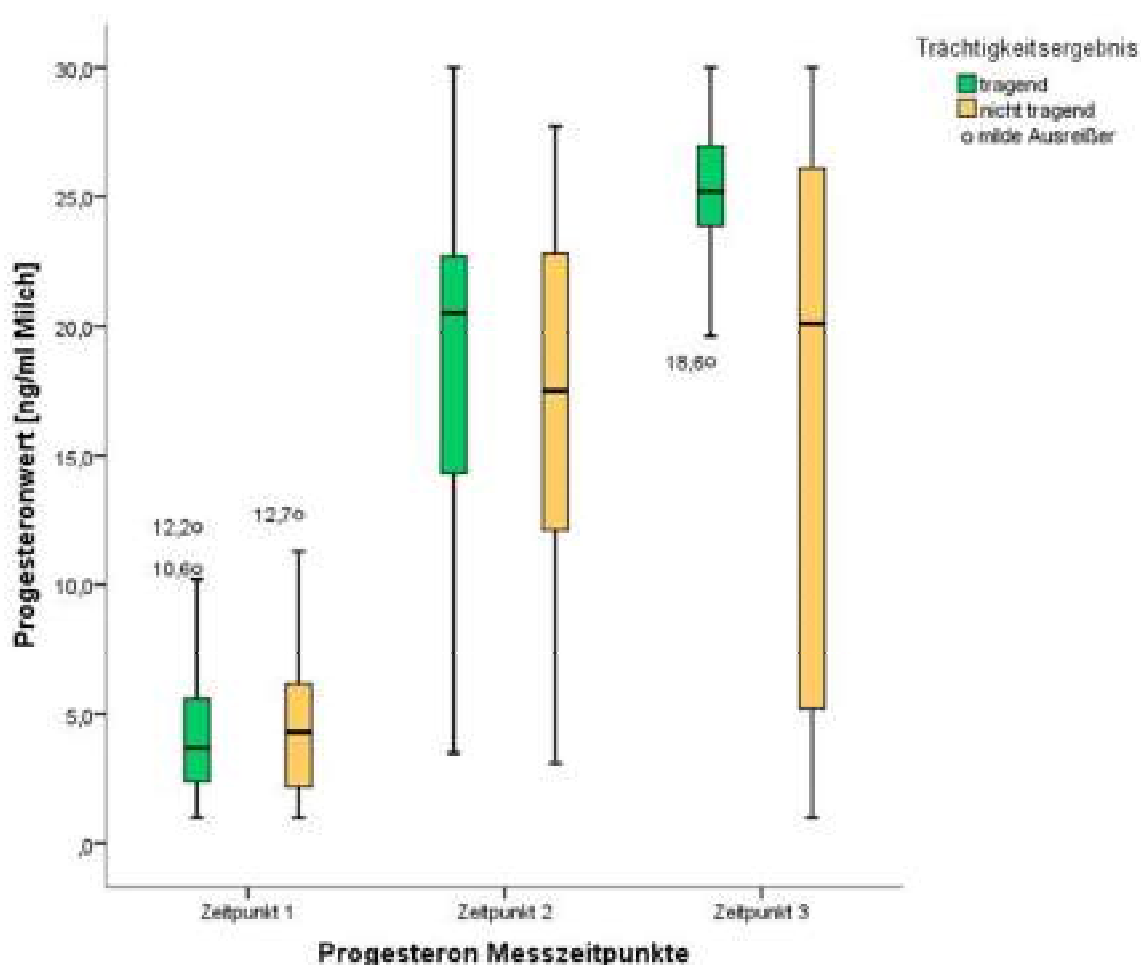


Abbildung 10: Boxplots für die einzelnen Messzeitpunkte mit Unterscheidung zwischen tragend gewordenen und nicht tragend gewordenen Versuchstieren

Anschließend wurden die einzelnen Laktationsgruppen miteinander verglichen. Wie bereits in Tabelle 7 dargestellt, umfassten nach Einteilung der Versuchstiere in Laktationsgruppen die LG1 43 Tiere, die LG2 19 Tiere und die LG3 21 Tiere. Der Vergleich wurde mit der Gegenüberstellung der Zykluslängen (ZL) begonnen. Zwischen den ZL der einzelnen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Wie in Tabelle 12 erkennbar, liegen die Medianwerte der Zykluslänge in allen drei Laktationsgruppen bei 23 Tagen.

Tabelle 12: Übersicht zu den Zykluslängen der einzelnen Laktationsgruppen (N = Anzahl der Tiere, MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, KI (95 %) = 95 %iges Konfidenzintervall, Min = Minimum, Max = Maximum, ZL = Zykluslänge, LG = Laktationsgruppe, d = Tage)

	N	MW \pm σ	SF	KI (95 %)	Median (25.-; 75. Perzentil)	Min	Max
ZL (LG1) [d]	27	22,85 \pm 1,834	0,353	22,13-23,58	23,00 (21,00; 25,00)	19	26
ZL (LG2) [d]	12	22,92 \pm 1,730	0,499	21,82-24,02	23,00 (21,00; 24,50)	21	26
ZL (LG3) [d]	19	22,89 \pm 1,487	0,341	22,18-23,61	23,00 (21,00; 24,00)	21	25

Des Weiteren wurden die einzelnen Messzeitpunkte für P4 sowohl innerhalb der Gruppen, als auch die Laktationsgruppen untereinander unterschieden und zwischen „tragend“ und „nicht tragend“ verglichen. Mittels KRUSKAL-WALLIS-Test konnte sowohl zum Zeitpunkt 2 als auch für den Zeitpunkt 3 ein signifikanter Unterschied in den gemessenen Milchprogesteronwerten zwischen den Laktationsgruppen nachgewiesen werden (ZP2: $p=0,015$ bzw. ZP3: $p=0,002$).

Um herauszufinden, an welcher Stelle die signifikanten Unterschiede lagen, wurde der U-Test nach MANN und WHITNEY durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt. Signifikanzen sind mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Es ist erkennbar, dass sowohl zum ZP2 als auch zum ZP3 bei den später für „tragend“ befundeten Tieren ein altersabhängiger Unterschied, erkenntlich über die Einteilung der drei Laktationsgruppen, besteht. Die jüngste Tiergruppe (LG1) hat zum ZP2 einen P4 von 22,0 (18,25; 23,5) ng/ml Milch, wohingegen die LG2 und die LG3 niedrigere P4-Werte im Median aufweisen (16,5 (13,525; 21,375) ng/ml Milch bzw. 18,1 (12,0; 22,0) ng/ml Milch). Auch zum ZP3 ist dieser altersabhängige Unterschied in der Progesteronkonzentration erkennbar.

Tabelle 13: Laktationsgruppenvergleich der Milchprogesteronwerte innerhalb der drei Messzeitpunkte, in Unterscheidung zwischen Zyklen mit dem Ergebnis „tragend“ bzw. „nicht tragend“ aus der Trächtigkeitsuntersuchung (TU + oder TU -) (P4 = Progesteron, N = Anzahl der Tiere, ZP = Zeitpunkt, LG = Laktationsgruppe)

		TU +		TU -	
		P4 Median in ng/ml Milch (25. -, 75. Perzentil)	N	P4 Median in ng/ml Milch (25. -, 75. Perzentil)	N
ZP1	LG1	3,7 (2,5; 6,2)	41/43	4,5 (3,65; 5,9)	17/19
	LG2	4,1 (2,1; 3,0)	17/19	4,45 (3,0; 6,6)	10/11
	LG3	3,5 (2,5; 4,8)	19/21	2,3 (1,2; 6,35)	13/13
ZP2	LG1	22,0 (18,25; 23,5) *	38/43	20,1 (17,2; 23,3) **	16/19
	LG2	16,5 (13,525; 21,375)	16/19	16,4 (9,9; 24,6)	11/11
	LG3	18,1 (12,0; 22,0)*	19/21	9,45 (6,65; 16,85)	8/13
ZP3	LG1	26,25 (24,275; 27,950) ***	42/43	23,05 (5,45; 27,05)	18/19
	LG2	24,7 (22,2; 28,025)	16/19	23,85 (16,025; 24,425) *	10/11
	LG3	23,9 (21,95; 25,5) ***	21/21	9,95 (3,75; 20,125)	10/13

Zur Erläuterung der Signifikanzen in Tabelle 13: * ZP2 zwischen LG1 (TU +) und LG2 (TU +): asymptotische Signifikanz $p=0,013$ ($N = 54$); ZP2 zwischen LG1 (TU +) und LG3 (TU +): asymptotische Signifikanz $p=0,03$ ($N = 57$), ZP2 zwischen LG3 (TU +) und LG3 (TU -): exakte Signifikanz $p=0,033$ ($N = 27$); ZP3 zwischen LG2 (TU -) und LG3 (TU -): exakte Signifikanz $p=0,023$ ($N = 20$); ** ZP2 zwischen LG1 (TU -) und LG3 (TU -): exakte Signifikanz $p=0,003$ ($N = 24$); *** ZP3 zwischen LG1 (TU +) und LG1 (TU -): asymptotische Signifikanz $p<0,001$ ($N = 60$); ZP3 zwischen LG1 (TU +) und LG3 (TU +): asymptotische Signifikanz $p<0,001$ ($N = 63$); ZP3 zwischen LG3 (TU +) und LG3 (TU -): asymptotische Signifikanz $p<0,001$ ($N = 31$)

Ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Laktationsgruppen in der Anzahl der Besamungen bis zum Trächtigkeitserfolg gab, wurde mit dem Chi²-Test überprüft. Der Test ergab, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem notwendigen Besamungsaufwand innerhalb der Laktationsgruppen gab ($p=0,931$). Das heißt, die Tiere hatten eine gleich hohe Wahrscheinlichkeit tragend zu werden, ungeachtet der Zuordnung zur Laktationsgruppe, welche repräsentativ für verschiedene Altersklassen steht. In Abbildung 11 ist der prozentuale Anteil der trächtig gewordenen Tiere innerhalb ihrer Laktationsgruppenzuordnung und in Abhängigkeit, wie viele Besamungen ab dem Versuchsbeginn notwendig waren, abgetragen.

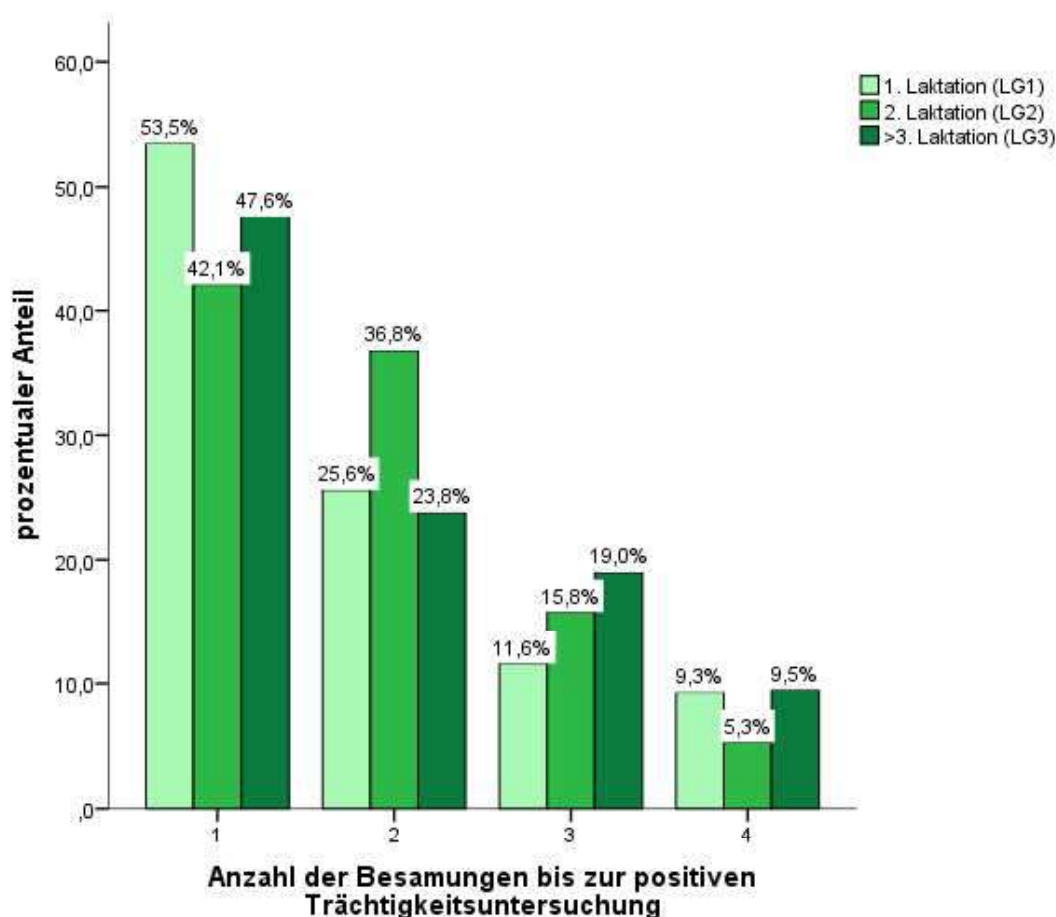


Abbildung 11: Anteil der trächtig gewordenen Versuchstiere innerhalb der einzelnen Laktationsgruppen (N (LG1) = 43, N (LG2) = 19, N (LG3) = 21) in Abhängigkeit der Anzahl an Besamungen nach Versuchsbeginn

Um den Milchmengenabfall im Rahmen der Brunst bzw. Brunstdiagnostik statistisch zu untersuchen, wurde eine *one-way repeated measures* ANOVA durchgeführt. Die Daten zur Milchmenge stammen bei den Kontrolltieren vom Zeitpunkt der ersten Brunst, die bei Aufnahme in den Versuch vorlag. Bei den Versuchstieren wurden diese zu jedem mit Progesteronmessungen begleiteten Besamungszyklus erhoben. Die Milchmengen, die für diese Untersuchung zur Verfügung standen, waren die Gesamtgemelke von zwei bzw. einem Tag vor der Brunst, dem Tag der Brunst und einem bzw. zwei Tagen nach der Brunst.

Nach der statistischen Anpassung des Signifikanzniveaus bei multipler Testung durch die Anwendung der Korrektur nach BONFERRONI wurde zwischen zwei Tagen vor der Brunst und dem Tag der Brunst eine Signifikanz von $p=0,032$ nachgewiesen. Zwischen dem Tag der Brunst und zwei Tagen nach der Brunst wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Milchmengen von $p=0,039$ festgestellt. Das bedeutet bei der Betrachtung der Tage rund um den Brunstzeitraum, dass die Milchmenge im Versuch

einen statistisch signifikanten Abfall zum Zeitpunkt der Hauptbrunst erfährt. Zwischen den anderen Tagen lag im Vergleich untereinander keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$) vor. Tabelle 14 zeigt eine Übersicht der Mittelwerte der Milchmengen zu den entsprechenden Tagen, die beschriebenen Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet.

Tabelle 14: Deskriptive Statistik zu den Milchmengen (MM) im Versuch 1 zwischen zwei Tagen vor bis zwei Tagen nach der künstlichen Besamung (MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, KI (95 %) = 95 %iges Konfidenzintervall, SF = Standardfehler, N = Anzahl der Proben, l = Liter)

	MW $\pm\sigma$	KI (95 %)	SF	N
MM 2 d vor der KB [l]	36,70 \pm 8,98 *	35,41 – 38,00	0,657	187
MM 1 d vor der KB [l]	36,13 \pm 9,37	34,77 – 37,48	0,686	187
MM Tag der KB [l]	35,89 \pm 9,00 *	34,60 – 37,19	0,658	187
MM 1 d nach der KB [l]	36,20 \pm 8,90	34,92 – 37,49	0,651	187
MM 2 d nach der KB [l]	36,63 \pm 9,14	35,31 – 37,95	0,668	187

Nach Ende des Versuchszeitraumes wurden die Fruchtbarkeitskennzahlen erneut erhoben. Der Besamungsindex (BI) für die Färsen betrug 1,7 und der BI für die Kühe 2,2, die Zwischentragezeit 141 Tage und die Zwischenkalbezeit 419 Tage. Die NRR 56 lag bei 57,3 % und die NRR 90 bei 48,1 %. Die Abgangsrate wegen Unfruchtbarkeit lag zu Versuchsende bei rund 30 %.

4.3 Ergebnisse zur Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch-gynäkologischer Befunde (Versuch 2)

Jedes Tier aus dem zweiten Versuch (N=18) wurde über einen Brunstzyklus mit Milchprogesteronmessungen begleitet. Lediglich 9 von 18 Tieren (50 %) wurden aus der zu Beginn der Messreihe durchgeführten Besamung tragend. Die Kühe befanden sich zwischen der ersten und sechsten Laktation. Acht Tiere gehörten zur LG1, ein Tier zur LG2 und neun Tiere konnten in die LG3 eingeordnet werden. Tabelle 15 stellt die Ergebnisse der deskriptiven Statistik dar.

Das Erstkalbealter lag, wie bei den Tieren aus dem Hauptversuch, im Median bei 26 Monaten (25.-, 75. Perzentil: 25 Monate, 27 Monate). Die durchschnittliche freiwillige Wartezeit dieser Versuchstiere betrug 69,00 \pm 27,39 Tage, die mittlere Verzögerungszeit 70,11 \pm 63,38 und die Zwischentragezeit 139,11 \pm 73,23 Tage.

Tabelle 15: Deskriptive Statistik aus Versuch 2 zur Zwischentragezeit (ZTZ), Wartezeit (WZ), Verzögerungszeit (VZ), und Erstkalbealter (EKA) (N = Anzahl der Tiere, MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, SF = Standardfehler, KI (95 %) = 95 %iges Konfidenzintervall, Min = Minimum, Max = Maximum, d = Tage, m = Monate)

	N	MW \pm σ	SF	KI (95 %)	Median (25. -; 75. Perzentil)	Min	Max
WZ [d]	9	69,00 \pm 27,395	9,132	47,94 – 90,06	55,00 (50,00; 95,50)	42	119
VZ [d]	9	70,11 \pm 63,383	21,128	21,39 – 118,83	58,00 (0; 122,50)	0	167
ZTZ [d]	9	139,11 \pm 73,232	24,411	82,82 – 195,40	119,00 (77,50; 191,50)	49	271
EKA [m]	18	26,22 \pm 1,665	0,392	25,39 – 27,05	26,00 (25,00; 27,00)	24	30

Zunächst wurde, angelehnt an den Hauptversuch, auch im Versuch 2 eine Testverifizierung durchgeführt. Hier sollte ebenfalls, mit kleiner Tierzahl und ohne Aufteilung in „tragend“ und „nicht tragend“, geprüft werden, ob zwischen den Messzeitpunkten Unterschiede bestehen bzw. ob diese auch durch das Testgerät erkannt werden. Mit dem statistischen Test nach FRIEDMAN konnte eine Signifikanz von $p < 0,001$ zwischen den Messzeitpunkten ermittelt werden, was bedeutet, dass Unterschiede zwischen ZP1, ZP2 und ZP3 vorlagen. Unter Anwendung des WILCOXON-Test und der BONFERRONI-Korrektur wurden im Anschluss die Messzeitpunkte paarweise miteinander verglichen, um zu schauen, zwischen welchen ZP die Unterschiede bestehen. Das nach BONFERONI korrigierte Signifikanzniveau für diese statistische Analyse lag bei $p < 0,017$. Zwischen ZP1 und ZP2 lag eine Signifikanz von $p < 0,001$ vor. Zwischen ZP1 und ZP3 ist der Unterschied $p = 0,001$, und damit signifikant. Lediglich zwischen ZP2 und ZP3 lag keine Signifikanz nach dem angepassten Signifikanzniveau vor ($p = 0,022$).

