

**Terminorientierte Besamung
nach Presynch- oder Ovsynch-Behandlung
sowie ein Vergleich
verschiedener Methoden der Trächtigkeitsfeststellung bei Milchkühen**

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

vorgelegt von
Daniela Marthold
geboren in Schwabach, Bayern

Göttingen, im September 2012

D7

1. Referent:

Prof. Dr. Dr. Matthias Gauly

2. Korreferent:

Prof. Dr. Wolfgang Holtz

Tag der mündlichen Prüfung:

05. November 2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary.....	4
Kapitel I.....	8
Allgemeine Einleitung	8
Kapitel II.....	11
Literaturübersicht.....	11
2.1 Physiologie des Brunstzyklus der Kuh.....	11
2.2 Hormoneinsatz bei der Milchkuh	12
2.2.1 Wirkung und Einsatz von GnRH und dessen Analoga	12
2.2.2 Wirkung und Einsatz von hCG.....	13
2.2.3 Wirkung und Einsatz von PGF2 α und dessen Analoga	14
2.3 Terminorientierten Besamung mittels Ovulationssynchronisation	16
2.3.1 Ovsynch-Verfahren (GPG).....	16
2.3.2 Presynch-Verfahren (PGF2 α).....	19
2.3.3 Resynch-Verfahren (GPG)	19
2.4 Trächtigkeit und Trächtigkeitsuntersuchung beim Rind	21
2.4.1 Trächtigkeit beim Rind.....	21
2.4.2 Frühe Trächtigkeitsuntersuchung und embryonale Frühsterblichkeit	21
2.4.3 Trächtigkeitsuntersuchung mittels transrektaler Palpation.....	22
2.4.4 Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultrasonographie	23
2.4.5 Milchprogesterontest zur Trächtigkeitsfeststellung.....	24
2.4.6 Bestimmung trächtigkeitsassoziierte Proteine.....	25
Kapitel III	29
Implementation of Fixed-time Insemination in Medium-sized Family Farms in Pasture Regions of Northern Germany	29
Abstract.....	29
3.1 Introduction	30
3.2 Materials and Methods	31
3.3 Results	32
3.4 Discussion.....	36
3.5 References	37
Kapitel IV	39

Efficiency of a fixed-time AI (TAI) in dairy cows following a Presynch- or Ovsynch protocol and the application of Buserelin or hCG as ovulation inducing agent in consideration of herd size	39
Abstract.....	40
4.1 Introduction	40
4.2 Material and Methods.....	42
4.3 Results	43
4.4 Discussion.....	47
4.5 References	51
see chapter VII.....	51
Kapitel V	53
Pregnancy detection in dairy cows – a comparative field study.....	53
Abstract.....	53
5.1 Introduction.....	54
5.2 Material and Methods	58
5.3 Results.....	60
5.4 Discussion.....	63
5.5 Conclusion	66
5.6 References.....	66
Kapitel VI.....	68
Schlussbetrachtung	68
Kapitel VII.....	76
Literaturverzeichnis/ References	76
Eigenständigkeitserklärung	95

Abbildungsverzeichnis

Kapitel II

Abbildung 1: Veränderungen am Ovar während des Brunstzyklus beim Rind (nach O'Connor 1993)	11
Abbildung 2: Behandlungspläne für den Einsatz des Ovsynch-Verfahrens sowie in Kombination mit dem Pre- und Resynch-Verfahren unter Berücksichtigung der Zeit post partum (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999; Fricke et al., 2003)	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Eihautgriffs um den 35. Trächtigkeitstag (nach Zürich aus Fruchtbarkeitsstörungen beim weiblichen Rind, 1999).....	22
Abbildung 4: Progesteronkonzentrationsverlaufskurven bei (a) erfolgter Konzeption, (b) normalem Zyklusverlauf ohne erfolgte Konzeption, (c) verspäteter Luteolyse, (d) eingestellter Ovaritätigkeit, (e) unzureichender Vorsynchronisation mittels PGF2 α -Programm und (f) persistierendem Gelbkörper (frei nach Lucy et al. 2011)	24
Abbildung 5: PAG-Verlauf während der Trächtigkeit sowie den ersten Wochen post partum (nach Friedrich und Holtz, 2004)	27