Nach Herstellerangaben liegt bei einem Milchprogesteronwert von ≤ 3 ng/ml Milch eine optimale besamungswürdige Brunst, die mit einer Ovulation einhergeht, vor. Diese Beurteilung der „optimalen Brunst“ wurde mit den Befunden der rektalen und vaginalen Untersuchung sowie der Beurteilung des äußeren Genitals unter Zuhilfenahme von Kreuztabellen verglichen. In Tabelle 16 ist die absolute Tierzahl, welche die Beurteilung „in Brunst befindlich“ zum Zeitpunkt eins und zur Umrinderkontrolle (UK, 21 Tage nach der KB) erhalten hat, dargestellt. Zusätzlich wurde für die Einschätzung der Aussagekraft des Milchprogesteronwertes, den das vorliegende Testgerät anzeigte, die prozentuale Übereinstimmung zwischen den Tieren, die mit der entsprechenden Methode (RU, VU, ÄG Beurteilung) ebenfalls die Bewertung „in Brunst befindlich“ erhalten hatten, überprüft.

Tabelle 16: Absolute Anzahl (N) der Beurteilungen „in Brunst befindlich“ sowie prozentuale Übereinstimmung dieser Einschätzung zwischen Milchprogesteronbeurteilung (Milch P4) und rektaler Untersuchung (RU), vaginale Untersuchung (VU) und dem äußeren Genital (ÄG) im Versuch 2 (N (KB) = Anzahl der tatsächlich besamten Tiere, ZP1 = Zeitpunkt 1, UK = Umrinderkontrolle)

	N („in Brunst befindlich“)				N (KB)	Übereinstimmung mit der Progesteronbeurteilung		
	Milch P4	RU	VU	ÄG		RU	VU	ÄG
ZP1	16	14	17	10	18	87,5 %	93,8 %	56,3 %
UK	3	4	6	6	6	100 %	100 %	66,7 %

Um auch in Versuch 2 den Milchmengenabfall im brunstnahen Zeitraum beurteilen zu können, wurde wie in Versuch 1 eine *one-way repeated measures* ANOVA mit anschließender Korrektur des Signifikanzniveaus nach BONFERRONI durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die deskriptive Statistik zu den Milchmengen aus Versuch 2 ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Deskriptive Statistik zu den Milchmengen (MM) im Versuch 2 zwischen zwei Tagen vor bis zwei Tagen nach der künstlichen Besamung (MW = Mittelwert, σ = Standardabweichung, KI (95 %) = 95 %iges Konfidenzintervall, SF = Standardfehler, N = Anzahl der Proben, l = Liter)

	MW $\pm\sigma$	KI (95 %)	SF	N
MM 2 d vor der KB [l]	32,92 \pm 7,40	29,24 – 36,60	1,7442	18
MM 1 d vor der KB [l]	31,63 \pm 6,77	28,26 – 35,00	1,5965	18
MM Tag der KB [l]	32,57 \pm 6,87	29,15 – 36,00	1,6202	18
MM 1 d nach der KB [l]	32,08 \pm 6,73	28,73 – 35,42	1,5856	18
MM 2 d nach der KB [l]	32,45 \pm 6,57	29,18 – 35,71	1,5485	18

5 Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

Unter Feldbedingungen sollte über die Anwendung der Milchprogesteronmessung mittels einem für Landwirte und Tierärzte konzipierten Testsystem (Hormonost® Farmertest der Firma Biolab GmbH) der im Versuchsbetrieb gewählte Besamungstag kontrolliert, beurteilt und gegebenenfalls modifiziert werden. Ziel des Feldversuches war es, die Fruchtbarkeitsleistung der Tiere des Versuchsbetriebes über eine verbesserte Brunstnutzung zu optimieren. Die Kontrolle und damit die Erhebung von für einen Vergleich notwendigen Daten sollte über eine Tiergruppe, welche ohne Progesteronmessung der normalen Brunstbeobachtung und dem entsprechenden Besamungsregime des Betriebes unterlag, erfolgen. Des Weiteren galt es die vom Testhersteller angegebenen Grenzwerte für Progesteron an definierten Zeitpunkten im Zyklus zu überprüfen und auf eventuelle P4-Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit vom Alter bzw. der Laktationszahl zu untersuchen. In einem ergänzenden Versuch sollte die Übereinstimmung in der Brunstbeurteilung zwischen Milchprogesteron und tierärztlicher gynäkologischer Befundung ermittelt werden. Das abschließende Ziel war es, eine Einschätzung der Praxistauglichkeit des angewendeten Testsystems im täglichen Betriebsablauf abzugeben.

5.2 Kritische Betrachtung der Methoden

5.2.1 Auswahl des Betriebes und der Tiere

Um für die Versuchsreihe innerhalb von acht Monaten einen ausreichend großen auswertbaren Datensatz zu erhalten und eine regelmäßige Testdurchführung im Sinne der Praktikabilitätsbeurteilung vorweisen zu können, wurde ein Betrieb gewählt, der mindestens 500 melkende Kühe umfasste. Des Weiteren sollte der Versuchsbetrieb keine Beeinflussung der Tiere und der Messergebnisse durch assistierte Reproduktion oder hormonelle Programme aufweisen. Der Tierbestand der für die Studie ausgewählten Milchviehanlage verfügt über eine gute Grundversorgung im Sinne der Fütterung, der Stall- und Melkhygiene sowie der tierärztlichen Betreuung. Die ordnungsgemäße tierärztliche Überwachung der Nachgeburtsphase, die entsprechende Dokumentation sowie die Einleitung von Behandlungen sind entscheidend für eine gute Herdenfruchtbarkeit (ARNSTADT 2006). Dementsprechend erfolgte die Vorauswahl der Versuchs- und Kontrolltiere (siehe 3.1.2), welche in den Versuch aufgenommen wurden und welche nicht. Kühe mit postpartalen Störungen wie Nachgeburtsverhaltung, gestörter Uterus- und Zervixinvolution, ovariellen Anomalien, unzureichendem BCS und klinischen Erkrankungen haben eine reduzierte fertile Leistung und wurden von Anfang an

nicht in die Studie integriert (FONSECA et al. 1983, WILTBANK et al. 2002, GÜMEN et al. 2003, AUNGIER et al. 2012, MERCADANTE et al. 2016). Ebenso wurden Tiere, die niedrige Progesteronspiegel während des gesamten Zyklusverlaufes aufwiesen aus dem Versuch gestrichen, da auch dies einen Hinweis auf eine Fruchtbarkeitsstörung darstellt (DE LA SOTA et al. 1993).

5.2.2 Milch als Analysemedium für Progesteron

Das im Versuch verwendete Progesteron-Messsystem, welches als *on-farm* Testkit konzipiert ist, wurde für den Nachweis von P4 in Milch, welche ein heterogenes Gemisch aus Wasser, Proteinen, Milchzucker und Milchfett darstellt, entwickelt (GÜRTLER und SCHWEIGERT 2005). Da sich Progesteron aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften (siehe 2.2.1) im Milchfett anreichert und mit diesem positiv korreliert, ist der P4-Nachweis in einem kolloidal dispersen Medium, wie Vollmilch, aufgrund einer inhomogenen Verteilung der Fettkügelchen nicht immer einheitlich möglich (GINTHER et al. 1976, WALDMANN et al. 2001). Auch die Entnahme der Probe während des Melkvorgangs, also z. B. ob Vor- oder End- bzw. Nachgemelk verwendet wird, ist entscheidend für den darin enthaltenen Fettanteil (HOFFMANN und HAMBURGER 1973). Prinzipiell würde der Progesteronnachweis aus homogenen Medien, wie die reine Milchfettfraktion, Magermilch oder Blutplasma genauere Messergebnisse liefern, allerdings wären der Aufwand für der Vorbereitung der Proben und die anschließende Messung um ein Vielfaches höher.

Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften und der damit einhergehenden Assoziation von Progesteron zum Milchfett hat die Temperatur der gewonnenen Probe zum P4-Nachweis großen Einfluss auf die Hormonlöslichkeit. Mit steigender Umgebungstemperatur können stets höhere Progesteronkonzentrationen gemessen werden (EISSA et al. 1995).

Um die Milchproben im Versuch einheitlich analysieren und interpretieren zu können wurde stets Endgemelk verwendet. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bis zur Analyse im Kühlschrank. Erst zur direkten Messvorbereitung wurden die Milchproben aus der Kühlung entnommen, sechs Mal geschwenkt und für ca. fünf Minuten auf Raumtemperatur (20-25°C) erwärmt sowie im Anschluss mit dem Testgerät analysiert. Die wiederholte Messung einer Probe und entsprechende Mittelwertbildung bzw. kritisches Hinterfragen des Wertes könnte gerade bei fraglichen Ergebnissen aufgrund der gegebenen Inhomogenität des Nachweismediums in Einzelfällen sinnvoll sein. In der vorliegenden Studie wurde aufgrund der Tatsache, dass nur vereinzelt Messwiederholungen durchgeführt wurden, nur die erste Progesteronbestimmung von jeder Milchprobe mittels Testgerät in die statistische Analyse integriert.

5.2.3 Versuchsplanung

Der durchgeführte **Vorversuch** bezog sich auf die Reproduzierbarkeit des Messergebnisses von ein- und derselben Milchprobe, welches an sechs aufeinanderfolgenden Tagen erneut bestimmt wurde. Es gab weder anhand der abgelesenen Werte noch ausgehend von der statistischen Analyse Hinweise auf eine Verzerrung oder starke Streuung der Ergebnisse. Damit konnte davon ausgegangen werden, dass keine lagerungsbedingte Beeinträchtigung der P4-Konzentration vorliegen würde. Da der eigentliche Sinn der Progesteronmessung im Stall mittels einer zeitnahen Bestimmung des aktuellen P4-Werts eines Tieres und der daraus direkt resultierenden Handlung, wie z. B. der Besamung, besteht, diente diese Versuchsanordnung keiner praktischen Relevanz, sondern lediglich dem Falle einer verspäteten Messung sowie der Verlässlichkeit der ermittelten Werte.

Im **Hauptversuch** (Versuch 1) wurde jeweils am Tag der KB (ZP1), an Tag sechs (ZP2) und am 20. Tag (ZP3) eine Milchprobe auf deren Progesterongehalt untersucht. Die Versuchstiere verblieben dabei bis zum positiven Trächtigkeitsergebnis, jedoch maximal über vier Zyklen, im Versuch. Jeder durchlaufene Zyklus der Tiere wurde als einzelner Zyklus isoliert behandelt, angelehnt an eine Studie von BLAVY et al. (2016). Hier konnte nachgewiesen werden, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Variabilität der P4-Werte zwischen den Kühen bzw. einer einzelnen Kuh und ihren Zyklen gab. Ein ähnlicher Versuchsaufbau zur Ermittlung des optimalen Besamungstages unter Zuhilfenahme der P4-Messung, inklusive der nicht Progesteron-ermittelten Kontrollgruppe wurde in einer Arbeit von McLEOD et al. (1991) gewählt. Allerdings wurde, im Unterschied zur vorliegenden Studie, ausschließlich mit einem optischen Schnelltest für Milchprogesteron zur Überprüfung des gewählten KB-Tages gearbeitet. Die Beobachtung der Tiere erfolgte über drei Zyklen und es wurden zusätzlich Rückstellproben von den Versuchs- und Kontrolltieren gewonnen, welche am Studienende für einen Vergleich mit den visuellen Testergebnissen mittels laborgebundenen EIA auf den P4-Gehalt analysiert wurden. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind vergleichbar mit eigenen Studienergebnissen (McLEOD et al. 1991).

Der **Zeitpunkt eins**, welcher mit dem Tag der Hauptbrunst und der Besamung einherging, wurde, wie bereits beschrieben, ursprünglich mit einer Progesteronkonzentration von ≤ 3 ng/ml Milch definiert. Dieser Wert konnte, weil der P4-Wert innerhalb der Hauptbrunst diese Grenze teilweise nicht unterschritt bzw. die Verhaltensbrunst bereits wieder abgeklungen war, so dass eine KB nach ursprünglicher Versuchsplanung nicht stattgefunden hätte, nur in 37,6 % aller Fälle bzw. in 39 % der später als tragend untersuchten Tiere tatsächlich eingehalten werden. Zu beachten ist weiterhin, dass laut ROELOFS et al. (2006) der Milchprogesteronspiegel bereits $70,7 \pm 16,8$ Stunden vor der Ovulation auf < 2 ng/ml sinken kann und danach wieder anzusteigen beginnt. Damit kann der Progesteronwert einer

einmal täglich gewonnenen Milchprobe, welche Sammelmilch über die Dauer einer Zwischenmelkzeit darstellt, gegebenenfalls zum Zeitpunkt der Entnahme fälschlicherweise als „noch zu hoch“ interpretiert werden, obwohl sich das Tier in einer besamungsfähigen Brunst befindet. Die Progesteronüberwachung eignet sich gut, um den Brunstzeitraum zu definieren, allerdings ist es mit einer einzigen Messung kaum möglich, den genauen Ovulationszeitpunkt auszumachen (ROELOFS et al. 2006). Lediglich über mehrmalige Messungen am Tag der geplanten Besamung könnte dieser Informationsverlust ausgleichen werden. Dies war jedoch nicht Gegenstand der eigenen Untersuchungen.

Neben der Probenentnahme- und Analysefrequenz kann ein erhöhter P4 zum Zeitpunkt der Besamung auch hinweisend für eine noch nicht vollständig stattgefundene Luteolyse, demnach eine verfrühte Besamung oder eine bereits erfolgte Ovulation mit einem produktiven Gelbkörper in Ausbildung und damit eine zu späte Besamung, liefern. Zu diesem Schluss kamen auch BISINOTTO et al. (2010), welche eine reduzierte Fertilität bei Tieren feststellten, die sich in einem terminierten Besamungsprogramm befanden und zu hohe P4-Werte am Tag der KB aufwiesen.

Die zweite P4-Messung in der Versuchsreihe erfolgte sechs Tage nach der Besamung. Mit diesem Messwert, zum **Zeitpunkt zwei**, sollte überprüft werden, ob sich bereits wenige Tage nach der KB ein Unterschied zwischen später tragenden und nicht tragenden Tieren erkennen lässt. Laut ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT (1985) ist an diesem Tag erkennbar, wenn der P4 niedrig ist, ob die Besamung zu früh stattgefunden hat bzw. ob eine hormonelle Störung vorliegt. Außerdem konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Progesterons vier bis sieben Tage nach der Ovulation und der Trächtigkeitsrate bzw. dem embryonalen Überleben nachgewiesen werden (STRONGE et al. 2005, WINDIG et al. 2008, MEIER et al. 2009a).

Mit der letzten Messung innerhalb eines Zyklusgeschehens, zum **Zeitpunkt drei**, wurde der Progesteronwert zum Tag 20 nach der KB ermittelt. Dieser Tag wurde ausgewählt, um im Falle einer nicht erfolgten Konzeption das Umrindern, also den Beginn einer neuen Brunst, zeitnah festzustellen und diese Information an den Versuchsbetrieb weitergeben zu können. Betrug der P4-Wert ≥ 15 ng/ml Milch und es zeigten sich keine Anzeichen einer beginnenden Brunst, so wurde die Trächtigkeitsuntersuchung abgewartet. Mit Hilfe dieser Methode können auch stillbrünstige Tiere, die ohne diese Hormonmessung in der normalen Brunstbeobachtung als erneut rindernde Tiere nicht aufgefallen wären, sofort nachbesamt werden (RAJAMAHENDRAN et al. 1993, ARNSTADT 2006). Das erspart dem Betrieb unnötig entstehende Kosten aufgrund einer verlängerten ZTZ und kann über die Verbesserung der Brunstnutzungsrate somit die Herdfruchtbarkeit insgesamt optimieren. Liegt in dieser Zeit ein Progesteronwert zwischen 3 und 15 ng/ml Milch vor, ist es empfehlenswert beispielsweise an den darauffolgenden Tagen (Tag 21 oder 22 p.i.) die Messung zu wiederholen, um eine neue Brunst erkennen und nutzen zu können. RUIZ et al. (1992) empfehlen, eine

Progesteronanalyse an den Tagen 19, 21 und 23 durchzuführen, wodurch eine bessere Prognose über das Trächtigkeitsergebnis bzw. den Beginn eines neuen Zyklus abgegeben werden kann. In Problemfällen bzw. bei schwierig interpretierbaren Werten bietet sich auch zu diesem Zeitpunkt, ähnlich wie an ZP1, eine Modulation und Anpassung der Probenanalysefrequenz an. Aufgrund entstehender Mehrkosten ist diese Vorgehensweise auf Einzelfälle limitiert.

Auch andere Probenentnahme-Rhythmen, wie drei Mal wöchentlich oder gar eine kontinuierliche, tägliche Messung um den reproduktiven Status jedes Individuums einschätzen zu können bzw. den P4-Verlauf im Zyklus mit entsprechenden Modellen und Vorhersagen zu kombinieren, werden in der Fachliteratur beschrieben (ELDON 1991, LAMMING und DARWASH 1998, FRIGGENS und CHAGUNDA 2005, MEIER et al. 2009a). Allerdings sind die dabei entstehenden Kosten und der entsprechende Nutzen abzuwägen.

Der **zweite Versuch** wurde in Ergänzung zum ersten Versuch durchgeführt und sollte einen Ansatzpunkt für die Übereinstimmung der Interpretation vom ermittelten P4-Wert zum Zeitpunkt der Brunst und den dabei erhobenen tierärztlichen gynäkologischen Befunden liefern. Es wurden eine Beurteilung des äußeren Genitals sowie eine RU und eine VU zum ZP1 und partiell an ZP3 durchgeführt. Das Betriebsmanagement machte es leider nicht möglich, bei allen Tieren zum ZP3 eine VU vorzunehmen.

Da laut ACOSTA et al. (2003) sowie auch BERISHA und SCHAMS (2005) eine gute Durchblutung am Gelbkörper für die adäquate Progesteronproduktion essentiell ist, kann für zukünftige Untersuchungen ergänzend zu den bereits erhobenen gynäkologischen Befunden die Beurteilung der lutealen Funktion mittels Doppler-Sonografie zum ZP3 und der Übereinstimmung mit den ermittelten P4-Werten durchgeführt werden. Allerdings ist auch hierbei Aufwand, Kosten und Nutzen der Untersuchung abzuwägen.

Weitere Faktoren, welche im Rahmen der gesamten Studie nicht genauer untersucht worden sind, können das Trächtigkeitsergebnis ebenso beeinflussen. Dazu gehören subklinische Endometritiden, eine unzureichende Spermaqualität, Fehler im Auftaumanagement und Spermahandling, mangelnde Fähigkeiten des Besamungstechnikers sowie die Überprüfung, ob eine Ovulation tatsächlich stattfand oder es sich um einen anovulatorischen Zyklus handelte (WILTBANK et al. 2002, ROBINSON et al. 2008).

5.2.4 Praktikabilität, Zeit- und Kostenaufwand des Hormonost[®] Farmertests

Das Hormonost[®] Farmertest Testsystem ist für den Progesteronnachweis bei Milchkühen ausgelegt, wobei innerhalb einer Testdurchführung ein bis vier Tiere, wenn beide Kontrollen („Brunst“ und

„trächtig“) mitgeführt werden, bzw. für den geübten Untersucher auch Proben von bis zu sechs Tiere zeitgleich analysiert werden können. Die Dauer der Untersuchung beträgt in Abhängigkeit von der Probenzahl und der Arbeitsroutine der durchzuführenden Schritte 19-23 Minuten, wobei mit ungefähr 15 Minuten Vorbereitungs- und Aufwärmzeit der Reagenzien gerechnet werden muss. Die Reagenzien, die notwendig sind, werden in jedem Testkit mitgeliefert, stehen in ausreichender Menge zur Verfügung und halten sich ca. ein Jahr nach Anbruch. Die Anschaffungskosten für die komplette Ausrüstung, wie sie in 3.2.2.1 dargestellt ist, betragen 853,00 €. Zusätzlich entstehen Kosten für die 100 µl Pipette von rund 12 € und für die dazugehörigen Spitzen rund 14 € pro 1000 Stück. Jedes weitere benötigte 36er Testkit kostet 134,40 €. Somit beträgt der Sachmittelaufwand für eine untersuchte Milchprobe durchschnittlich 3,73 €.

Als Nachteile der genutzten Technik sind die Abhängigkeit von der Arbeitstemperatur, die Schmutzempfindlichkeit des Photometers zu nennen. Außerdem setzt der Test eine gewisse Geschicklichkeit des Testanwenders, um die einzelnen Schritte zu pipettieren, voraus. Da das Photometer <20°C nicht funktionstüchtig ist, ist die Untersuchung vor Ort an einen Raum mit einer Temperatur zwischen 20-25°C gebunden und kann dementsprechend oftmals nur in Büroräumen durchgeführt werden. Um zu vermeiden, dass die empfindliche Sensor- und Lasertechnik durch Stallstaub verschmutzt und dadurch in ihrer Leistung beeinträchtigt wird, empfiehlt sich eine Schutzhülle für das Photometer bzw. nach Abschluss der Messung das Gerät wieder im Koffer zu verstauen, was zusätzlichen zeitlichen Aufwand für die Vor- und Nachbereitung bedeutet. Die Untersuchung benötigt eine durchführende Person, welche für die Pipettier- und Waschschrte die notwendige Sorgfalt und eine gewisse Übung vorweisen kann. Ebenso ist ein manuelles Eintragen der Messergebnisse in den Herdenmanager erforderlich, was abhängig von der gemessenen Probenanzahl mehr oder weniger Zeit in Anspruch nimmt.

Vorteile dieses *on-farm* Messsystems sind eine Nutzer-freundliche Beschreibung der einzelnen Aktionen in der digitalen Anzeige des Photometers sowie, dass die zeitliche Limitierung der Inkubationsschritte durch das Erklängen von Signaltönen dem Untersucher vermittelt wird. Aufgrund der Haltbarkeit der Testreagenzien von einem Jahr ist die Anschaffung des Systems auch für Privathalter bzw. Kleinbetriebe praktikabel. Des Weiteren können sechs Proben parallel mit relativ geringem Zeitaufwand gemessen werden und im Unterschied zu Progesteronschnelltests wird über die genutzte Lasertechnik direkt ein genauer P4-Wert im Display angezeigt. Bei der Nutzung von Schnelltests muss hingegen der Farbumschlag mit dem bloßen Auge abgelesen und beurteilt werden, was abhängig vom verwendeten Testsystem nicht immer einfach ist und vom individuell verschiedenen Farbempfinden des Untersuchers beeinflusst werden kann. Dies führt möglicherweise zur fehlerhaften Interpretation (SOBIRAJ et al. 1989, SOBIRAJ et al. 1995).

Aktuell treten in Kombination mit der automatischen Melktechnik immer häufiger *in-line* Progesteronmesssysteme in Erscheinung, bei denen die Analyse vollautomatisch durchgeführt wird, die Ergebnisse direkt interpretiert und in den Herdenmanager eingepflegt werden können. Für 120 Tiere betragen die Anschaffungskosten eines solchen Systems ca. 40.000 € plus 50 € Testreagenzien pro Tier und Jahr (ØSTERGAARD et al. 2005). Vergleichend dazu ist der Hormonost® Farmertest Progesteronnachweis erheblich kostengünstiger, sowohl in der Anschaffung als auch in der Analyse. Bei der Wahl des geeigneten Progesteronmesssystems gilt es zu beachten, welche Betriebsgröße vorliegt und was für eine P4-Untersuchungsfrequenz angestrebt wird. Gerade für Betriebe, in denen eine kleine Probenzahl pro Tag durchschnittlich anfällt (z. B. unter zwölf Stück, entsprechend zwei Messdurchführungen und rund einer Stunde Analyseaufwand mit Hormonost® Farmertest) bietet sich diese nicht automatisierte Progesteron-Messtechnik an. Für tägliche Reihenuntersuchungen von über 12 Milchproben ist ein solches manuell zu bedienendes Messsystem kaum noch geeignet, vor allem aufgrund des anfallenden Zeitaufwandes und der personellen Betreuung, die während der Durchführung der Analyse notwendig ist (SAINT-DIZIER und CHASTANT-MAILLARD 2012).

5.3 Diskussion der wichtigsten Versuchsergebnisse

5.3.1 Diskussion zur Milchprogesteronmessung in Begleitung zum normalen Betriebsablauf (Versuch 1)

Die **Fruchtbarkeitskennzahlen** im Versuchsbetrieb vor im Vergleich zu nach dem Versuch lassen eine Tendenz zur Verbesserung erkennen. So lag der Besamungsindex zu Beginn bei 1,9 für Färsen bzw. 2,4 für Kühe und bei 1,7 bzw. bei 2,2 nach der Studie. Als erstrebenswertes Ziel ist ein Wert von 1,8-2,0 im Herdenmittel bzw. <1,7 bei Färsen und <1,8 bei Kühen angegeben (MAHLKOW-NERGE et al. 2005, ANON. 2017). Die ZTZ lag im Herdenmittel bei 138 d vor bzw. bei 141 d nach dem Versuchszeitraum und die ZKZ bei 427 d vor bzw. 419 d nach der Studie. Der Richtwert für die Zwischentragezeit liegt bei 85-125 d und somit wird die empfohlene Obergrenze im Versuchsbetrieb mit rund 15 Tagen überschritten (ANON. 2017). Für die ZKZ gibt BOSTEDT (2006) einen Zielwert von 365-400 d an, welcher im Versuchsbetrieb ebenfalls überschritten wird. Zum Studienbeginn lag die NNR 56 bei 50,2 % und die NNR 90 bei 38,4 %. Nach Versuchsende wurde die NNR 56 mit 57,3 % und die NNR 90 mit 48,1 % angegeben. Bei beiden Werten ist also eine positive Entwicklung von 7-10 % zu verzeichnen, auch wenn diese *Non-Return*-Raten noch deutlich unter den empfohlenen Zielwerten von >75 % bzw. >65 % liegen (ANON. 2017). Die Abgangsrate aufgrund von Unfruchtbarkeit hat sich von ursprünglich 32 % auf 30 % nach dem Versuch verbessert, wobei sie die Empfehlung von anzustrebenden <25 % pro Jahr dennoch überschreitet (MAHLKOW-NERGE et al. 2005).

Die erhobenen Kenngrößen belegen, dass für den Betrieb Verbesserungen im reproduktiven Management möglich und notwendig sind, um die Produktion wirtschaftlich noch effizienter zu gestalten. Die genannten Fruchtbarkeitsmerkmale des gesamten Bestandes haben sich über den Versuchszeitraum erkennbar positiv entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Studie, obwohl nur etwa ein Viertel der im Betrieb befindlichen laktierenden Tiere im Versuch integriert war und in den obenstehenden Zahlen sich die gesamte Herde widerspiegelt, den Fruchtbarkeitsstatus positiv beeinflusst hat. Bei 63 % der P4-kontrollierten Versuchstiere wurde aufgrund der Hormonmessung eine Empfehlung zur KB₂ am Folgetag auf die KB₁ ausgesprochen und durchgeführt. Das war voraussichtlich Anlass für eine gezielte Brunstbeobachtung, auch bei nicht in den Versuch integrierten Färsen und Kühen, sowie eine genauer durchgeführte visuelle Kontrolle am Tag nach der KB₁, weil der ursprünglich gewählte Besamungszeitpunkt offenbar zu früh gewählt war. Dies lässt auch die Verbesserung des BI bei den Färsen erklären.

Auch die **Fruchtbarkeitskennzahlen der Versuchs- und der Kontrolltiere** wurden ermittelt und miteinander verglichen. Das durchschnittliche EKA aller in der Studie befindlichen Tiere lag mit 26 Monaten genau im Bereich der für die heutige Milchwirtschaft empfohlenen 24-26 Monate (MAHLKOW-NERGE et al. 2005, ANON. 2017). Die mittlere Zykluslänge mit 23 Tagen befand sich an der oberen Grenze der als regulär angegebenen 21 ± 2 Tage (GRUNERT 1999a). Laut BLAVY et al. (2016) ist eine Zyklusdauer von bis zu 23,7 d nicht als abnormal zu bezeichnen. Ein länger andauernder ovarieller Zyklus kann eine verlängerte luteale Phase, z.B. bedingt durch endometriale Erkrankungen aufgrund postpartaler Komplikationen oder auch eine beispielsweise durch einen LH-Mangel bedingte Ovulationsstörung, als Ursache haben (ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985, BOSTEDT 2006, RANASINGHE et al. 2011, BLAVY et al. 2016). Eine in einem solchen Zyklus gereifte Eizelle kann aufgrund der verzögert stattfindenden Ovulation überaltern und ist damit in ihrer Vitalität negativ beeinträchtigt bzw. nicht mehr befruchtungsfähig (INSKEEP 2004). Des Weiteren wird in der Literatur häufig eine längere ZL bei Tieren höherer Parität aufgrund reduzierter LH-Impulse beschrieben (RUTTER und MANNS 1987, RANASINGHE et al. 2011, BLAVY et al. 2016). In der vorliegenden Studie konnte dieser alters- bzw. paritätsabhängige Unterschied nicht festgestellt werden. Die ermittelte Zykluslänge jeder einzelnen Laktationsgruppe ergab rund 23 Tage.

Die freiwillige Wartezeit betrug sowohl bei den Versuchs- als auch bei den Kontrolltieren 69 Tage, was einheitliche Voraussetzungen der für die Studie gewählten Tiere widerspiegelt. Damit liegt der Betrieb im Optimum der für die Milchwirtschaft empfohlenen WZ-Spanne von 60-85 Tagen (MANSFELD et al. 1999, MAHLKOW-NERGE et al. 2005). Bei der Verzögerungszeit und damit ebenso bei der Zwischentragezeit gab es hingegen größere Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Die VZ

aller Studientiere betrug im Mittel insgesamt 25 Tage, wobei es 11 Tage bei den Versuchs- und 49 Tage bei den Kontrolltieren waren. Daran lässt sich erkennen, dass die Versuchstiere eine deutlich kürzere VZ als die Kontrolltiere aufwiesen. Die Zwischentragezeit lag mit 116 Tagen für alle Studientiere zwischen den empfohlenen 85-125 Tagen (LYIMO et al. 2000, ANON. 2017). Auch hier ergab sich ein Unterschied von 13,5 Tagen zwischen beiden Tiergruppen (109 d VT vs. 122,5 d KT). Da sich während der Studie die Bedingungen in der Brunstbeobachtung und in der angewandten Besamungstechnik der in den Versuch integrierten Tiere nicht verändert haben, kann davon ausgegangen werden, dass der positive Einfluss auf die Fruchtbarkeit seine Ursache in der Anwendung der begleitenden Milchprogesteronmessung hat.

Der über die Kenngrößen ersichtliche **Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrolltieren** konnte auch mittels statistischer Untersuchungen bestätigt werden. Die in der P4-Gruppe befindlichen Tiere wurden signifikant früher tragend als die dem normalen Brunsterkennungs- und Besamungsregime unterliegenden Tiere ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,005$). Der deutlichste Unterschied zwischen den VT und den KT ist im ersten Besamungszyklus ersichtlich. In einer Studie von McLEOD et al. (1991) konnte demonstriert werden, dass in einer P4-kontrollierten Tiergruppe bei nur ca. 1 % der Tiere nicht der korrekte Besamungstag ermittelt werden konnte, im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe, welche ohne zusätzliche Progesteronkontrolle dem herkömmlichen Regime unterlag. Dort wurden bis zu 22 % der Tiere nicht zum optimalen Tag belegt, was den Besamungserfolg innerhalb dieser Gruppe natürlich reduzierte (McLEOD et al. 1991). Weiterhin ist bekannt, dass bei Hochleistungsrindern die Wahrscheinlichkeit in den ersten beiden Brunstzyklen nach Ablauf der Wartezeit unter optimalen Bedingungen tragend zu werden, signifikant höher ist als in späteren Brunsten (STRONGE et al. 2005, FRIGGENS und LABOURIAU 2010). So konnten STRONGE et al. (2005) bis zu 48 % trächtige Tiere bei der Erstbesamung nachweisen und damit den prozentual höchsten Anteil einer erfolgreichen Belegung zur KB₁.

Auch Unterschiede in der Milchleistung oder im Alter bzw. der Parität der Tiere werden im Zusammenhang mit reduzierter Brunstausprägung und -erkennung beschrieben und könnten ursächlich für den unterschiedlichen Trächtigkeitserfolg zwischen VT und KT sein (SANGSRITAVONG et al. 2002, LOPEZ et al. 2004, LÓPEZ-GATIUS et al. 2005). Allerdings gab es in den eigenen Untersuchungen keinen statistisch ermittelten Unterschied zwischen den Milchleistungen (in beiden Gruppen durchschnittlich 37 l/d) und der Laktationszahl (1,9 (VT) vs. 2,1 (KT)) zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren. Des Weiteren werden insuffiziente bzw. verzögerte Ovulationen, basale P4-Werte eine Woche nach der Brunst und verkürzte luteale Phasen sowie auch Unregelmäßigkeiten im Sekretionsprofil von P4 als Gründe genannt, dass Tiere, die trotz einer guten visuellen Verhaltensbrunst

im Anschluss an eine Belegung keinen Trächtigkeitserfolg und somit eine Reduktion der Fertilität zu verzeichnen haben (BULMAN und LAMMING 1978, HOMMEIDA et al. 2004). Solche Kühe wurden, sofern sie zu den P4-überwachten Tieren zählten und zum Beispiel zum ZP2 P4 <3 ng/ml Milch aufwiesen, durch den Versuchsaufbau schnell identifiziert und aus der Studie genommen, wohingegen Kontrolltiere mit diesen Sekretionsanomalien nicht entdeckt und damit nicht aus dem Versuch aussortiert worden sind. Auch das trägt vorraussichtlich als Ursache für den Unterschied zwischen den Besamungserfolgen in der ersten KB bei.

Durch die Progesteronmessung wurden ebenso Tiere mit zu hohen P4-Spiegeln zum ZP1 identifiziert, was auf eine bereits bestehende Trächtigkeit trotz Brunstsymptomatik, unvollständige Luteolyse oder einen zu früh gewählten Besamungstag hindeuten kann (YOSHIDA und NAKAO 2005, BOSTEDT 2006, GHANEM et al. 2006, MARTINS et al. 2011). Auch hier konnte im Verlauf der Studie nur bei den P4-kontrollierten Tieren reagiert werden. Zusätzlich wurde über die hormonelle Kontrolle im Falle einer Stillbrünstigkeit zum ZP3 ein Umrindern der VT im Unterschied zu den KT frühest möglich erkannt. Nach dem somit erfolgten Ausschluss einer Trächtigkeit, fand über die Rückmeldung an den Betrieb die Nachbesamung ohne weiteren Zeitverlust statt (NEBEL et al. 1987, RAJAMAHENDRAN et al. 1993). Somit lässt sich sagen, dass der Anteil an als „brünstig“ erkannter Tiere mittels P4-Überwachung im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich höher liegt und damit die Chancen für eine erfolgreiche Belegung signifikant steigen.

Die im Rahmen der Feldstudie erhobenen Progesteronwerte wurden unter Beachtung der **einzelnen Messzeitpunkte** und später auch nach Besamungszyklen mit dem Ergebnis „trächtig“ bzw. „nicht trächtig“ analysiert. Über die statistische Untersuchung konnte festgestellt werden, dass zwischen den gemessenen Zeitpunkten signifikante Unterschiede vorhanden sind. Das ist die Voraussetzung für die weitere Analyse und Interpretierbarkeit der Ergebnisse und repräsentiert die Funktionalität und Sensibilität des verwendeten Testgerätes ($p < 0,001$). Ausschließlich zwischen ZP2 und ZP3 bei den „nicht trächtig“ befundeten Tieren gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,927$). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass umrindernde Tiere einen anderen Progesteronwert zum ZP3 im Vergleich zum ZP2 aufweisen können als erfolgreich besamte Kühe. Um diesen Unterschied näher zu eruieren, wurde der MANN-WHITNEY-U-Test angewendet und die Versuchstiere nach den TU-Ergebnissen „tragend“ und „nicht tragend“ aufgeteilt. Ausschließlich zum ZP3 unterschieden sich die Milchprogesteronkonzentrationen der beiden Versuchstiergruppen signifikant ($p = 0,002$). Das bedeutet, sowohl zum ZP1, also dem Tag der Besamung als auch sechs Tage nach der Besamung gab es keinen statistischen Unterschied der Progesteronwerte von später trächtigen bzw. nicht trächtigen Tieren, obwohl die Voraussetzungen für die Besamung die gleichen waren. Der vom Testhersteller empfohlene

cut off-Wert für den ZP1 von unter ≤ 3 ng/ml Milch als Definition für die Brunst entspricht der häufig in der Literatur genannten Empfehlung (LAMMING und BULMAN 1976, ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985, PALMER et al. 2010). Allerdings lassen sich auch Werte von ≤ 4 ng/ml bis sogar < 6 ng/ml Milch (ein sogenannter *high-progesterone-oestrus*) finden (FRIGGENS et al. 2008, WINDIG et al. 2008, RANASINGHE et al. 2011). Daraus und ebenso aufgrund der entsprechenden Feldbedingungen, d.h. nicht jedes brünstige Tier hatte die vorgegebene Grenze ≤ 3 ng/ml Milch während der Brunst erreicht, ergab sich die Notwendigkeit, den ursprünglich gewählten Zielwert insofern zu „lockern“, als dass die Definition des optimalen Besamungstages der Tag, an dem die P4-Konzentration am niedrigsten war, aber immer unter 15 ng/ml Milch, gewählt wurde. GHANEM et al. (2006) bestimmten den P4 in Magermilch und setzten als Grenze für den ZP1 $\leq 0,5$ ng/ml Milch. Laut DÖCKE (2001) kann der Magermilch- P4 ungefähr mit einem Faktor 10 multipliziert werden, um ihn mit der Endgemelk-Progesteronkonzentration vergleichbar zu machen. Dies würde einem Grenzwert für ZP1 von 5 ng/ml Endgemelk entsprechen. In der japanischen Studie konnten unter Feldbedingungen nur bei 47 % der Tiere überhaupt ein P4 unter dem gesetzten Grenzwert gemessen werden (GHANEM et al. 2006). Dennoch waren ca. 18,5 % der Tiere, die eine höhere Progesteronkonzentration als 0,5 ng/ml Magermilch aufwiesen, später TU positiv. Im Vergleich zur eigenen Studie konnte bei insgesamt 37,6 % der VT ein $P4 \leq 3$ ng/ml Milch, jedoch bei 69,2 % ein $P4 \leq 5$ ng/ml Milch gemessen werden. Eine erhöhte Progesteronkonzentration zum ZP der Besamung wird häufig in Verbindung mit reduzierter Fruchtbarkeit gebracht (WALDMANN et al. 2001, GHANEM et al. 2006, SHAMSUDDIN et al. 2006). Als Ursache für die sinkende fertile Leistung bei P4-Dominanz zum Zeitpunkt der Besamung werden verschiedene Mechanismen, wie die Änderung des Gebärmutter- und des Eileitertonus als auch gestörter Spermien- bzw. Oozytentransport angegeben (HUNTER 2005). Somit korreliert der Progesteronwert zum Zeitpunkt der Besamung positiv mit der fertilen Leistung des Tieres (DE LA SOTA et al. 1993). Anders als ERB et al. (1976) kamen GHANEM et al. (2006) zu dem Schluss, dass Tiere, die umrindern, in der Regel einen signifikant höheren P4 zum ZP der Besamung aufwiesen. In der vorliegenden Studie konnte dies nicht bestätigt werden. Die P4-Konzentrationen der Versuchstiere lagen im Median bei 3,7 (2,3; 5,8) ng/ml Milch für später tragende bzw. bei 4,3 (2,2; 6,2) ng/ml Milch für später nicht tragende Tiere. Wie in einer Studie von BULMAN und LAMMING (1978) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Progesteronwerten zum ZP1 von später tragenden im Vergleich zu später nicht tragenden Kühen ($p > 0,05$). Zu beachten ist jedoch, dass nicht nur basale Progesteronwerte, sondern auch das Intervall zwischen Besamung und Ovulation entscheidend für den Ausgang der Belegung ist. Wird eine Kuh zu früh besamt, kann die Vitalität des Spermas bereits vor der Befruchtung reduziert sein (BOSTEDT 2006). Findet sie hingegen zu spät statt, bleibt die Konzeption aus oder es liegt eine Überalterung der Eizelle vor und die Überlebensfähigkeit des Embryos ist beeinträchtigt