Tabellenverzeichnis

Kapitel II

Tabelle 1: Nutzen und Schwachstellen des Ovsynch-Verfahrens (Pursley et al., 1995; Pursley et al., 1997a; Pursley et al., 1997b; Stevenson et al., 1999; Fricke, 2006; Aslan et al., 2011):.....	17
--	----

Kapitel III

Table 1: Characterization of the four herds participating in the study (n= 618, 222 primiparous and 396 pluriparous cows). Overall 701 cows were kept in herds, 618 cows were randomly selected for the study.....	35
--	----

Table 2: Pregnancy rate and service interval in cows subjected to a presynch or an ovsynch protocol, ovulation-induced with buserelin or hCG, as compared to a control group of herd mates inseminated upon observed estrus. Pregnancy was confirmed by determining pregnancy associated glycoprotein (PAG) in blood 30 to 45 days after insemination.....	36
--	----

Kapitel IV

Table 1: Effect of herd structure and ovulation inducing agent. Cows in first service treatment groups where inseminated following an Ovsynch regimen using Buserlin (GnRH) or hCG as ovulation inducing agents. Cows in control group where left untreated and inseminated when in estrus.	45
--	----

Table 2: Effect of a Presynch or an Ovsynch protocol, using GnRH or hCG as ovulation inducing agent, in a comparative field study; 327 cows in two of the small-sized dairy farms (< 300 cows) were inseminated after following a Presynch protocol, another 280 cows in remaining 15 small-sized herds were allotted to an Ovsynch group. As control 106 cows in the two Presynch herds cows and 138 cows in Ovsynch herds were left untreated and inseminated when in estrus.	46
--	----

Kapitel V

Table 1: Reliability of various methods of pregnancy detection assessed in 213 dairy cows, 81 (38 %) of which were calving 270 to 290 days after insemination.	62
---	----

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CL	Corpus luteum
ELISA	Enzyme Linked Immunsorbent Assay
EPF	Early-Pregnancy-Factor
€	Euro
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
C°	Grad Celsius
Hrsg.	Herausgeber
hCG	humanes Chorion Gonadotropin
KB	künstliche Besamung
Kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
P	Wahrscheinlichkeit, p-value
PAG	Pregnancy-Associated Glykoprotein
PGD2	Prostaglandin D2
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2 α	Prostaglandin F2 alpha
PGI2	Prostaglandin I2
p.i.	post insemination
%	Prozent
PSPB	Pregnancy Specific Protein B
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standard Deviation
TAI	Timed Artificial Insemination
Vol.	Volume
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

In der Milchviehhaltung hat die Reproduktionsleistung der Kühe, neben der Milchleistung, einen großen Einfluss auf den Unternehmenserfolg. Da die negative Korrelation zwischen Milch- und Fruchtbarkeitsleistung seit langem bekannt ist, hat die Milchviehpraxis ein großes Interesse daran Wege zu finden um das gesamte Reproduktionsmanagement in Hochleistungsherden effizienter und erfolgreicher durchzuführen. Dies erfolgt beispielsweise durch die Erhöhung der Brunsterkennungs- und folglich der Brunstnutzungsrate, einer Verringerung von Rast und Verzögerungszeit sowie einer Steigerung der Trächtigkeitsrate aber auch dem frühzeitigen Erkennen nicht tragender Kühe im Interesse einer baldigen Wiederbelegung. Neben technischen Hilfsmitteln, wie Pedometern und Farbkennzeichnungsstiften, gewinnen die aus Nordamerika stammenden Verfahren zur terminorientierten Besamung mittels hormoneller Zyklussteuerung auch unter deutschen Bedingungen immer mehr an Bedeutung. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit den folgenden drei Fragestellungen:

- die Erprobung des Pre- und Ovsynchverfahrens in mittelgroßen Grünlandbetrieben im Besamungsgebiet des VOST,
- dem Einsatz des Pre- und Ovsynchverfahrens in mittelgroßen, familiengeführten Milchviehbetrieben in Niedersachsen und großen Milchviehherden in Brandenburg unter Verwendung von GnRH und hCG zur Ovulationsinduktion, sowie
- dem Vergleich verschiedener Trächtigkeitsuntersuchungsmethoden bei Milchkühen.