(MAATJE et al. 1997). Aufgrund dessen ist nicht nur die Erkennung der Brunst, sondern auch der Zeitpunkt der Insemination essentiell und ergebnisbeeinflussend (DRANSFIELD et al. 1998, ROELOFS et al. 2005b, HANSAR et al. 2014). Der optimale Besamungszeitpunkt liegt laut MAATJE et al. (1997) zwischen 5 bis 24 h nach Einsetzen der Hauptbrunst. Die Ovulation findet gegen Ende des Östrus statt. Die Spermien benötigen eine Kapazitationszeit von ungefähr 6 h im weiblichen Genitaltrakt und bleiben zwischen 18-24 h, in seltenen Fällen bis zu 48 h befruchtungsfähig. Die bovine ovulierte Eizelle ist ca. 20 h besamungsfähig (O'CONNOR 1993, GRUNERT 1999a, BOSTEDT 2006). Die Progesteronmessung allein kann aufgrund der Variabilität des Zeitpunktes des Abfalls von P4 die visuelle Brunstbeobachtung nicht ersetzen (ROELOFS et al. 2006). Eine einmalig am Tag durchgeführte Messung der Hormonkonzentration kann jedoch eine Hilfestellung zur Festsetzung des korrekten Besamungszeitpunktes liefern. Die Chancen, das Ende des P4-Abfalls genau zu ermitteln, steigen, wenn die Probenentnahme- und Analysefrequenz gesteigert werden würde oder über die Nutzung von *in-line* Systemen die zeitliche Verzögerung reduziert werden kann (ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985, ASMUSSEN 2010).

Der Anstieg von Progesteron nach der Besamung ist Grundvoraussetzung für die Steuerung der oviduktalen und der endometrialen Funktion sowie für die Ernährung der Fruchtanlage und den Erhalt einer Trächtigkeit (ROBINSON et al. 2008). Tiere mit einem frühen postovulatorischen P4-Anstieg haben signifikant bessere Trächtigkeitschancen (MANN und LAMMING 2001, STRONGE et al. 2005, GHANEM et al. 2006). Über einen längeren Zeitraum bestehend bleibend niedrige P4-Konzentrationen können auch repräsentativ für Azyklie, Follikelzysten oder -atresie stehen (NAKAO et al. 1983, ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985). In der vorliegenden Felduntersuchung lagen die P4-Konzentrationen sechs Tage nach der KB (ZP2) bei 20,5 (14,3; 22,8) ng/ml Milch für tragende VT und bei 17,5 (11,6; 22,9) ng/ml Milch für nicht tragende VT. Eine Tendenz ist zwar erkennbar, jedoch gab es statistisch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In der Literatur finden sich sowohl Studien, die deutliche Unterschiede zu diesem Zeitpunkt aufzeigen (ERB et al. 1976, FONSECA et al. 1983, LAMMING et al. 1989, MANN und LAMMING 2001, PARR et al. 2012) als auch Studien, die ebenso keine statistisch nachweisbare Differenz zwischen den P4-Spiegeln später tragender und nicht tragender Tiere herausfanden (BULMAN und LAMMING 1978, SREENAN und DISKIN 1983, McNEILL et al. 2006, GORZECKA et al. 2011, PACHE et al. 2011). Der vom Testhersteller angegebene optimale Wert zum ZP2 liegt bei ≥ 15 ng/ml Milchprogesteron. Von den später für tragend befundeten Tieren lagen jedoch rund 30 % unter diesem Wert. McNEIL et al. (2006) geben hierfür einen Wert von 13,2 ng/ml Milchprogesteron und HOMMEIDA et al. (2004) den P4-Spiegel von ≥ 1 ng je ml Magermilch (entsprechend rund 10 ng/ml Endgemelk) als Konzentration für ein optimales embryonales Überleben zum ZP2 an. Eine Senkung des Schwellenwertes zum ZP2 von

≥ 15 ng/ml auf ≥ 10 ng/ml führt dazu, dass 88 % aller Versuchstiere bzw. 93,2 % der später tragenden VT sich in diesem Bereich befanden. Der Testhersteller des Hormonost[®] Farmertests sollte angesichts dieser Werte in Erwägung ziehen, die vorgeschlagene Korrektur in seine Testanleitung zu übernehmen. Zu niedrige P4-Werte zum Zeitpunkt sechs Tage post inseminationem können hinweisend auf Sekretionsstörungen durch luteale Insuffizienz, frühembryonalem Fruchttod oder Zysten sein (NAKAO et al. 1983, ARNSTADT und FISCHER-ARNSTADT 1985, SHELTON et al. 1990, RUIZ et al. 1992, HOMMEIDA et al. 2004, McNEILL et al. 2006).

Die innerhalb eines Besamungszyklusses zum Schluss durchgeführte Milchprogesteronmessung zum ZP3 ergab für die tragenden Tiere der Feldstudie im Median 25,2 (23,8; 27,0) ng/ml Milch bzw. für die später nicht tragenden 20,1 (5,1; 26,2) ng/ml Milch. Hier liegt ein signifikanter Unterschied der P4-Werte vor ($p=0,002$). Der vom Testhersteller empfohlene Wert liegt zum ZP3 bei ≥ 21 ng/ml Milch. In der Studie lagen rund 78 % der Versuchstiere über diesem Wert, wobei 92,4 % der tragenden und 44,7 % der nicht tragenden diese Konzentration erreichten. Korrigiert man diesen Wert bis auf ≥ 25 ng/ml Milch nach oben, um die Aussagefähigkeit für ein Trächtigkeitsergebnis zu verbessern, so hatten ca. die Hälfte der Kühe mit einem positiven und ein Viertel der Tiere mit einem später negativen TU-Ergebnis Progesteronkonzentrationen über dieser P4-Konzentration. Somit steigt zwar die Chance, dass ein Tier über diesem neuen P4-Wert Grenzwert potentiell tragend ist, aber die Eignung dieses Tests für eine frühe Trächtigkeitsdiagnose bereits 20 Tage nach der Besamung ist nicht zulässig. Zahlreiche Studien ermitteln einen signifikanten Unterschied der P4-Konzentration zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren zu diesem ZP (LAMMING und BULMAN 1976, BULMAN und LAMMING 1978, RAJAMAHENDRAN et al. 1993, MANN und LAMMING 2001, HOMMEIDA et al. 2004). Jedoch lässt der Anblick der Progesteronwerte erkennen, dass die Aussage „tragend“ nicht zuverlässig getroffen werden kann. Ebenso wenig kann über die Höhe des P4-Gehalt ermittelt werden, ob es sich im Falle einer Gravidität um eine Einlings- oder Zwillingsträchtigkeit handelt (SZELÉNYI et al. 2015). Die Anwesenheit von Progesteron zum ZP3 trifft keine Aussage über den Zustand des Uterus, sondern lässt ausschließlich den Rückschluss zu, dass ein P4-produzierendes CL vorhanden sein muss (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE 1999, OPSOMER et al. 2000). Für eine sichere Trächtigkeitsdiagnose kann aus diesem Grund auf eine tierärztliche Untersuchung nicht verzichtet werden. Um den physiologisch länger werdenden Zyklen (durchschnittlich rund 23 d), einer verlängerten Gelbkörperphase mit hohen P4-Werten zum ZP3 bzw. ein Umrindern sicher auszuschließen oder auch die vermeintliche Trächtigkeitsdiagnose zu untermauern, wird eine erneute Probenanalyse an Tag 23 oder 24 nach der KB empfohlen (WALDMANN und RAUD 2016).

Obwohl sich die P4-Werte zum ZP1 und ZP2 zwischen später als „tragend“ oder „nicht tragend“ diagnostizierten Tieren nicht signifikant unterschieden, das Besamungsregime gleich war und dennoch

rund 45 % der später nicht tragenden Tiere eine Progesteronkonzentration von ≥ 21 ng/ml Milch zum ZP3 aufwiesen, muss es Gründe für eine spätere Nichtträchtigkeit geben. Neben irregulären P4-Sekretionsprofilen kommen auch weitere Ursachen für diesen Sachverhalt in Frage (ERB et al. 1976). VAN DER WEIJDEN und TAVERNE (1999) gaben vier Möglichkeiten für einen erhöhten P4-Wert zum ZP3 ohne dabei bestehende intakte Gravidität an. Sowohl eine Fruchtresorption um den 15. Trächtigkeitstag als auch eine Gravidität, die kurz nach dem ZP3 mit einem Fruchttod abgebrochen wird, kann zu einer hohen Progesteronkonzentration zum 20. Tag nach der Besamung (ZP3) führen.

Ebenso werden eine verzögerte CL-Rückbildung und ein abnormal kurzer ovarieller Zyklus, der bereits mit einem neu gebildeten CL den P4-Spiegel hochhält, genannt (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE 1999). Die Ursachen für den frühen Verlust der Gravidität sind mannigfaltig (SANTOS et al. 2004). HOMMEIDA et al. (2004), BOLLWEIN et al. (2012) und COOLS et al. (2014) fanden in ihren Arbeiten heraus, dass eine verzögerte Gelbkörperanbildung mit reduzierter Angiogenese und somit eine nur langsam ansteigende Progesteronsynthese zu einer Asynchronität zwischen Uterus und Embryo führen kann. Damit kommt es zu einer Dezimierung der Trächtigkeitsrate aufgrund gestörter IFN γ -Produktion und reduzierter Hemmung auf die endometrialen Oxytocinrezeptoren (LAMMING et al. 1989, MANN et al. 1999, HOMMEIDA et al. 2004, ROBINSON et al. 2006, BOLLWEIN et al. 2012, COOLS et al. 2014).

Auch zu niedrige P4-Spiegel im vorangegangenen Diöstrus, damit ausbleibendes P4-*Priming*, reduzierte endometriale Dicke sowie veränderte Drüsenfunktion erhöhen das Risiko reduzierter Trächtigkeitsaussichten bzw. eines vorzeitigen Graviditätsverlustes (MORRIS und DISKIN 2008, SOUZA et al. 2011). Bis zu 56 % der Tiere in Hochleistungsherden erleiden einen embryonalen oder fetalen Fruchttod (DISKIN et al. 2011). Der frühembryonale Verlust bezieht sich definitionsgemäß auf die Trächtigkeitsabgänge, die zwischen der Zeit der Befruchtung und der Beendigung der Differenzierung, d.h. ca. bis Tag 45 nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle auftreten (Committee on Bovine Reproductive Nomenclature 1972). Diese Kühe werden bei einer manuell palpatorisch durchgeführten Trächtigkeitsuntersuchung, die, wie in der durchgeführten Studie, in der Regel oft erst ab dem 42. Tag nach der Besamung durchgeführt wird, nicht entdeckt bzw. als ursprünglich trächtig angesprochen. Das wiederum lässt den Rückschluss zu, dass die Tiere, die im Versuch zum ZP3 einen hohen P4 aufwiesen, womöglich tragend waren, aber ein vorzeitiger Fruchttod bzw. ein Abgang der Frucht vorlag. Mit Hilfe der Ultraschalldiagnostik, die bereits ab dem 28. Trächtigkeitstag in der Lage ist, einen Embryo nachzuweisen, hätte das initiale Ergebnis der Untersuchung bei diesen Tieren anders gelaute (VAN DER WEIJDEN und TAVERNE 1999). MORRIS und DISKIN (2008) fassten zusammen, dass der Anteil der embryonalen Mortalität an reduzierter Fertilität bis zu 60 % betragen kann. Über die Hälfte der Fruchtabgänge findet dabei

zwischen Tag 28 und Tag 42 statt, wobei Kühe häufiger betroffen sind als Färsen (7,2 % vs. 6,1 %) (SARTORI et al. 2002, SILKE et al. 2002, INSKEEP 2004, MORRIS und DISKIN 2008, DISKIN et al. 2011). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein hoher prä- bzw. postovulatorischer P4-Spiegel einen positiven Effekt auf die Trächtigkeitsrate haben kann (BISINOTTO et al. 2010, BISINOTTO et al. 2013, WILTBANK et al. 2014). Basierend auf diesem Wissen wurden sowohl Versuche zur Supplementierung von P4 vor bzw. nach der KB durchgeführt (KYLE et al. 1992, MANN et al. 1995, LYNCH et al. 1999, MANN und LAMMING 1999, SANGSRITAVONG et al. 2002, MORRIS und DISKIN 2008, KHORAMIAN et al. 2011, WILTBANK et al. 2014). Dabei wurden verschiedene Applikationstage und -formen wie z.B. Injektionen von GnRH-Analoga, humanes Chorion-Gonadotropin (hCG) oder Progesteron, Implantate und vaginale Spiralen oder Schwämmchen genutzt. Die Mehrheit der Studien konnte einen positiven Effekt auf die Fertilität nachweisen, wobei keine einheitliche Empfehlung, welche Form der Anwendung bzw. welcher Zeitpunkt der Applikation gewählt werden soll, aufzufinden ist. Die Progesteron-Supplementierung kann in der frühen Trächtigkeit positiv unterstützend sein, allerdings stellt sie kein generelles Lösungsmittel für das Vorbeugen des embryonalen Fruchttods dar (WILTBANK et al. 2012).

Daraus lässt sich zusammenfassen, dass die Aussage „nicht trächtig“ nur bei Vorhandensein niedriger P4-Werte, in der vorliegenden Studie alle Werte $<18,6$ ng/ml und die Beurteilung „in Brunst befindlich“ bei einer Konzentration von ≤ 3 ng/ml Milch eindeutig getroffen werden kann. Zur Nutzung der verschiedenen Messzeitpunkte im Rahmen dieser Feldstudie lässt sich sagen, weder zum ZP1 noch zum ZP2 kann ein eindeutiger Rückschluss auf ein später positives oder negatives Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung gezogen werden, lediglich eine Tendenz ist erkennbar. Am ZP3 kann nur ein sicher nicht tragendes Tier, welches umrindert, über den Test identifiziert und damit zeitnah einer Nachbesamung zugeführt werden.

Im durchgeführten **Laktationsgruppenvergleich** konnte in der vorliegenden Studie genau wie bei ROELOFS et al. (2006) zum ZP1 kein signifikanter Unterschied zwischen den Laktationsgruppen im Progesterongehalt, weder bei den später für tragend noch bei den später für nicht tragend befundeten Tieren, ermittelt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass im Rahmen dieses Versuches die Parität keinen Einfluss auf den Progesterongehalt zum Zeitpunkt der Brunst hatte. In der Fachliteratur hingegen wird oft über den Einfluss von Alter und Leistung auf die Östrussympomatik und Ausprägung der Duldungsbereitschaft diskutiert, wobei die Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (RAJAMAHENDRAN und TAYLOR 1990, AT-TARAS und SPAHR 2001, LÓPEZ-GATIUS et al. 2005, PERALTA et al. 2005, ROELOFS et al. 2005a, ROELOFS et al. 2006, RANASINGHE et al. 2011). So konnten RAJAMAHENDRAN und TAYLOR (1990), AT-TARAS et al. (2001) und

PERALTA et al. (2005) beispielsweise keine signifikanten Unterschiede in der Brunstsymptomatik, der Östrus- und Zyklusdauer sowie innerhalb der Plasma-P4-Spiegel zur Brunst nachweisen. LOPEZ-GATIUS et al. (2005) und DOLECHECK et al. (2015) zeigten in ihren Arbeiten, dass mit zunehmender Parität aufgrund von Steroidhormonverschiebungen die Brunstausprägung und die Bewegungssteigerung im Östrus um bis zu 21 % pro geborenem Kalb abnehmen kann und somit die Wahrscheinlichkeit der Brunsterkennung bei multiparen Tieren sinkt. Auch die höhere Milchleistung multiparer Tiere und die längere Zeit der puerperalen Uterus- und Zervixinvolution nehmen Einfluss auf die Brunsterkennung bzw. die Chancen für eine erfolgreiche Besamung (MENGE et al. 1962, FONSECA et al. 1983, WATHES et al. 2007b).