Im ersten Versuch wurden insgesamt 618 Kühe auf vier ostfriesischen Milchviehbetrieben nach dem von Pursley et al. (1995) beschriebenen Ovsynch-Verfahren behandelt und terminorientiert besamt. Ein Teil (n=300) wurde zusätzlich mit zwei PGF_{2α} Injektionen im Abstand von 14 Tagen vorsynchronisiert (Presynch-Verfahren). Zu Kontrollzwecken wurden 150 Kühe nach Brunstbeobachtung besamt. Im zweiten Versuch wurden insgesamt 1.509 Holstein-Frisian Kühe ebenfalls nach Pre- und Ovsynch-Behandlung terminorientiert besamt. Insgesamt 526 Kühe blieben unbehandelt und wurden aufgrund einer natürlichen Brunst besamt. In beiden Versuchen wurde die Ovulation 16-20 Stunden vor der künstlichen Besamung alternierend mit GnRH oder hCG induziert. Sowohl im ersten als auch im zweiten Versuch unterschieden sich die erzielten Trächtigkeitsraten nach Pre- (38 % Versuch 1 und 39 % Versuch 2) und Ovsynch-Verfahren (41 % Versuch 1 und 33 %

Versuch 2) nicht signifikant von denen die bei unbehandelten Kühen (48 % Versuch 1 und 45 % Versuch 2) erzielt wurden. Der Einsatz von hCG zur Ovulationsauslösung resultierte in beiden Untersuchungen in signifikant niedrigeren Trächtigkeitsraten (jeweils 34 % in Versuch 1 und 2) im Vergleich zu GnRH-behandelten (44 % Versuch 1 und 42 % Versuch 2) Tieren. Gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren (48 % Versuch 1 und 45 % Versuch 2) konnten jedoch nur im zweiten Versuch Unterschiede zu hCG-behandelten Tieren festgestellt werden. Durch den Einsatz des Presynch-Verfahrens konnte eine Verkürzung der Rastzeit im Versuch 1 von 80 Tagen (unbehandelte Tiere) auf 73 Tage und im Versuch 2 von 87 Tagen (unbehandelte Tiere) auf 75 Tage erreicht werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass die einzelnen Betriebe/Regionen aufgrund unterschiedlicher Haltungs- und Managementbedingungen nicht direkt vergleichbar sind. Die Ergebnisse zeigen, dass die terminorientierte Besamung durch den Wegfall der Brunstbeobachtung und akzeptablen Trächtigkeitsraten bei gleichzeitiger Erhöhung der Brunstnutzungsrate sowie einer Verringerung der Rastzeit, erfolgreich in das Reproduktionsmanagement, unter den beschriebenen Produktionsbedingungen, eingebunden werden kann. Der Austausch von GnRH durch hCG ist, auch in Anbetracht der niedrigeren Präparatkosten, aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, nicht zu empfehlen. Bei der Diskussion des Einsatzes von Fruchtbarkeitsprogrammen, wie dem Ovsynch-Verfahren, ist festzustellen, dass diese Verfahren nicht für jeden Betrieb aufgrund von lokalen Gegebenheiten und Management geeignet sind und die Ergebnisse betriebsindividuell sehr unterschiedlich ausfallen können. Des Weiteren sind beim Einsatz von Hormonen bei landwirtschaftlichen Nutztieren immer Verbraucher- und Tierschutzaspekte zu berücksichtigen. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Hormone in geringer Dosierung verabreicht werden um physiologische Vorgänge, wie Ovulation oder Luteolyse, im Sinne der Arbeitswirtschaftlichkeit zeitlich zu synchronisieren.

Gegenstand des dritten Versuchs war die Trächtigkeitsdiagnostikverfahren Milchprogesterontest, Sonographie, PAG-Trächtigkeitstest und rektale Palpation hinsichtlich ihrer Aussagesicherheit einander gegenüberzustellen. Dazu wurden im Zuchtgebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) 213 Holstein-Frisian Kühe besamt. Für die Bestimmung der Milchprogesteronkonzentration an den Tagen 21, 28 und 49 nach KB Nachgemelksproben entnommen und bis zur Analyse tiefgefroren gelagert. An den Tagen 29 bis 35 wurden alle Tiere mittels Ultraschall auf ihren Trächtigkeitsstatus hin untersucht. Zugleich wurde von jeder Kuh eine Blutprobe aus der

Schwanzvene (Vena coccygealis ventralis) zur Bestimmung der Pregnancy-Associated Glykoprotein (PAG) Konzentration entnommen. Sowohl die Ultraschalluntersuchung als auch die Entnahme der Blutprobe wurden von einem versierten Tierarzt vorgenommen. Die rektale Palpation des Uterus am Ende des Kleinsäckchenstadiums erfolgte am Tag 60 p.i. durch einen von drei Besamungsbeauftragten mit mehrjähriger Berufserfahrung. Also Referenzmethode wurde das Abkalbeergebnis 280 ± 10 Tage nach der Besamung herangezogen. Von den 213 untersuchten Kühen kalbten 81 (38 %) fristgerecht. Die höchste Aussagesicherheit von 97,8 % wurde bei einer kombinierten Milchprogesteronbestimmung an den Tagen 21 und 28 p.i erreicht. Eine Kombination der Ergebnisse einzelner Probetage ergab Aussagesicherheiten zwischen 87,5 % (Tag 21, 28 und 49) und 95,5 % (Tag 49). Die Aussagesicherheit des PAG-Trächtigkeitstests lag bei 91,6 %, die des Ultraschalls 89,2 % und die der manuellen Palpation bei 95,3 %. Bei Diskussion der Ergebnisse muss der zeitliche Abstand vom Besamungstermin der verschiedenen Methoden kritisch berücksichtigt werden. Je früher der Untersuchungszeitpunkt, desto größer kann der Einfluss der embryonalen Mortalität sein. Jedoch ist die frühzeitige Erkennung nicht tragender Kühe im Interesse auf eine baldige Wiederbelegung erstrebenswert. Für die Praxis wäre folglich eine möglichst zuverlässige frühe Trächtigkeitsdiagnose erstrebenswert, der gegebenenfalls eine Nachkontrolle zu einem späteren Zeitpunkt folgt.

Summary

In dairy farming reproductive performance and milk yield of cows have a major impact on the operation's economic success. As the negative correlation between milk yield and reproductive performance is widely known, the dairy industry has a strong interest in finding ways to improve the entire reproductive management in high performing dairy herds.

This can be achieved by improving estrus detection, reducing service period and days open, and increasing pregnancy rate. In addition the detection of cows that fail to conceive due to prior service is of major interest. Beside technical devices, such as pedometers and paint sticks (tail chalk), fixed-time AI protocols developed in North America are becoming increasingly important, also under German husbandry conditions.

Therefore, this dissertation includes three studies that address the following aspects:

- Implementation of a fixed-time insemination protocol on middle-sized family farms in pasture-based farming regions of Northern Germany
- Evaluation of fixed-time AI following a Presynch- or Ovsynch protocol with GnRH or hCG as ovulation-inducing agents in German middle-sized family-run or large dairy operations and
- A comparison of pregnancy diagnosis methods in dairy cows

In the first experiment, a total of 618 cows in four East Friesian dairy herds were fixed-time inseminated after following an Ovsynch-protocol as described by Pursley et al (1995). Of the 618 cows 300 were administered two PGF2a injections at an interval of 14 days, following a Presynch-regimen. For control purposes, 150 cows were inseminated when in estrus. In the second experiment, 1,509 Holstein-Friesian cows were inseminated following a Pre-or Ovsynch-regimen. A total of 526 cows were left untreated and inseminated after estrus detection. In both experiments, the ovulation was induced 16-20 hours before artificial insemination with the administration of alternating GnRH or hCG.