In der vorliegenden Felduntersuchung konnten ab dem ZP2 deutliche Unterschiede in der Hormonkonzentration zwischen den einzelnen Laktationsgruppen festgestellt werden. So lag der Median des P4-Wertes der LG1 mit 22,0 ng/ml Milch signifikant höher als der von der LG2 und LG3 (16,5 ng/ml Milch bzw. 18,1 ng/ml Milch) ($p=0,013$ bzw. $p=0,03$). Bestätigt und erklärt werden konnte dieses Ergebnis mit Hilfe einer Studie von COOLS et al. (2014). Diese Arbeitsgruppe fand heraus, dass primipare Kühe in der frühen Lutealphase größere CL-Volumina aufweisen und dies mit einem höheren peripheren P4-Spiegel assoziiert ist (COOLS et al. 2014). Zum ZP3 bestand dieser Unterschied weiterhin. So hatten Kühe der LG1, die später als tragend befundet wurden, einen P4 von 26,3 ng/ml Milch im Median im Vergleich zu 24,7 ng/ml Milch der LG2 und 23,9 ng/ml Milch der LG3, zu Letzterem unterschied sich der Wert der LG1 signifikant ($p<0,001$). Die gemittelte Tagesleistung dieser Kühe betrug in der LG1 rund 31,5 l/d und unterschied sich damit im Vergleich zu 42,1 l/d bzw. zu 44,3 l/d der LG2 und LG3 signifikant ($p<0,05$). Im Allgemeinen gilt, dass das Körperwachstum von Kühen ab der zweiten Laktation als abgeschlossen anzusehen ist, aber die Fähigkeit zur Milchproduktion bis zur vierten Laktation weiterhin ansteigt (COFFEY et al. 2006). HOMMEIDA et al. (2004), MEIKLE et al. (2004) und WOLFENSON et al. (2004) konnten in ihren Arbeiten bestätigen, dass Tiere ab der zweiten Laktation signifikant niedrigere P4-Konzentrationen und deutlich höhere produzierte Tagesmilchmengen aufwiesen. In der Blütezeit des Gelbkörpers liegt ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen der lutealen Masse und dem peripheren P4-Spiegel vor. So ist die luteale Masse bei multiparen Hochleistungsrindern in der Zyklusmitte deutlich höher als bei Färsen und primiparen Tieren, aber der Progesterongehalt signifikant niedriger (LOPEZ et al. 2004, SARTORI et al. 2004). Die Syntheserate per se scheint allerdings nicht in Abhängigkeit zur Parität zu variieren. Vielmehr werden der erhöhte Leberblutfluss und damit der gesteigerte Metabolismus der Steroidhormone aufgrund hoher Milchproduktion und dementsprechend notwendiger erhöhter DMI ursächlich für diese hormonellen Divergenzen genannt (VANDEHAAR et al. 1995, SANGSRITAVONG et al. 2002, VASCONCELOS et al. 2003). Auch die dadurch notwendig

verlängerte Aufenthaltsdauer am Futtertisch führt zu reduzierten Kontaktaufnahme zu anderen sexuell aktiven Tieren, wodurch eine vorher bereits schwächer ausgeprägte Brunst aufgrund reduziertem P4-*Priming* vor der Brunst sowie niedrigeren Estradiolspiegeln während des Östrus zusätzlich nicht potenziert wird (ALLRICH 1994, HOLMAN et al. 2011). Daraus ergibt sich, dass durch den gesteigerten Progesteron-Metabolismus bei Tieren höherer Parität der frühe Progesteronanstieg nach der Ovulation, welcher essentiell für das Überleben des Embryos ist, reduziert abläuft. Dies beeinträchtigt die Fertilität bzw. senkt die Trächtigkeitschancen, führt zu erhöhten Vorkommen anovulatorischer Zyklen bzw. einer vermehrten Rate an Doppelovulationen (SANGSRITAVONG et al. 2002, SARTORI et al. 2004). Nach RANASINGHE et al. (2011) bestehen für Tiere höherer Parität reduzierte Erfolgsaussichten auf eine positive Belegung. Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht bestätigt. Es konnte kein signifikanter Unterschied, ob eine der Laktationsgruppen früher tragend wurde als die andere, ermittelt werden.

Der in der Studie untersuchte **Milchmengenabfall** zum Zeitpunkt der Brunst stellte sich zwei Tage vor und zwei Tage nach der Brunst im Vergleich zum Tag der Besamung als statistisch signifikant dar ($p=0,032$ bzw. $p=0,039$). Die durchschnittlich produzierten Tagesmilchmengen an diesen Tagen lagen bei $36,7\pm 8,98$ l/d, $35,98\pm 9,00$ l/d und $36,63\pm 9,14$ l/d. Andere Studien konnten diesen Abfall nur bei bis zu einem Drittel der Tiere feststellen (SAUMANDE 1981, SCHOFIELD et al. 1991, WANGLER et al. 2005). Nach KING (1977) kommt es zu einer Leistungsreduktion von 2-6 %. In der vorliegenden Studie sind zwischen zwei Tagen vor der Brunst und dem Besamungstag ca. 2,2 % Abfall der Milchmenge vorhanden, was der Definition von KING (1977) knapp entspricht. Auch SCHOFIELD et al. (1991) kamen zu dem Schluss, dass es zwar eine Reduktion der gewonnenen Milchmenge im Brunstzeitraum gibt, diese aber nur bedingt zur Brunstdetektion genutzt werden sollte. Auch wenn im vorliegenden Versuch rein rechnerisch eine statistische Signifikanz vorlag, kann eine Schwankung von weniger als einem Liter Milch der Tagesleistung nicht als praxisrelevantes Brunsterkennungsmerkmal herangezogen werden.

5.3.2 Diskussion zur Milchprogesteronmessung in Kombination mit der Erhebung klinisch-gynäkologischer Befunde (Versuch 2)

Ebenso wie in Versuch eins wurden auch im zweiten Teilversuch die **Fruchtbarkeitsdaten** der 18 Tiere erhoben. Das EKA betrug im Median in dieser Tiergruppe ebenfalls 26 Monate. Die WZ lag durchschnittlich auch wie im Hauptversuch bei 69 Tagen. Damit sind auch für diese Versuchstiere die empfohlenen Werte für EKA und WZ vorzufinden (MANSFELD et al. 1999, MAHLKOW-NERGE et al. 2005). Weitere Kenngrößen wie die VZ und ZTZ lagen mit durchschnittlich rund 70 Tagen bzw.

rund 139 Tagen über den empfohlenen <30 d für Kühe bzw. 85-125 d (LYIMO et al. 2000, ANON. 2017). Damit lässt sich für diesen Teilbestand gleichermaßen der Rückschluss ziehen, dass Verbesserungspotential in der Fruchtbarkeit bestand. Die Verifizierung des Testgerätes, ob ein Unterschied zwischen den ermittelten Progesteronwerten der verschiedenen Zeitpunkte vorlag, wurde gleichermaßen wiederholt. Es konnte damit das Ergebnis aus Versuch eins reproduziert werden. Im FRIEDMANN-Test ergab sich eine Signifikanz von $p < 0,001$. Da von den 18 Versuchstieren nur 9 Tiere innerhalb eines Besamungszyklusses tragend wurden, lässt es sich erklären, dass sich zwischen den Progesteronwerten von ZP2 auf ZP3 kein signifikanter, sondern nur ein tendenzieller Unterschied im WILCOXON-Test ergab.

Die Übereinstimmung zwischen dem Progesterontestsystem und den gynäkologischen Untersuchungsbefunden wurde über Kreuztabellen ermittelt. Dabei galt auch hier die vom Hersteller empfohlene Beurteilung „in Brunst befindlich“ bei einer P4-Konzentration von ≤ 3 ng/ml Milch. Zwischen der rektalen Uterus- und Ovarbefundung (RU) und der Hormonmessung stimmte die Diagnose „Brunst“ in 87,5 % der Fälle überein, ähnlich wie bei PACHE et al. (2011). Sie fanden in ihrer Arbeit eine Übereinstimmung von 85,4 %. Bei der vaginoskopischen Untersuchung (VU) gab es bei 93,8 % die übereinstimmende Diagnose „Brunst“, wohingegen im Falle der Beurteilung des äußeren Genitals (ÄG) nur 56,3 % Übereinstimmung vorlagen.

Zur Umrinderkontrolle, 21 Tage p.i., ist zwischen der Interpretation der Progesteronmessung mittels Testgerät und der RU sowie der VU 100 % bzw. zu der Beurteilung des ÄG eine Übereinstimmung von 66,7 % zu verzeichnen. Die niedrigere Übereinstimmungsrate kann auf reduzierte Estradiolspiegel bei den laktierenden Kühen zurück zu führen sein. Der erhöhte Steroidmetabolismus der Leber aufgrund einer gesteigerten Blutflussrate und vermehrter Trockenmasseaufnahme führen zu einer geringeren Östrusausprägung sowie verminderten Labialschwellung und Rötung (CUMMING et al. 1971, WOLFENSON et al. 2004, VANHOLDER et al. 2005, WILTBANK et al. 2006). In Folge dessen ist die Brunsterkennung über die Betrachtung der Scham zwar eine Hilfe bei der Brunstbeobachtung aber als alleiniges Merkmal jedoch ungeeignet. Die vaginoskopische wie auch die rektale Untersuchung sind dahingehend deutlich besser geeignet und als probates Mittel zur Beurteilung des bovinen Reproduktionstraktes und der Brunsterkennung etabliert (ROELOFS et al. 2004, BOSTEDT 2006, ROELOFS et al. 2010). Dabei sollte auf einen erhöhten Uteruston, palpierbare bzw. ultrasonografisch darstellbare Graafsche Follikel von mind. $14,7 \pm 3,3$ mm Größe sowie die Öffnung der Zervix und das Vorhandensein von Brunstschleim geachtet werden (BONAFOS et al. 1995, LÓPEZ-GATIUS et al. 1997, GRUNERT 1999b, GÜMEN et al. 2003, HANSAR et al. 2014). Die gemeinsame Interpretation von RU, VU und P4-Messung zum ZP3 ergab jeweils 100 %, da alle drei Tiere, welche über die Progesteronkontrolle als „in Brunst befindlich“ angesprochen wurden, auch über die anderen beiden

Untersuchungen als solche identifiziert wurden. Allerdings konnten über die rektale Untersuchung eine weitere und über die vaginale Befundung drei weitere Kühe ermittelt werden, welche einer Besamung zugeführt wurden. Durch eine Korrektur des P4-Grenzwertes von ≤ 3 ng/ml auf ≤ 5 ng/ml, wie bereits zum Hauptversuch, wären zum ZP1 17 statt 16 Tiere und in der UK fünf Tiere als „brünstig“ mittels Testgerät identifiziert und zur Besamung vorgestellt worden. Wiederum ist zu bemerken, dass alle Kühe, die über die Progesteronmessung als „in Brunst befindlich“ beurteilt wurden, ebenso über mindestens eine der gynäkologischen Untersuchungen gleichermaßen bewertet und somit besamt worden wären. Häufig wird in der Literatur ersichtlich, dass die P4-Konzentrationsermittlung parallel zur Charakterisierung oder auch Verfeinerung anderer Brunstüberwachungsmethoden, wie beispielsweise in Kombination mit der Pedometertechnik, genutzt wird (PETER und BOSU 1986, RAJAMAHENDRAN und TAYLOR 1990, GÜMEN et al. 2003, ROELOFS et al. 2006, MORTON und WYNN 2010).

Was im Rahmen dieses kurzen Versuches nicht mittels Sonografie überprüft wurde, ist, ob eine Ovulation stattfand oder ob es sich um einen anovulatorischen Zyklus handelte. Des Weiteren wurden keine Vermessungen bzw. eine Dopplersonografie der Gelbkörper durchgeführt. Das wäre als Erweiterung des Versuches zwei denkbar, da bekannt ist, dass die luteale Größe bzw. die Durchblutung maßgeblich für die produktive Leistungsfähigkeit des Gelbkörpers steht (NISWENDER et al. 2000, WILTBANK et al. 2002, ACOSTA et al. 2003, BERISHA und SCHAMS 2005, ROBINSON et al. 2006, LÜTTGENAU et al. 2011, BOLLWEIN et al. 2012). Auf diese Weise könnte eine Korrelation zwischen dem ermittelten P4-Wert des Testgeräts und der aktuellen ovariellen Situation ermittelt werden.

Die dennoch **niedrigen Trächtigkeitsraten** (nur neun von 18 Tieren wurden innerhalb des Versuchszeitraumes tragend) im Rahmen dieses Versuchs lassen sich nicht über die P4-Messung bzw. die Befunde aus den gynäkologischen Untersuchungen erklären. Weitere Faktoren, wie zum Beispiel systemische Erkrankungen, postpartale Komplikationen und hochgradige Lahmheiten, die negativen Einfluss auf die fertile Leistung haben könnten, waren über Vorauswahl auszuschließen. Vielmehr scheint hier die Außentemperatur während des Versuchs eine entscheidende Rolle gespielt zu haben. Im Tagesmittel betrugen die Temperaturen 28-32°C. Sogenannter Hitzestress, welcher beim Rind ab einer konstanten Stalltemperatur von >20°C am Tag definiert ist, wirkt sich negativ auf die Fertilität aus (AL-KATANANI et al. 1999, GARCÍA-ISPIERTO et al. 2007, BROWN et al. 2016, MONTEIRO et al. 2016). Eine Versuchsdurchführung in den Wintermonaten hätte, bezogen auf den Trächtigkeitserfolg, vorraussichtlich einen anderen Ausgang genommen.

Abschließend kann aufgrund hoher prozentualer Übereinstimmung zwischen der Brunstbeurteilung durch RU, VU und der P4-Mesung in diesem Teilversuch gesagt werden, dass sich die

Progesteronmessung ebenso gut zur Östrusdetektion wie die genannten gynäkologischen Befunderhebungen eignet. Für den Landwirt stellt die Hormonmessung somit ein praktisches Hilfsmittel dar, welches neben der hohen Treffersicherheit auch gut anwendbar ist, ohne dass jedes Tier einzeln vom Tierarzt für die Diagnose „Brunst“ untersucht werden muss. Dies bleibt auf unklare Einzelfälle beschränkt.

5.4 Schlussfolgerung

Der Einsatz des Hormonost® Farmertests ist in einem wirtschaftlich arbeitenden Milchviehbetrieb parallel zur konventionellen Brunstbeobachtung gut geeignet, um „Besamungsfehler“, die durch die Wahl eines suboptimalen Besamungstages entstehen, zu reduzieren. Ebenso können Tiere, die umrindern, durch die Progesteronmessung am Tag 20 nach vorangegangener KB sehr gut identifiziert und frühest möglich nachbesamt werden. Dies trifft im Speziellen vor allen auf stillbrünstige Kühe zu, welche aufgrund einer reduzierten Verhaltensbrunst im normalen Betriebsablauf unter visueller Brunstbeobachtung nicht aufgefallen wären. Diese genannten Fakten können dazu beitragen, die Fruchtbarkeitskennzahlen, wie Verzögerungs- und Wartezeit sowie die damit in Zusammenhang stehende Brunstnutzungsrate und den Besamungsindex zu verbessern.

Ebenso kann die fruchtbarkeitsbedingte Abgangsrate, unter die gleichermaßen auch solche Tiere fallen, die ausschließlich aufgrund unzureichender Brunstbeobachtung den Betrieb verlassen müssen, reduziert werden.

Die Übereinstimmung der Milchprogesteronmessung mit den gynäkologischen Befunden im Brunstzeitraum, speziell mit der vaginalen und rektalen Untersuchung war zufriedenstellend und konnte somit die P4-Ermittlung als geeignetes Hilfsmittel zur Brunstüberwachung bestätigen.

Im Laktationsgruppenvergleich konnte gezeigt und statistisch bestätigt werden, dass gerade ältere multipare Tiere zu einer reduzierten lutealen Leistung neigen. Diese kann unter Zuhilfenahme der P4-Messung zeitnah identifiziert werden, so dass gegebenenfalls individuelle Maßnahmen zur Intervention frühzeitig eingeleitet werden können.

Die Durchführung der Hormonbestimmung unter Anwendung des Hormonost® Farmertest-Systems ist nach etwas Übung gut umzusetzen und lässt sich als *on-farm* Test vor Ort durchführen. Aufgrund der einfachen nichtinvasiven Probenentnahme von Milch ist diese Form der Überwachung für Landwirte und ebenso für Tierärzte geeignet. Mit einer durchschnittlichen Untersuchungszeit von rund 20 Minuten nach entsprechender Vorbereitung und einem Kostenaufwand von 3,73 € pro Messung ist ein guter Kompromiss zwischen Aufwand und Nutzen für einen Milchviehbetrieb gegeben. Die präzise Darstellung des Progesterongehalts im Photometer sowie die entsprechenden Hinweise zur Interpretation sind als Vorteil der Methode zu nennen. Allerdings eignet sich der verwendete Test

aufgrund der manuellen Durchführung sowie des dafür notwendigen Zeitaufwandes nur beschränkt für umfangreiche Reihenuntersuchungen, da maximal 6 Proben innerhalb eines Untersuchungszyklusses angesetzt werden können.

Vom Testhersteller werden hierfür andere Systeme, wie z.B. der Jumbo-Test, mit dem bis zu 36 Proben gleichzeitig analysiert werden können angeboten.

Der Grenzwert von ≤ 3 ng/ml Milch ist ein zunächst gut gewählter Wert. Dabei gilt es allerdings, die Brunstsymptomatik bzw. den tierindividuellen Progesteronverlauf im Zyklusgeschehen zu beachten, da nicht jede besamungswürdige Kuh diesen Wert erreicht. Die Korrektur des Grenzwertes für „Brunst“ auf ≤ 5 ng/ml Milch scheint besser geeignet und ist empfehlenswert. Weder zum ZP1 noch zum ZP2 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen später tragenden bzw. nicht tragenden Tieren in der Progesteronkonzentration nachgewiesen werden. Zum ZP3 waren bei einem P4-Wert ≥ 25 ng/ml Milch nur 25 % Prozent der Tiere später als „nicht trächtig“ untersucht worden. Bei einem Progesteronwert von $< 18,6$ ng/ml Milch wies keines der Versuchstiere ein positives Trächtigkeitsergebnis auf.

Neben der Brunstbeobachtung und der Umrinderkontrolle ist es für den Betriebsalltag vorstellbar und empfehlenswert, diese Progesteronanalysemethode bei Kühen zur Überwachung der Wiederkehr in ein normales Zyklusgeschehen nach der Kalbung und/oder für die tierärztliche Therapieeinleitung bei Fruchtbarkeitsgestörten Kühen anzuwenden.

6 Zusammenfassung

Adriana J. Wöckel

Feldstudien zur Beurteilung und Optimierung des gewählten Besamungstages bei Kühen unter Zuhilfenahme eines quantitativen Milchprogesteron-Schnelltests

Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im April 2017

92 Seiten, 11 Abbildungen, 17 Tabellen, 314 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Rind, Progesteron, Brunsterkennung, Milchprogesteron-Schnelltest, Praxistauglichkeit

Einleitung

Zur modernen ökonomischen Milchviehwirtschaft gehören Langlebigkeit, Gesundheit und eine gute reproduktive Leistung der Kühe. Ein effektives Brunstbeobachtungs- und Besamungsmanagement stellt dabei einen essentiellen Bestandteil dar. Aufgrund der intensiven Zucht, welche hauptsächlich auf Hochleistung der Tiere ausgelegt wird, kommt es immer mehr zur Verkürzung der Östrusdauer und Reduktion der Symptomatik, was die Detektion und Nutzung der Brunst deutlich erschwert. Es begründet sich somit die Notwendigkeit, neben der visuellen Brunstbeobachtung weitere Methoden, wie die Progesteronmessung, zu nutzen, um eine möglichst effiziente Überwachung umsetzen zu können.

Ziele der Untersuchung

In einem Hauptversuch sollte unter Anwendung des Hormonost® Farmertest der Firma Biolab GmbH (München) zur Milchprogesteronmessung der gewählte Besamungstag kontrolliert bzw. moduliert werden. Die erhobenen Fruchtbarkeitskennzahlen nach dem Versuch sollten mit den Ergebnissen bei Kontrolltieren, welche keine begleitende Progesteronmessung erfahren hatten, verglichen werden. Zusätzlich wurde der Einfluss der Parität und der Milchleistung der Tiere überprüft und in einem Teilversuch die Übereinstimmung der Beurteilung „Brunst“ zwischen dem Progesteronwert und den klinisch-gynäkologischen Befunden erfasst.

Tiere, Material und Methoden

Die Studie umfasste einen Hauptversuch, welcher von April bis Dezember 2014 in einem sächsischen Milchviehbetrieb an 84 Versuchs- und 68 Kontrolltieren der Rasse Holstein Friesian durchgeführt wurde. Dabei wurde an drei vorher festgelegten Zeitpunkten (Tag der Besamung, sechs Tage und 20 Tage später) eine Endgemelksprobe zur Progesteronmessung gewonnen und analysiert. Für den optimalen Tag der Besamung, welcher als Zeitpunkt eins definiert war, wurde der Tag mit der niedrigsten P4-Konzentration gewählt und die weiteren Untersuchungszeitpunkte anhand dessen

festgelegt. Es wurden die Fruchtbarkeitskennzahlen des Betriebes vor und nach dem Versuch und tierbezogene Daten, wie Erstkalbealter, aktuelle Laktationsnummer, die Milchmenge im brunstnahen Zeitraum sowie die Wartezeit und gegebenenfalls wie viele Besamungen bereits vor dem Versuch stattfanden, erhoben und dokumentiert. Die Progesteronanalysen wurden mit dem Hormonost® Farmertest unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Es erfolgte eine direkte Mitteilung der Werte an den Stallleiter und gegebenenfalls die Empfehlung einer weiteren künstlichen Besamung am Folgetag sowie die folgenden Probennahmetermine. In einem Teilversuch erfolgte bei 18 Versuchstieren die Progesteronmessung begleitend zur Erhebung klinisch-gynäkologischer Befunde am Tag der Besamung und 21 Tage später, der Umrinderkontrolle. Die Vorauswahl der Kühe und der Milchprobennahme-Plan entsprachen dem Hauptversuch.