In both experiments, the achieved pregnancy rates after Pre- (38% experiment 1 and 39% experiment 2) and Ovsynch-treatment (41% in experiment 1 and 33% in experiment 2)

were not significantly different from those in untreated cows (48% in experiment 1 and 45% in experiment 2). The use of hCG as ovulation-inducing agent resulted in both studies in significantly lower pregnancy rates (34% in both experiment) as compared with GnRH-treated cows (44% in experiment 1 and 42% in experiment 2). However, when compared to the untreated cows (48% in experiment and 45% in experiment 2) only in hCG-treated cows participating in experiment 2, significantly lower pregnancy rates were observed.

The application of Presynch resulted in a shortening of service period from 80 days (untreated animals) to 73 days in experiment 1 and from 87 days (untreated animals) to 75 days in experiment 2.

However, when bearing in mind that the individual dairy operations are not directly comparable due to different husbandry and management conditions, results may turn out different under differing conditions. Claimed benefits of fixed-time insemination the reduced workload because there is no longer a need for estrus detection as well as increased service rates and consequently higher pregnancy rates.

Based on the present results, the substitution of GnRH by hCG cannot be recommended, even when considering lower drug costs. The same may apply to the administration of a Presynch-protocol due to the increased workload caused by the additional two prostaglandin injections.

Furthermore, when considering the use of reproductive hormones in livestock, consumer protection and animal welfare aspects should not be neglected. As part of the TAI regimen hormones are administered to synchronize and trigger physiological processes such as ovulation or luteolysis in terms of work efficiency. However, the applied dose is marginal and all hormones are metabolized within a few hours.

In the third experiment, the pregnancy diagnosis methods determination of milk progesterone and pregnancy-associated glycoprotein concentration in blood, ultrasonography and rectal palpation were compared regarding their overall reliability. For this purpose, 213 Holstein-Frisian cows were inseminated. For the determination of milk progesterone concentration, milk samples were striped on days 21, 28 and 49 p.i and stored frozen until analysis. On days 29 to 35, all animals were tested for pregnancy by

ultrasound. Simultaneously blood samples from each cow were drawn from the tail vein (vena coccygealis ventralis) for the determination of pregnancy-associated glycoprotein (PAG). Both, the ultrasound examination and blood sampling were performed by an experienced veterinarian. Rectal palpation of the uterus on day 60 p.i was performed by one of three AI technicians with several years of experience. The final calving rate 280 ± 10 days after insemination was 38% (81 out 213 cows). The highest overall reliability of 97.8% was achieved when milk progesterone concentration was determined on days 21 and 28. A combination of single days resulted in overall reliabilities ranging between 87.5 % (days 21, 28 and 49) and 95.5 % (day 49). The PAG determination resulted in an overall reliability of 91.6 % followed by ultrasound with 89.2 %. Manual palpation and calving outcome agreed by 95.3 %.

In conclusion, the interval between insemination and pregnancy diagnosis must be considered critically. The earlier pregnancy determination is carried out, the greater may be the influence of the embryonic mortality. However, early detection of non-pregnant cows, in the interest of an immediate re-insemination, is desirable. Ultimately price and availability as well as producers' preferences will determine which pregnancy diagnosis method is used on each individual dairy farm.