Ergebnisse

Die erhobenen Fruchtbarkeitskennzahlen des Betriebes sowie die der Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren verbesserten sich im Rahmen der Studie. Die Progesteron-kontrollierten Tiere wurden signifikant schneller tragend, wobei an den Messzeitpunkten eins und zwei kein signifikanter Unterschied zwischen später für „tragend“ bzw. „nicht tragend“ befundeten Tieren bestand. Rund zwei Drittel der Versuchstiere wurden aufgrund der P4-Messung ein weiteres Mal besamt. Erst 20 Tage nach der Besamung konnte statistisch ein signifikanter Unterschied zwischen später trächtigen und nicht trächtigen Kühen ermittelt werden. Im Laktationsgruppenvergleich zeichnete sich eine altersabhängige Minimierung der lutealen Leistung anhand niedrigerer P4-Werte ab. Der Milchmengenabfall zur Brunst erwies sich im Hauptversuch als signifikant, allerdings aufgrund der Reduktion von nur einem Liter als nicht praxisrelevant. Im Teilversuch konnte eine gute Übereinstimmung der Brunstbeurteilung zwischen rektaler Untersuchung (87,5-100 %) und vaginaler Untersuchung (93,8-100 %) mit der zugehörigen Milchprogesteronmessung gefunden werden.

Schlussfolgerungen

Die *on-farm* Milchprogesteronmessung mit dem Hormonost® Farmertest lässt sich nach etwas Übung sowohl vom Landwirt als auch vom Tierarzt gut durchführen und kann zu einer Verbesserung der fertilen Leistung, durch die Optimierung des Besamungstages und schnelleres Erkennen von nicht trächtigen Tieren in einem Milchviehbetrieb führen. Die Untersuchungsdauer betrug für bis zu sechs Milchproben rund 20 Minuten nach entsprechender Vorbereitungszeit und kostete ca. 3,73 € pro analysierter Milchprobe zzgl. der Anschaffungskosten für das Testsystem. Jene Tiere, bei denen eine unsichere Brunstdiagnose vorliegt, die eine Stillbrünstigkeit aufweisen oder unter einer lutealen Schwäche leiden, können über den Milchprogesterontest gut identifiziert werden. Die somit gewonnenen Informationen ermöglichen daraufhin, unter Einleitung geeigneter Maßnahmen, eine Verbesserung der Fertilität.

7 Summary

Adriana J. Wöckel

Field trials for the assessment and optimization of the selected insemination day in dairy cows using a quantitative on-farm milk progesterone test

Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in April 2017

92 pages, 11 figures, 17 tables, 314 references

Keywords: dairy cows, progesterone, heat detection, on-farm milk progesterone test, practical capability

Introduction

Longevity, health and a good reproductive performance of cattle is a critical part of the modern economic dairy industry. An essential component is an effective heat monitoring and a good insemination management. Due to intensive breeding, the reduction of heat symptoms and the duration of oestrus is a problem for high-performance animals. As a result, the detection and utilization of the heat is made considerably more difficult. It is therefore necessary to use other methods, such as the progesterone measurement in the milk, in order to implement the most efficient monitoring possible.

Aim of the investigation

In the main experiment, the selected insemination day is controlled or modulated by using the Hormonost® Farmertest from Biolab GmbH (Munich, Germany) for milk progesterone measurement. The fertile performance of the progesterone-controlled animals is compared with control cows, which have not undergone an accompanying measurement. Furthermore, the possible influence of the animal's parity was investigated. In a second experiment the consistency of the assessment "heat" between the progesterone value and the collected gynaecological findings is determined.

Animals, material and methods

The main trial, which was carried out from April to December 2014 in a Saxon dairy farm, included 84 experimental and 68 control Holstein frisian dairy cows. Milk samples for progesterone analysis were collected at three predefined times: the day of insemination, six days, and 20 days later. The optimal time for insemination was the day with the lowest P4 concentration and this point determined further examination times. In addition, fertility statistics of the farm before and after the experiment as well as individual animal-related data like the first calving age or milk yield per day were collected and

evaluated. The progesterone analyses were carried out with the Hormonost® Farmertest under consistent conditions and direct notification of the values to the farmer. If necessary, another artificial insemination on the following day was recommended and the next dates for the sample collection were communicated. In a second experiment, carried out in August 2015, the progesterone measurement was accomplished in 18 test animals, concomitantly with the inquiry of gynaecological findings on the day of insemination and 21 days later. The sampling plan corresponded to that of the main experiment. Animal selection of experimental and control animals was carried out according to established criteria.

Results

The collected fertility statistics of the farm as well as that of the experimental animals compared to the control animals improved during this study. Progesterone-investigated animals got pregnant significantly earlier than the control group. In this process, pregnant animals showed no significant difference in progesterone concentration at point one and two, compared to non-pregnant cows. Due to incongruous P4 values, approximately two-thirds of the test animals were inseminated once again on the following day. Only 20 days after insemination a statistically significant difference between pregnant and non-pregnant cows could be detected. In a lactation group comparison, an age-dependent minimization of the luteal performance was distinguished. During the second investigations, the heat evaluation using milk progesterone measurements was consistent with rectal and vaginal examinations (87.5-100 % and 93.8-100 % respectively).

Conclusions

The on-farm milk progesterone measurement with the Hormonost® Farmertest can easily be carried out by the farmer and for the veterinarian. It can contribute to the improvement of the fertile performance, optimization of the insemination day and a quicker recognition of non-pregnant animals on a dairy farm. After sample preparation, the examination of up to six animals takes 20 minutes and costs 3.73 € per analysed milk sample. Especially animals showing quiet or inconclusive heat symptoms, or which suffer from a luteal weakness can be reliably detected. The obtained information facilitate the introduction of appropriate measures and an improvement of fertility.

8 Literaturverzeichnis

- Acosta T, Hayashi K, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*. 2003;125(5):759–67.
- ADR, Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e.V.: Rinderproduktion in Deutschland 2015, ADR Jahresbericht 2016. 2016:54–5.
- Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci*. 1999;82(12):2611–6.
- Allrich RD. Estrous behavior and detection in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1993;9(2):249–62.
- Allrich RD. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci*. 1994;77(9):2738–44.
- Anon. Definition der Kennziffern der Besamung und Fruchtbarkeit; 2017 (zitiert vom 09.02.2017), http://www.portal-rind.de/besam_fru.htm#treb.
- Arnstadt KI. Zur Fruchtbarkeitsverbesserung in der Milchviehhaltung. 33. Viehwirtschaftliche Fachtagung. 2006 Jun 26-27; Raumberg-Gumpenstein, Österreich.
- Arnstadt KI, Cleere WF. Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *Reproduction*. 1981;62(1):173–80.
- Arnstadt KI, Fischer-Arnstadt AR. Progesteronbestimmung als Hilfsmittel der Brunstkontrolle. *Tierärztl Umsch*. 1985;40(5):391–400.
- Asmussen T. Herd Navigator or "how to benefit from frequent measurements". ICAR 37th Annual Meeting. 2010 May 31-Jun 4; Riga, Lettland; p. 291-293.
- At-Taras EE, Spahr SL. Detection and characterization of estrus in dairy cattle with an electronic heatmount detector and an electronic activity tag. *J Dairy Sci*. 2001;84(4):792–8.
- Aungier SPM, Roche JF, Sheehy M, Crowe MA. Effects of management and health on the use of activity monitoring for estrus detection in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2012;95(5):2452–66.
- Bamberg E. Chemie, Biochemie und Nachweis der Steriodhormone. In: Döcke F, Hrsg. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Nachdr. d. 3. Aufl. 1994; Lehmanns Sonderausgabe. Stuttgart: Enke; 2001. p. 31–9.
- Banu TA, Shamsuddin M, Bhattacharjee J, Islam MF, Khan SI, Ahmed JU. Milk progesterone enzyme-linked immunosorbent assay as a tool to investigate ovarian cyclicity of water buffaloes in relation to body condition score and milk production. *Acta Vet Scand*. 2012;54:30.
- Beal WE, Short RE, Staigmiller RB, Bellows RA, Kaltenbach CC, Dunn TG. Influence of dietary energy intake on bovine pituitary and luteal function. *J Anim Sci*. 1978;46(1):181.
- Becker F, Kanitz W, Heuwieser W. Vor- und Nachteile einzelner Methoden der Brunsterkennung beim Rind. *Züchtungskunde*. 2005;2/3(77):140–50.
- Beever DE, Hattan A, Reynolds CK, Cammell SB. Nutrient supply to high-yielding dairy cows. *BSAS*. 2001;(26):119–31.
- Berchthold M, Rüsch P. Physiologie der Fortpflanzung: Geschlechtsreife, Zuchtreife und Erstkalbealter. In: Grunert E, Berchthold M, Hrsg. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. 3. Aufl. Berlin, Wien: Parey; 1999. p. 1–3.
- Berisha B, Schams D. Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol*. 2005;29(2):305–17.

- Bicalho RC, Galvão KN, Guard CL, Santos JEP. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology*. 2008;70(2):199–207.
- Bikker JP, Laar H van, Rump P, Doorenbos J, Meurs K van, Griffioen GM et al. Technical note: Evaluation of an ear-attached movement sensor to record cow feeding behavior and activity. *J Dairy Sci*. 2014;97(5):2974–9.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Martinez N, Greco LF, Barbosa LFSP et al. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. *J Dairy Sci*. 2013;96(4):2214–25.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Martins LT, Marsola RS, Greco LF, Favoreto MG et al. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J Dairy Sci*. 2010;93(12):5798–808.
- Blache D, Batailler M, Fabre-Nys C. Oestrogen receptors in the preoptico-hypothalamic continuum: Immunohistochemical study of the distribution and cell density during induced oestrous cycle in ovariectomized ewe. *J Neuroendocrinol*. 1994;6(3):329–39.
- Blache D, Celi P, Blackberry MA, Dynes RA, Martin GB. Decrease in voluntary feed intake and pulsatile luteinizing hormone secretion after intracerebroventricular infusion of recombinant bovine leptin in mature male sheep. *Reprod Fertil Dev*. 2000;12(8):373.
- Blavy P, Derks M, Martin O, Höglund JK, Friggens NC. Overview of progesterone profiles in dairy cows. *Theriogenology*. 2016;86(4):1061–71.
- Bollwein H, Lüttgenau J, Herzog K. Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. *Reprod Fertil Dev*. 2012;25(1):71–9.
- Bonafos LD, Kot K, Ginther OJ. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology*. 1995;43(4):713–21.
- Borsberry S. Detecting oestrus in dairy cows. *Vet Rec*. 2011;169(2):45–6.
- Bostedt H. Fruchtbarkeitsmanagement beim Rind. 5. Aufl. Frankfurt am Main: DLG-Verl.; 2006.
- Brown BM, Stallings JW, Clay JS, Rhoads ML. Periconceptional heat stress of holstein dams is associated with differences in daughter milk production during their first lactation. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148234.
- Bulman DC, Lamming GE. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Reproduction*. 1978;54(2):447–58.
- Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*. 2000;60-61:449–57.
- Butler WR. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci*. 2003;83(2–3):211–8.
- Butler WR. Relationships of negative energy balance with fertility. *Adv Dairy Technol*. 2005;17:35–46.
- Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci*. 1996;74(4):858.
- Butler WR, Smith RD. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 1989;72(3):767–83.
- Byszewska-Szpocińska E, Markiewicz A. New RIA kit for the determination of progesterone in cows' milk. *J Immunoassay Immunochem*. 2006;27(3):279–88.

- Cavalieri J, Eagels VE, Ryan M, Macmillan KL. Comparison of four methods for detection of oestrus in dairy cows with resynchronised oestrous cycles. *Australian Vet J.* 2003b;81(7):422–5.
- Cavalieri J, Flinker LR, Anderson GA, Macmillan KL. Characteristics of oestrus measured using visual observation and radiotelemetry. *Anim Reprod Sci.* 2003a;76(1-2):1–12.
- Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR et al. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2007;90(9):4022–32.
- Chanvallon A, Coyral-Castel S, Gatien J, Lamy JM, Ribaud D, Allain C et al. Comparison of three devices for the automated detection of estrus in dairy cows. *Theriogenology.* 2014;82(5):734–41.
- Claus R, Karg H, Zwiauer D, Butler I von, Pirchner F, Rattenberger E. Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk-fat. *Br Vet J.* 1983;139(1):29–37.
- Claycomb RW, Delwiche MJ. Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking. *Biosens Bioelectron.* 1998;13(11):1173–80.
- Coffey MP, Hickey J, Brotherstone S. Genetic aspects of growth of holstein-friesian dairy cows from birth to maturity. *J Dairy Sci.* 2006;89(1):322–9.
- Colazo MG, Ambrose DJ, Kastelic JP, Small JA. Comparison of 2 enzyme immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk. *Can J Vet Res.* 2008;72(1):32–6.
- Comin A, Renaville B, Marchini E, Maiero S, Cairoli F, Prandi A. Technical note: Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk whey. *J Dairy Sci.* 2005;88(12):4239–42.
- Committee on Bovine Reproductive Nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet.* 1972;62(2):216–37.
- Cook DL, Winters TA, Horstman LA, Allrich RD. Influence of cortisol and dexamethasone on estrous behavior of estradiol-treated ovariectomized cows and heifers. *J Dairy Sci.* 1987;70(1):181–5.
- Cools S, Broeck W van den, Bossaert P, Hostens M, Opsomer G. A field study to unravel factors that are significantly associated with the secretory activity of the corpus luteum during the first three postpartum cycles in high yielding dairy cows, based on the amount of steroidogenic and endothelial cells present in the luteal tissue. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(6):881–93.
- Crowe MA. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 5:20–8.
- Cumming I, Mole B, Obst J, Blockey M, Winfield C, Goding JR. Increase in plasma progesterone caused by undernutrition during early pregnancy in the ewe. *Reproduction.* 1971;24(1):146–7.
- Darwash AO, Lamming GE, Woolliams JA. Estimation of genetic variation in the Interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. *J Dairy Sci.* 1997;80(6):1227–34.
- De La Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 1993;76(4):1002–13.
- Dechow CD, Rogers GW, Clay JS. Heritability and correlations among body condition score loss, body condition score, production and reproductive performance. *J Dairy Sci.* 2002;85(11):3062–70.
- Delwiche M, Tang X, BonDurant R, Munro C. Estrus detection with a progesterone biosensor. *Trans ASAE (Am Soc Agric Eng).* 2001;44(6).

- Dhakal K, Tiezzi F, Clay JS, Maltecca C. Inferring causal relationships between reproductive and metabolic health disorders and production traits in first-lactation US Holsteins using recursive models. *J Dairy Sci.* 2015;98(4):2713–26.
- Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;191(1):65–80.
- Diskin MG, Parr MH, Morris DG. Embryo death in cattle: an update. *Reprod Fertil Dev.* 2011;24(1):244–51.
- Diskin MG, Sreenan JM. Expression and detection of oestrus in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2000;40(5):481–91.
- Dobson H, Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:743–52.
- Dobson H, Walker SL, Morris MJ, Routly JE, Smith RF. Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal.* 2008;2(8):1104–11.
- Döcke F. Veterinärmedizinische Endokrinologie. Nachdr. d. 3. Aufl. 1994; Lehmanns Sonderausgabe. Stuttgart: Enke; 2001.
- Dolecheck KA, Silvia WJ, Heersche G, Chang YM, Ray DL, Stone AE et al. Behavioral and physiological changes around estrus events identified using multiple automated monitoring technologies. *J Dairy Sci.* 2015;98(12):8723–31.
- Dransfield MBG, Nebel RL, Pearson RE, Warnick LD. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J Dairy Sci.* 1998;81(7):1874–82.
- Duchens M, Maciel M, Gustafsson H, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H, Edqvist LE. Influence of perioestrous suprabasal progesterone levels on cycle length, oestrous behaviour and ovulation in heifers. *Anim Reprod Sci.* 1995;37(2):95–108.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 1989;72(1):68–78.
- Eerdenburg FJCM van, Loeffler HS, Vliet JH van. Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. *Vet Q.* 1996;18(2):52–4.
- Ehnert K, Moberg GP. Disruption of estrous behavior in ewes by dexamethasone or management-related stress. *J Anim Sci.* 1991;69(7):2988.
- Eissa HM, Nachreiner RF, Refsal KR. Effects of sample handling temperatures on bovine skim milk progesterone concentrations. *Theriogenology.* 1995;43(5):893–8.
- Eldon J. Post-partum and post-conceptional ovarian activity of dairy cows: evaluation based on progesterone profiles. *Acta Vet Scand.* 1991;32(3):377–86.
- Erb RE, Garverick HA, Randel RD, Brown BL, Callahan CJ. Profiles of reproductive hormones associated with fertile and nonfertile inseminations of dairy cows. *Theriogenology.* 1976;5(5):227–42.
- Esslemont R. Measuring dairy herd fertility. *Vet Rec.* 1992;131(10):209–12.
- Ezov N, Maltz E, Yarom R, Lewis GS, Schindler D, Ron M et al. Cell density, fluid volume and electrolyte content of bovine vulvar tissue during oestrus and dioestrus. *Anim Reprod Sci.* 1990;22(4):281–8.
- Fabre-Nys C, Gelez H. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm Behav.* 2007;52(1):18–25.

- Faust MA, McDaniel BT, Robison OW, Britt JH. Environmental and yield effects on reproduction in primiparous holsteins. *J Dairy Sci.* 1988;71(11):3092–9.
- Feldmann F, Aizinbud E, Schindler H, Broda H. The electrical conductivity inside the bovine vaginal wall. *Anim Prod.* 1978;26(01):61–5.
- Firk R, Stamer E, Junge W, Krieter J. Automation of oestrus detection in dairy cows: a review. *Livest Prod Sci.* 2002;75(3):219–32.
- Fonseca FA, Britt JH, McDaniel BT, Wilk JC, Rakes AH. Reproductive traits of holsteins and jersey. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci.* 1983;66(5):1128–47.
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2011;124(3-4):163–9.
- Forster K, Galina CS, Maquivar M, Laan G van der, Arnoni R, Verduzco A. Assessment of the intensity of behavioural traits and ovulation between synchronized and non-synchronized cows. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(6):566–70.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 1994;50(2):225–32.
- Friemel H. Immunologische Arbeitsmethoden. 4. überarb. Aufl. Jena: Fischer; 1991.
- Friggens NC, Berg P, Theilgaard P, Korsgaard IR, Ingvarsen KL, Løvendahl P et al. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: evidence of genetically driven body energy change. *J Dairy Sci.* 2007;90(11):5291–305.
- Friggens NC, Bjerring M, Ridder C, Højsgaard S, Larsen T. Improved detection of reproductive status in dairy cows using milk progesterone measurements. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 2:113–21.
- Friggens NC, Chagunda MGG. Prediction of the reproductive status of cattle on the basis of milk progesterone measures: model description. *Theriogenology.* 2005;64(1):155–90.
- Friggens NC, Labouriau R. Probability of pregnancy as affected by oestrus number and days to first oestrus in dairy cows of three breeds and parities. *Anim Reprod Sci.* 2010;118(2-4):155–62.
- García-Ispuerto I, López-Gatius F, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C et al. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology.* 2007;67(8):1379–85.
- Garmo RT, Ropstad E, Havrevoll Ø, Thuen E, Steinshamn H, Waldmann A et al. Commencement of luteal activity in three different selection lines for milk yield and fertility in Norwegian Red cows. *J Dairy Sci.* 2009;92(5):2159–65.
- Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Reproduction.* 1988;84(2):437–46.
- Gartland P, Schiavo J, Hall CE, Foote RH, Scott NR. Detection of estrus in dairy cows by electrical measurements of vaginal mucus and by milk progesterone. *J Dairy Sci.* 1976;59(5):982–5.
- Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci.* 1992;28(1-4):111–24.
- Ghanem ME, Nakao T, Nakatani K, Akita M, Suzuki T. Milk progesterone profile at and after artificial insemination in repeat-breeding cows: effects on conception rate and embryonic death. *Reprod Domest Anim.* 2006;41(2):180–3.
- Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle: Role of estradiol. *Biol Reprod.* 2000;63(2):383–9.

- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Reproduction*. 1989;87(1):223–30.
- Ginther OJ, Nuti LC, Garcia MC, Wentworth BC, Tyler WJ. Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products. *J Anim Sci*. 1976;42(1):155.
- Gorzecka J, Codrea MC, Friggens NC, Callesen H. Progesterone profiles around the time of insemination do not show clear differences between of pregnant and not pregnant dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2011;123(1-2):14–22.
- Grummer RR, Carroll DJ. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J Anim Sci*. 1988;66(12):3160.
- Grunert E. Physiologie der Fortpflanzung: Sexualzyklus. In: Grunert E; Berchthold M, Hrsg. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. 3. Aufl. Berlin, Wien: Parey; 1999a. p. 3–11.
- Grunert E. Untersuchungsverfahren im Rahmen der Fertilitätskontrolle: Brunsterkennung. In: Grunert E; Berchthold M, Hrsg. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. 3. Aufl. Berlin, Wien: Parey; 1999b. p. 68–76.
- Gümen A, Guenther JN, Wiltbank MC. Follicular size and response to ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 2003;86(10):3184–94.
- Gürtler H, Schweigert FJ. Physiologie der Laktation: Zusammensetzung und Bildung der Milch. In: Engelhardt W von; Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*. 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2005. p. 560–3.
- Gwazdauskas FC, Lineweaver JA, McGilliard ML. Environmental and management factors affecting estrous activity in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 1983;66(7):1510–4.
- Gwynne JT, Strauss JF. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev*. 1982;3(3):299–329.
- Hansar E, Lemma A, Yilma T. Pre-service ultrasonic and manual evaluation of the reproductive organs of dairy cows presumed to be in estrus. *Springerplus*. 2014;3:529.
- Hansel W, Blair RM. Bovine corpus luteum: A historic overview and implications for future research. *Theriogenology*. 1996;45(7):1267–94.
- Heersche G, Nebel RL. Measuring efficiency and accuracy of detection of estrus. *J Dairy Sci*. 1994;77(9):2754–61.
- Heuwieser W. Strategische Anwendungen von Prostaglandin F2 α – Grundlage und Ziele von Prostaglandinprogrammen. *Prakt Tierarzt*. 1994;78:141–9.
- Hoedemaker M, Arnstadt KI, Grunert E. Bestimmung von Progesteron in bovinen Blut- und Milchproben mit Hilfe verschiedener Methoden des Radio-und Enzymimmuntests. *Zentralbl Veterinärmed A*. 1984;31(1-10):105–18.
- Hoedemaker M, Mansfeld R, Kruif A de, Heuwieser W. Ergebnisinterpretation und Strategien - Betrachtung einzelner Kontrollbereiche: Fruchtbarkeit. In: Kruif A de, Mansfeld R, Hoedemaker M, Hrsg. *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2007. p. 30–50.
- Hoffmann B, Hamburger R. Progesteron in der Milch: Radioimmunologische Bestimmung, Beziehungen zur Gelbkörperfunktion und MilCHFettkonzentration. *Reprod Domest Anim*. 1973;8(4):154–62.
- Holman A, Thompson J, Routly JE, Cameron J, Jones DN, Grove-White D et al. Comparison of oestrus detection methods in dairy cattle. *Vet Rec*. 2011;169(2):47.

- Hommeida A, Nakao T, Kubota H. Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. *Theriogenology*. 2004;62(1-2):217–25.
- Hunter RHF. The fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev*. 2005;45(3):281–90.
- Hurnik JF, King GJ, Robertson HA. Estrous and related behaviour in postpartum Holstein cows. *Applied Animal Ethology*. 1975;2(1):55–68.
- Inchaisri C, Jorritsma R, Vos PLAM, Weijden GC van der, Hogeveen H. Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*. 2010;74(5):835–46.
- Inskeep EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci*. 2004;82(E. Suppl.):24–39.
- Jorritsma R, Wensing T, Kruip TAM, Vos PLAM, Noordhuizen JPTM. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet Res*. 2003;34(1):11–26.
- Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology*. 1993;132(1):249–54.
- Juengel JL, Nett TM, Anthony RV, Niswender GD. Effects of luteotrophic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factor I and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. *Reproduction*. 1997;110(2):291–8.
- Kanitz W, Becker F, Dietl G, Reinsch N, Staufenbiel R. Beziehungen zwischen Milchleistung, Energieversorgung und Fruchtbarkeit unter den Bedingungen von Hochleistung beim Rind. *Züchtungskunde*. 2003;75(6):489–98.
- Kerbrat S, Disenhaus C. A proposition for an updated behavioural characterisation of the oestrus period in dairy cows. *Appl Anim Behav Sci*. 2004;87(3-4):223–38.
- Khoramian B, Farzaneh N, Talebkhan Garoussi M, Mohri M. Comparison of the effects of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin or progesterone on pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder dairy cows. *Res Vet Sci*. 2011;90(2):312–5.
- Kiddy CA. Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci*. 1977;60(2):235–43.
- King GJ. The effect of oestrus on milk production in cows. *Vet Rec*. 1977;101(6):107–8.
- King GJ, Hurnik JF, Robertson HA. Ovarian function and estrus in dairy cows during early lactation. *J Anim Sci*. 1976;42(3):688.
- Köhrle J, Petrides PE. Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe: Hormone des Ovars. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Aufl. Heidelberg: Springer; 2007. p. 880–4.
- Kokin E, Praks J, Veermäe I, Poikalainen V, Vallas M. IceTag3D™ accelerometric device in cattle lameness detection. *Agron Res*. 2014;12:223–30.
- Kruif A de. Factors influencing the fertility of a cattle population. *Reproduction*. 1978;54(2):507–18.
- Kruif A de, Mansfeld R, Hoedemaker M. *Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind*. 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2007.
- Kyle SD, Callahan CJ, Allrich RD. Effect of progesterone on the expression of estrus at the first postpartum ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 1992;75(6):1456–60.
- Lamming GE, Bulman DC. The use of milk progesterone radioimmunoassay in the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows. *Br Vet J*. 1976;132(5):507–17.

- Lamming GE, Darwash AO. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 1998;52(3):175–90.
- Lamming GE, Darwash AO, Back HL. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989;37:245–52.
- Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, Bor A, Bruckental I. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2000;64(3-4):181–97.
- Lehrer AR, Lewis GS, Aizinbud E. Oestrus detection in cattle: recent developments. *Anim Reprod Sci.* 1992;28(1-4):355–62.
- Lei ZM. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol Reprod.* 1991;44(6):1148–56.
- Leidl W, Stolla R. Measurement of electric resistance of the vaginal mucus as an aid for heat detection. *Theriogenology.* 1976;6(2-3):237–49.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Soom A van, Bols PEJ et al. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology.* 2004;62(6):1131–43.
- Lewis GS, Newman SK. Changes throughout estrous cycles of variables that might indicate estrus in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1984;67(1):146–52.
- Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology.* 2016;86(1):270–7.
- Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2004;81(3-4):209–23.
- López-Gatius F, Camóon-Urgel J. Confirmation of estrus rates by palpation per rectum of genital organs in normal repeat dairy cows. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 1991;38(1-10):553–6.
- López-Gatius F, Labèrnia J, Santolaria P, Rutllant J, López-Béjar M. The relationship of rheological behavior of the vaginal fluid at the time of insemination to the pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology.* 1997;48(5):865–71.
- López-Gatius F, Santolaria P, Mundet I, Yániz JL. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology.* 2005;63(5):1419–29.
- Lotthammer KH. Umweltbedingte Fruchtbarkeitsstörungen. In: Grunert E; Berchthold M, Hrsg. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind.* 3. Aufl. Berlin, Wien: Parey; 1999. p. 307–27.
- Løvendahl P, Chagunda MGG. On the use of physical activity monitoring for estrus detection in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2010;93(1):249–59.
- Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci.* 2001;84(6):1277–93.
- Lüttgenau J, Ulbrich SE, Beindorff N, Honnens A, Herzog K, Bollwein H. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2011;125(1-4):20–9.
- Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W, Kruip TAM, Eerdenburg FJCM van. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology.* 2000;53(9):1783–95.
- Lynch PR, Macmillan KL, Taufa VK. Treating cattle with progesterone as well as a GnRH analogue affects oestrous cycle length and fertility. *Anim Reprod Sci.* 1999;56(3-4):189–200.

- Maatje K, Loeffler SH, Engel B. Predicting optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. *J Dairy Sci.* 1997;80(6):1098–105.
- Macmillian KL, Lean IJ, Westwood CT. The effects of lactation on the fertility of dairy cows. *Australian Vet J.* 1996;73(4):141–7.
- Macmillian KL, Taufa VK, Barnes DR, Day AM, Henry R. Detecting estrus in synchronized heifers using tailpaint and an aerosol raddle. *Theriogenology.* 1988;30(6):1099–114.
- Mahlkow-Nerge K, Tischer M, Zieger P. Modernes Fruchtbarkeitsmanagement beim Rind: Ein Leitfaden aus der Praxis für die Praxis. 1. Aufl. Bonn: AgroConcept; 2005.
- Mann G, Lamming G. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction.* 2001;121(1):175–80.
- Mann GE, Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domest Anim.* 1999;34(3-4):269–74.
- Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci.* 1995;37(2):121–31.
- Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999;54:317–28.
- Mann GE, Mann SJ, Blache D, Webb R. Metabolic variables and plasma leptin concentrations in dairy cows exhibiting reproductive cycle abnormalities identified through milk progesterone monitoring during the post partum period. *Anim Reprod Sci.* 2005;88(3-4):191–202.
- Mansfeld R, Kruif A de, Hoedemaker M, Heuwieser W. Fruchtbarkeitsüberwachung auf Herdenbasis. In: Grunert E; Berchthold M, Hrsg. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind.* 3. Aufl. Berlin, Wien: Parey; 1999. p. 337–49.
- Martin O, Friggens NC, Dupont J, Salvetti P, Freret S, Rame C et al. Data-derived reference profiles with corepresentation of progesterone, estradiol, LH, and FSH dynamics during the bovine estrous cycle. *Theriogenology.* 2013;79(2):331–43.
- Martins JPN, Policelli RK, Neuder LM, Raphael W, Pursley JR. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2011;94(6):2815–24.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev.* 1999;79(2):263–323.
- McLeod BJ, Foulkes JA, Williams ME, Weller RF. Predicting the time of ovulation in dairy cows using on-farm progesterone kits. *Anim Prod.* 1991;52(01):1–9.
- McNeill RE, Diskin MG, Sreenan JM, Morris DG. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology.* 2006;65(7):1435–41.
- Meier S, Roche JR, Kolver ES, Boston RC. A compartmental model describing changes in progesterone concentrations during the oestrous cycle. *J Dairy Res.* 2009a;76(2):249–56.
- Meier S, Roche JR, Kolver ES, Verkerk GA, Boston RC. Comparing subpopulations of plasma progesterone using cluster analyses. *J Dairy Sci.* 2009b;92(4):1460–8.
- Meikle A, Kulcsar M, Chilliard Y, Febel H, Delavaud C, Cavestany D et al. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction.* 2004;127(6):727–37.

- Menge AC, Mares SE, Tyler WJ, Casida LE. Variation and association among postpartum reproduction and production characteristics in holstein-friesian cattle. *J Dairy Sci.* 1962;45(2):233–41.
- Mercadante PM, Ribeiro ES, Risco C, Ealy AD. Associations between pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy outcomes, milk yield, parity, and clinical diseases in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2016;99(4):3031–40.
- Meyer H. Enzymimmunologische Messverfahren zur Hormonanalytik. 1. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1989.
- Michaelis I, Hasenpusch E, Heuwieser W. Estrus detection in dairy cattle: Changes after the introduction of an automated activity monitoring system? *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 2013;41(3):159–65.
- Milvae RA, Hinckley ST, Carlson JC. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology.* 1996;45(7):1327–49.
- Möstl E. Endokrinologie: spezielle Endokrinologie. In: Engelhardt W von; Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2005. p. 490–1.
- Monteiro APA, Tao S, Thompson IMT, Dahl GE. In utero heat stress decreases calf survival and performance through the first lactation. *J Dairy Sci.* 2016;99(10):1–8.
- Morris D, Diskin M. Effect of progesterone on embryo survival. *Animal.* 2008;2(8):1112–9.
- Morris MJ, Kaneko K, Walker SL, Jones DN, Routly JE, Smith RF et al. Influence of lameness on follicular growth, ovulation, reproductive hormone concentrations and estrus behavior in dairy cows. *Theriogenology.* 2011;76(4):658–68.
- Morton JM, Wynn PC. Assessing ovulation detection performance in commercial dairy herds using progesterone concentrations from limited numbers of strategically collected milk samples. *J Dairy Sci.* 2010;93(7):3019–30.
- Mottram T. Animal board invited review: precision livestock farming for dairy cows with a focus on oestrus detection. *Animal.* 2015;10(10):1575–84.
- Nakao T, Sugihashi A, Saga N, Tsunoda N, Kawata K. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst, and cystic corpus luteum in cows. *Am J Vet Res.* 1983;44(5):888–90.
- Nebel RL. On-farm milk progesterone tests. *J Dairy Sci.* 1988;71(6):1682–90.
- Nebel RL, Altemose DL, Munkittrick TW, Sprecher DJ, McGilliard ML. Comparisons of eight commercial on-farm milk progesterone tests. *Theriogenology.* 1989;31(4):753–64.
- Nebel RL, Dransfield MBG, Jobst SM, Bame JH. Automated electronic systems for the detection of oestrus and timing of AI in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:713–23.
- Nebel RL, Whittier WD, Cassell BG, Britt JH. Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *J Dairy Sci.* 1987;70(7):1471–6.
- Niswender GD. Blood flow: A mediator of ovarian function. *Biol Reprod.* 1976;14(1):64–81.
- Niswender GD, Davis TL, Griffith RJ, Bogan RL, Monser K, Bott RC et al. Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;64:191–206.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 2000;80(1):1–29.

- O'Connor H. Heat detections and timing of insemination for cattle; 1993 (zitiert vom 27.11.2016), http://extension.psu.edu/animals/dairy/health/reproduction/insemination/ec402/extension_publication_file.
- Obritzhauser W und Janacek R. Programm zur Bekämpfung von Fruchtbarkeitsstörungen in der österreichischen Rinderhaltung zur Verbesserung des Gesundheits- und Leistungszustandes der Rinderbestände; 2012 (zitiert vom 24.10.2016), https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/tiere/recht/kundmachungen/2_Anlage_Programm_Fruchtbarkeit_Rind.pdf?5iigf3.
- Ohtani S, Okuda K, Nishimura K, Mohri S. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*. 1993;39(5):1033–42.
- Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, Kruif A de. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. *Theriogenology*. 2000;53(4):841–57.
- Østergaard S, Friggens NC, Chagunda MGG. Technical and economic effects of an inline progesterone indicator in a dairy herd estimated by stochastic simulation. *Theriogenology*. 2005;64(4):819–43.
- Otto M. Analytische Chemie. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
- Pache S, Reinhold N, Birndt S, Gockel J. Fruchtbarkeitsüberwachung beim Milchrind: Erprobung und Bewertung von Verfahren zur Progesteron-Schnelltestbestimmung in der Milch zur Fruchtbarkeitsüberwachung beim Rind. Schriftenreihe des Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie. 2011;24.
- Pahl C, Hartung E, Mahlkow-Nerge K, Haeussermann A. Feeding characteristics and rumination time of dairy cows around estrus. *J Dairy Sci*. 2015;98(1):148–54.
- Palmer MA, Olmos G, Boyle LA, Mee JF. Estrus detection and estrus characteristics in housed and pastured Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*. 2010;74(2):255–64.
- Parr MH, Mullen MP, Crowe MA, Roche JF, Lonergan P, Evans ACO et al. Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein-Friesian heifers. *J Dairy Sci*. 2012;95(5):2390–6.
- Patton J, Kenny DA, McNamara S, Mee JF, O'Mara FP, Diskin MG et al. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in holstein-friesian cows. *J Dairy Sci*. 2007;90(2):649–58.
- Pennington JA, Albright JL, Callahan CJ. Relationships of sexual activities in estrous cows to different frequencies of observation and pedometer measurements. *J Dairy Sci*. 1986;69(11):2925–34.
- Peralta OA, Pearson RE, Nebel RL. Comparison of three estrus detection systems during summer in a large commercial dairy herd. *Anim Reprod Sci*. 2005;87(1-2):59–72.
- Peter AT, Bosu WTK. Postpartum ovarian activity in dairy cows: Correlation between behavioral estrus, pedometer measurements and ovulations. *Theriogenology*. 1986;26(1):111–5.
- Peters AR, Mawhinney I, Drew SB, Ward SJ, Warren MJ, Gordon PJ. Development of a gonadotrophin-releasing hormone and prostaglandin regimen for the planned breeding of dairy cows. *Vet Rec*. 1999;145(18):516–21.
- Petersson KJ, Berglund B, Strandberg E, Gustafsson H, Flint APF, Woolliams JA et al. Genetic analysis of postpartum measures of luteal activity in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2007;90(1):427–34.
- Petersson KJ, Gustafsson H, Strandberg E, Berglund B. Atypical progesterone profiles and fertility in swedish dairy cows. *J Dairy Sci*. 2006;89(7):2529–38.

- Phatak AP, Whitmore HL. Greater participation by veterinarians in the reproductive management of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(1):74–6.
- Pierson RA, Ginther OJ. Follicular populations during the estrous cycle in heifers - Influence of day. *Anim Reprod Sci.* 1987;14(3):165–76.
- Plotka ED, Erb RE, Callahan CJ, Gomes WR. Levels of progesterone in peripheral blood plasma during the estrous cycle of the bovine. *J Dairy Sci.* 1967;50(7):1158–60.
- Pryce JE, Royal MD, Garnsworthy PC, Mao IL. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livest Prod Sci.* 2004;86(1-3):125–35.
- Radcliff RP, McCormack BL, Crooker BA, Lucy MC. Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2003;86(12):3920–6.
- Rajamahendran R, Burton B, Shelford J. A field study on the usefulness of milk progesterone determination to confirm estrus and pregnancy of dairy cows in the Fraser Valley area of British Columbia. *Can Vet J.* 1993;34(6):349–52.
- Rajamahendran R, Robinson J, Desbottes S, Walton JS. Temporal relationships among estrus, body temperature, milk yield, progesterone and luteinizing hormone levels, and ovulation in dairy cows. *Theriogenology.* 1989;31(6):1173–82.
- Rajamahendran R, Taylor C. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim Reprod Sci.* 1990;22(3):171–80.
- Ranasinghe RMSBK, Nakao T, Yamada K, Koike K. Silent ovulation, based on walking activity and milk progesterone concentrations, in Holstein cows housed in a free-stall barn. *Theriogenology.* 2010;73(7):942–9.
- Ranasinghe RMSBK, Nakao T, Yamada K, Koike K, Hayashi A, Dematawewa CMB. Characteristics of prolonged luteal phase identified by milk progesterone concentrations and its effects on reproductive performance in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2011;94(1):116–27.
- Rathbone MJ, Kinder JE, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle CR et al. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;50(3):277–320.
- Reames PS, Hatler TB, Hayes SH, Ray DL, Silvia WJ. Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 β in ovariectomized dairy cows. *Theriogenology.* 2011;75(2):233–40.
- Reith S, Hoy S. Relationship between daily rumination time and estrus of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2012;95(11):6416–20.
- Rioux P. Progesterone in milk: a simple experiment illustrating the estrous cycle and enzyme immunoassay. *Adv Physiol Educ.* 2004;28(2):64–7.
- Robbins RK, Sullivan JJ, Pace MM, Elliott FI, Bartlett DE, Press PJ et al. Timing the insemination of beef cattle. *Theriogenology.* 1978;10(2-3):247–55.
- Robinson RS, Hammond AJ, Nicklin LT, Schams D, Mann GE, Hunter MG. Endocrine and cellular characteristics of corpora lutea from cows with a delayed post-ovulatory progesterone rise. *Domest Anim Endocrinol.* 2006;31(2):154–72.
- Robinson RS, Hammond AJ, Wathes DC, Hunter MG, Mann GE. Corpus luteum-endometrium-embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 (Suppl. 2):104–12.

- Roche JF, Mackey D, Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:703–12.
- Roche JR, Macdonald KA, Burke CR, Lee JM, Berry DP. Associations among body condition score, body weight, and reproductive performance in seasonal-calving dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2007;90(1):376–91.
- Roelofs JB, Bouwman EG, Dieleman SJ, Eerdenburg FJCM van, Kaal-Lansbergen LMTE, Soede NM et al. Influence of repeated rectal ultrasound examinations on hormone profiles and behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle. *Theriogenology.* 2004;62(7):1337–52.
- Roelofs JB, Eerdenburg FJCM van, Hazeleger W, Soede NM, Kemp B. Relationship between progesterone concentrations in milk and blood and time of ovulation in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 2006;91(3-4):337–43.
- Roelofs JB, Eerdenburg FJCM van, Soede NM, Kemp B. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology.* 2005b;64(8):1690–703.
- Roelofs JB, Eerdenburg FJCM van, Soede NM, Kemp B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology.* 2005a;63(5):1366–77.
- Roelofs JB, López-Gatius F, Hunter RHF, Eerdenburg FJCM van, Hanzen C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology.* 2010;74(3):327–44.
- Römer A. Untersuchungen zur Nutzungsdauer bei Deutschen Holstein Kühen. *Züchtungskunde.* 2011;83(1):8–20.
- Rorie RW, Bilby TR, Lester TD. Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology.* 2002;57(1):137–48.
- Rosenberg M, Folman Y, Herz Z, Flamenbaum I, Berman A, Kaim M. Effect of climatic conditions on peripheral concentrations of LH, progesterone and oestradiol-17 in high milk-yielding cows. *Reproduction.* 1982;66(1):139–46.
- Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci.* 2000;70:487–501.
- Royal MD, Flint APF, Woolliams JA. Genetic and phenotypic relationships among endocrine and traditional fertility traits and production traits in holstein-friesian dairy cows. *J Dairy Sci.* 2002;85(4):958–67.
- Ruiz FJ, Oltenacu PA, Smith RD. Cost-benefit evaluation of on-farm milk progesterone testing to monitor return to cyclicity and to classify ovarian cysts. *J Dairy Sci.* 1992;75(4):1036–43.
- Rutter LM, Manns JG. Hypoglycemia alters pulsatile luteinizing hormone secretion in the postpartum beef cow. *J Anim Sci.* 1987;64(2):479.
- Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. Towards an automated detection of oestrus in dairy cattle. *Reprod Domest Anim.* 2012;47(6):1056–61.
- Sakaguchi M. Practical aspects of the fertility of dairy cattle. *J Reprod Dev.* 2011;57(1):17–33.
- Sallmann HP, Fuhrmann H. Physiologische Aspekte der Leberfunktion. In: Engelhardt W von; Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2005. p. 428–33.
- Sangsrivavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2002;85(11):2831–42.

- Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:513–35.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci.* 2004;87(4):905–20.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.* 2002;85(11):2803–12.
- Saumande J. Radioimmunoassay of estradiol-17 β in unextracted ewe plasma. *Steroids.* 1981;38(4):425–37.
- Saumande J, Humblot P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. *Anim Reprod Sci.* 2005;85(3-4):171–82.
- Schams D. Ovarian peptides in the cow and sheep. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989;37:225–31.
- Schams D, Schallenberger E, Menzer C, Stangl J, Zottmeier K, Hoffmann B et al. Profiles of LH, FSH and progesterone in postpartum dairy cows and their relationship to the commencement of cyclic functions. *Theriogenology.* 1978;10(6):453–68.
- Schirmann K, von Keyserlingk MAG, Weary DM, Veira DM, Heuwieser W. Technical note: Validation of a system for monitoring rumination in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2009;92(12):6052–5.
- Schnurrbusch U, Vogler B. Gynäkologie für Veterinärmediziner - Endokrinologie, Zyklus, Pubertät, biotechnische Zyklussteuerung. 1. Aufl. Zwickau: Verl. Wiss. Scripten; 2002.
- Schofield SA, Phillips CJC, Owens AR. Variation in the milk production, activity rate and electrical impedance of cervical mucus over the oestrous period of dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 1991;24(3-4):231–48.
- Senger PL. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J Dairy Sci.* 1994;77(9):2745–53.
- Shamsuddin M, Bhuiyan MMU, Chanda PK, Alam MGS, Galloway D. Radioimmunoassay of milk progesterone as a tool for fertility control in smallholder dairy farms. *Trop Anim Health Prod.* 2006;38(1):85–92.
- Sheldon IM, Wathes DC, Dobson H. The management of bovine reproduction in elite herds. *Vet J.* 2006;171(1):70–8.
- Shelton K, Gayerie De Abreu MF, Hunter MG, Parkinson TJ, Lamming GE. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *Reproduction.* 1990;90(1):1–10.
- Shrivastav TG, Chaube SK, Charu SK, Rangari K, Kariya KP, Singh R et al. Enzyme linked immunosorbent assay for milk progesterone. *J Immunoassay Immunochem.* 2010;31(4):301–13.
- Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF et al. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2002;71(1-2):1–12.
- Silper BF, Polsky L, Luu J, Burnett TA, Rushen J, de Passillé AM et al. Automated and visual measurements of estrous behavior and their sources of variation in Holstein heifers. II: Standing and lying patterns. *Theriogenology.* 2015;84(3):333–41.
- Siqueira LGB, Torres CAA, Amorim LS, Souza ED, Camargo LSA, Fernandes CAC et al. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 2009;115(1-4):18–28.

- Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 1988;39(2):308–17.
- Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G, Okuda K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 (Supl. 2):57–65.
- Sobiraj A, Arnstadt KI, Scheibner R, Lehmann B. Vergleich praxisrelevanter Milchprogesteron-Schnelltests mit einer laborgebundenen Routinemethode beim Rind. *Tierärztl Prax.* 1989;17(1):21–5.
- Sobiraj A, Seyrek-Intas K, Wollgarten B, Taday B. Die Anwendungseignung aktueller Milchprogesteron-Schnelltests für Rinder im Vergleich zu einer laborgebundenen Routinemethode. *Tierärztl Prax.* 1995;23(1):32–6.
- Souza AH, Silva EPB, Cunha AP, Gümen A, Ayres H, Brusveen DJ et al. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology.* 2011;75(4):722–33.
- Spann B. Fütterungs-Controlling im Milchviehbetrieb. In: Verb. d. Landwirtschaftsberater in Bayern, Hrsg. Die Landwirtschaft - Tierische Erzeugung: Bedeutung der Veredlungswirtschaft, Grundlagen der Fütterung, Grundlagen der Tierzucht, Funktion und Planung landwirtschaftlicher Betriebsgebäude, Rinderhaltung und -fütterung, Rinderzucht, Schweinehaltung und -fütterung, Schweinezucht, Tiergesundheit und Tierschutz, weitere Nutztiere, ökologische Tierhaltung, Futtermittelkunde. 12. Aufl.; 2007. p. S.431.
- Spencer TE, Forde N, Lonergan P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci.* 2016;99(7):5941–50.
- Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol.* 2001;21(4):251–70.
- Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD. Insulin-like growth factor-I in dairy cows: Relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *J Dairy Sci.* 1990;73(4):929–37.
- Spohr M, Wiesner HU. Kontrolle der Herdengesundheit und Milchproduktion mit Hilfe der erweiterten Milchleistungsprüfung. *Milchpraxis.* 1991;29:231–6.
- Squires EJ. *Applied animal endocrinology.* 2. Aufl. Wallingford, Oxfordshire, Cambridge, MA: CABI; 2010.
- Sreenan JM, Diskin M. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec.* 1983;112(22):517–21.
- Staples CR, Thatcher WW, Clark JH. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 1990;73(4):938–47.
- Stevenson JS. Reproductive management of dairy cows in high milk-producing herds. *J Dairy Sci.* 2001;84 (E. Suppl.):128–43.
- Stevenson JS, Britt JH. Detection of estrus by three methods. *J Dairy Sci.* 1977;60(12):1994–8.
- Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology.* 2005;64(5):1212–24.
- Sveberg G, Refsdal AO, Erhard HW, Kommisrud E, Aldrin M, Tvete IF et al. Behavior of lactating holstein-friesian cows during spontaneous cycles of estrus. *J Dairy Sci.* 2011;94(3):1289–301.
- Sveberg G, Refsdal AO, Erhard HW, Kommisrud E, Aldrin M, Tvete IF et al. Sexually active groups in cattle-a novel estrus sign. *J Dairy Sci.* 2013;96(7):4375–86.

- Szelényi Z, Répási A, de Sousa NM, Beckers JF, Szenci O. Accuracy of diagnosing double corpora lutea and twin pregnancy by measuring serum progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 in the first trimester of gestation in dairy cows. *Theriogenology*. 2015;84(1):76–81.
- Talukder S, Thomson PC, Kerrisk KL, Clark CEF, Celi P. Evaluation of infrared thermography body temperature and collar-mounted accelerometer and acoustic technology for predicting time of ovulation of cows in a pasture-based system. *Theriogenology*. 2015;83(4):739–48.
- Taylor VJ, Cheng Z, Pushpakumara PGA, Wathes DC, Beever DE. Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. *Vet Rec*. 2004;155(19):583–8.
- Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JEP. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*. 2006;65(1):30–44.
- Thijssen JM, Herzog K, Weijers G, Brockhan-Luedemann M, Starke A, Niemann H et al. Ultrasound image analysis offers the opportunity to predict plasma progesterone concentrations in the estrous cycle in cows: a feasibility study. *Anim Reprod Sci*. 2011;127(1-2):7–15.
- Thompson IM, Cerri RLA, Kim IH, Ealy AD, Hansen PJ, Staples CR et al. Effects of lactation and pregnancy on metabolic and hormonal responses and expression of selected conceptus and endometrial genes of Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2012;95(10):5645–56.
- Tucker HA. Seasonality in cattle. *Theriogenology*. 1982;17(1):53–9.
- Vailes LD, Britt JH. Influence of footing surface on mounting and other sexual behaviors of estrual holstein cows. *J Anim Sci*. 1990;68(8):2333.
- Vandehaar MJ, Sharma BK, Fogwell RL. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-I in liver and corpus luteum of heifers. *J Dairy Sci*. 1995;78(4):832–41.
- Vanholder T, Leroy JLMR, Soom A van, Opsomer G, Maes D, Coryn M et al. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci*. 2005;87(1-2):33–44.
- Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*. 2003;60(5):795–807.
- Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL. Association Between Energy Balance and Luteal Function in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 1988;71(4):1063–72.
- VIT, Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V.: Beschreibung der Zuchtwertschätzung für Milchleistungsmerkmale, Zellzahl, Exterieurmerkmale, Nutzungsdauer und Zuchtleistungsmerkmale; 2017 (zitiert vom 09.02.2017), http://www.vit.de/fileadmin/user_upload/vit-fuers-rind/zuchtwertschaetzung/milchrinder-zws-online/Zws_Bes_deu.pdf.
- Vliet JH van, Eerdenburg FJCM van. Sexual activities and oestrus detection in lactating holstein cows. *Appl Anim Behav Sci*. 1996;50(1):57–69.
- Waldmann A, Raud A. Comparison of a lateral flow milk progesterone test with enzyme immunoassay as an aid for reproductive status determination in cows. *Vet Rec*. 2016;178(11):260.
- Waldmann A, Reksen O, Landsverk K, Kommisrud E, Dahl E, Refsdal AO et al. Progesterone concentrations in milk fat at first insemination - effects on non-return and repeat-breeding. *Anim Reprod Sci*. 2001;65(1–2):33–41.
- Waldmann A, Ropstad E, Landsverk K, Sørensen K, Sølvørød L, Dahl E. Level and distribution of progesterone in bovine milk in relation to storage in the mammary gland. *Anim Reprod Sci*. 1999a;56(2):79–91.

- Walker SL, Smith RF, Jones DN, Routly JE, Morris MJ, Dobson H. The effect of a chronic stressor, lameness, on detailed sexual behaviour and hormonal profiles in milk and plasma of dairy cattle. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(1):109–17.
- Walsh RB, Walton JS, Kelton DF, LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 2007;90(6):2788–96.
- Walters DL, Schallenberger E. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *Reproduction.* 1984;71(2):503–12.
- Wangler A, Meyer A, Rehbock F, Sanftleben P. Wie effizient ist die Aktivitätsmessung als ein Hilfsmittel in der Brunsterkennung bei Milchrindern? *Züchtungskunde.* 2005;77:110–27.
- Wathes DC, Bourne N, Cheng Z, Mann GE, Taylor VJ, Coffey MP. Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *J Dairy Sci.* 2007b;90(3):1310–25.
- Wathes DC, Cheng Z, Bourne N, Taylor VJ, Coffey MP, Brotherstone S. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest Anim Endocrinol.* 2007a;33(2):203–25.
- Webinger J, Keller D, Budrich B. Wie schreibe ich eine Doktorarbeit?: Leitfaden für Mediziner und Zahnmediziner. Aufl. 2014. Berlin: Springer Berlin; 2014.
- Weijden GC van der, Taverne M. Trächtigkeitsuntersuchung. In: Grunert E; Berchthold M, Hrsg. *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind.* 3. Aufl. Berlin, Wien: Parey; 1999. p. 78–91.
- Wiltbank MC. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod.* 1990;42(2):239–45.
- Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology.* 2002;57(1):21–52.
- Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology.* 2006;65(1):17–29.
- Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Bender RW, Nascimento AB. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2012;24(1):238–43.
- Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD, Cunha AP, Giordano JO, Fricke PM et al. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal.* 2014;8 (Suppl. 1):70–81.
- Windig JJ, Beerda B, Veerkamp RF. Relationship between milk progesterone profiles and genetic merit for milk production, milking frequency, and feeding regimen in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2008;91(7):2874–84.
- Winter P, Zehle HH. Untersuchung im Stall: Einzeltier. In: Winter P, Hrsg. *Praktischer Leitfaden Mastitis: Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand;* 2. Aufl. Stuttgart: Parey; 2009. p. 34–44.
- Wohlfahrt M. Jahresrückblick: Milchmarkt 2015 deutlich schwächer: ZBM - zentrale Milchmarkt Berichterstattung; 2015 (zitiert vom 06.12.2016), <http://www.milk.de/download/Jahresr%C3%BCckblick2015.pdf>.
- Wohlfahrt M. Jahresrückblick: Milchmarkt 2016 mit starken Schwankungen: ZBM - zentrale Milchmarkt Berichterstattung; 2016 (zitiert vom 10.01.2017), <http://www.milk.de/download/Jahresr%C3%BCckblick2016.pdf>.

Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*. 2004;62(6):1042–55.

Yániz JL, Santolaria P, Giribet A, López-Gatius F. Factors affecting walking activity at estrus during postpartum period and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology*. 2006;66(8):1943–50.

Yoshida C, Nakao T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. *J Reprod Dev*. 2005;51(1):99–107.

Zieger P. Brunsterkennung optimieren. *Milchrind*. 2004;2:48–50.

9 Danksagung

Mit der Fertigstellung meiner Dissertationsschrift möchte ich allen Menschen im besonderen Maße danken, die mich sowohl fachlich als auch privat bei meinem Vorhaben unterstützt und mit guten Ratschlägen begleitet haben.

Besonders bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sobiraj für die Bereitstellung des interessanten und praxisrelevanten Promotionsthemas sowie seine konstruktive Kritik und Betreuung.

Herrn Dr. Klaus-Ingo Arnstadt danke ich für die fachliche Beratung zum Thema Milchprogesteronmessung und dem Hormonost[®] Farmertest.

Bei den Mitarbeitern des Milchviehbetriebs Hohenroda e. G., speziell Herrn Garn, Herrn Meißner und Frau Weißwange, möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit, die Bereitstellung der Daten und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Frau Dr. Franziska Richter möchte ich für die spontane Bereitschaft und die Geduld mir in statistischen Fragen zur Seite zu stehen rechtherzlich danken.

Für die Unterstützung im Labor, die liebevollen Gesten und die regelmäßige mentale Stärkung, bedanke ich mich bei Frau Sabine Grohmann, ohne sie wäre einiges nicht möglich gewesen.

Meinen Eltern, meiner lieben Omi, meinem Cousin Daniel und meinem Opa, sowie auch meiner Schwiegerfamilie, danke ich für die tolle Begleitung während der gesamten Studien- und Promotionszeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen und ihr unerschütterliches Verständnis für meine Probleme und Sorgen.

Meinen lieben Freunden, Kollegen, Bremsern sowie dem tollen jagdlichen Bekanntenkreis und speziell Almut Bauer, Lars Bruhne, Christina Felton, Manja Wachsmuth, Christoph Klose, Thomas Breuer, Pierre Fischer und Torsten Seiffert danke ich für die vielen wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen, ihr Einfühlungsvermögen sowie die für mich notwendige geistige Entlastung während der gesamten Zeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem besten Freund und Jagdkollegen Ronny Steinicke, der durch zahlreiche verrückte Unternehmungen, perfekte kulinarische Feierabendgestaltungen und seelische Unterstützung mein Promotionsvorhaben stets aufrichtig begleitet und vorangetrieben hat.

Auch an meinem großartigen Partner Paul Franz, der nie den Glauben an mich, das Studium, meine Arbeit und das Dissertationsvorhaben verloren hat, egal wie verzweifelt ich war, möchte ich mich wenden. Du hast mir die ganze Zeit liebevoll vertraut, mich tapfer ertragen und mit viel Geduld verständnisvoll und konstruktiv motiviert und wieder aufgebaut! Danke für alles!