Kapitel I

Kapitel I

Allgemeine Einleitung

Die Milchviehhaltung spielt mit 4,1 Millionen Milchkühen in 91.600 Betrieben eine wichtige Rolle in der deutschen Agrarproduktion. Im Zentrum des wirtschaftlichen Erfolges eines Betriebes steht die Fruchtbarkeit des weiblichen Rindes. Die negative Korrelation zwischen Milchleistung, Fruchtbarkeitsleistung und Brunsterkennung ist vielfach beschrieben (Lucy, 2001; Butler, 2003). Während sich die durchschnittliche 305-Tagesleistung einer Kuh von 4.085 kg im Jahr 1955 auf aktuell 8.770 kg mehr als verdoppelt hat, reduzierte sich zeitgleich der Erstbesamungserfolg von 63 % auf 54 % (VIT, 2009). Durch den Rückgang der Intensität von Brunstanzeichen auf weniger als sieben Stunden, überwiegend nachts und während der frühen Morgenstunden, werden Brunsterkennung und Ermittlung des idealen Besamungszeitpunktes insbesondere in Hochleistungsherden zur Herausforderung (Pursley et al., 1997b; Wiltbank et al., 2006). Eine Besamungsdichte in Deutschland von aktuell 75 %, verglichen mit 94 % im Jahr 1994, bei gleichzeitigem Anstieg der Deckbullenverkäufe auf Auktionen von jährlich etwa 2 %, spiegeln den Trend hin zum Einsatz eines Deckbullens, auch in Milchviehherden, wieder (ADR, 2010). Da der Einsatz von Deckbullen nicht unumstritten ist (Moosbauer, 2012), besteht insbesondere unter Berücksichtigung des Strukturwandels in der Milchviehwirtschaft, ein großes Interesse an biotechnologischen Maßnahmen um die Durchführung der künstlichen Besamung effizienter zu gestalten sowie den Besamungserfolg zu steigern. Eine Maßnahme ist der Einsatz von Ovulationssynchronisationsprogrammen kombiniert mit terminorientierter Besamung. Das Ovsynch-Verfahren, welches auf dem Einsatz von GnRH und PGF2 α basiert, wurde erstmals von der Arbeitsgruppe Pursley Mitte der Neunziger Jahre (Pursley et al., 1995) beschrieben. Laut einer Untersuchung von Lima et al. (2010) werden mittlerweile 58 % aller Milchviehbestände in Nordamerika terminorientiert nach Ovsynch-Behandlung besamt. In Deutschland kommen derzeit Ovulationssynchronisationsprogramme überwiegend auf Großbetrieben zum Einsatz. Nicht zuletzt ist die mangelnde Akzeptanz den Präparatkosten von durchschnittlich € 15.50 pro Tier und Durchgang geschuldet (Tenhagen et al., 2004). Der wirtschaftliche Profit des Verfahrens ist jedoch in der Verringerung von Rast- und Gützeiten (Risco et al., 1998; Lucy et al., 2004a) begründet. In diesem Zusammenhang ist die Verfügbarkeit von Methoden zur frühzeitigen Erkennung

nicht tragender Tiere im Interesse einer baldigen Wiederbelegung von großem Interesse. Die transrektale Palpation des Uterus stellt, trotz der Verfügbarkeit von kostengünstigen, laborgebunden Diagnoseverfahren wie dem Milchprogesterontest und dem PAG-Trächtigkeitstest, neben der Ultraschalldiagnostik nach wie vor die am meisten genutzte Methode der Trächtigkeitsfeststellung beim Rind dar (Youngquist, 2006). Sowohl zur Durchführung des Pre- und Ovsynch-Verfahrens sowie die kritische Gegenüberstellung verschiedener Trächtigkeitsuntersuchungsmethoden unter Praxisbedingungen in deutschen Milchviehherden gibt es aktuell nur wenige Studien. Daher ist die Zielstellung dieser Arbeit die terminorientierte Besamung mit verschiedenen Varianten des Ovsynch-Verfahrens in unterschiedlichen Herdenstrukturen in Zusammenarbeit mit Tierärzten, Besamungsbeauftragten und Landwirten zu erproben um die Durchführbarkeit unter hier gegebenen Bedingungen kritisch zu bewerten. In einer zweiten Fragestellung sollte ein Vergleich gängiger, praxisrelevanter Methoden der Trächtigkeitsfeststellung bei Milchkühen durchgeführt werden um deren Anwendbarkeit als Teil eines erfolgreichen Reproduktionsmanagements zu beurteilen.

Kapitel II

Kapitel II

Literaturübersicht

2.1 Physiologie des Brunstzyklus der Kuh

Der Sexualzyklus beim adulten weiblichen Milchrind hat eine Länge von 21 Tagen (Bostedt, 2006). Der Sexualzyklus ist gekennzeichnet von einer langen Luteal- (Tag 1-17) und einer kurzen Follikelphase (Tag 18-21). Der Brunstzyklus wird in die vier Phasen Postöstrus (Tag 1- 4), Interöstrus (Tag 5 - 18), Proöstrus (Tag 19 - 21) und der eigentlichen Brunst, dem Östrus (Tag 21, 6-30 Stunden Länge), untergliedert (Busch und Zerobin, 1995; Bostedt, 2006). Die während des Brunstzyklus ablaufenden Vorgänge sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

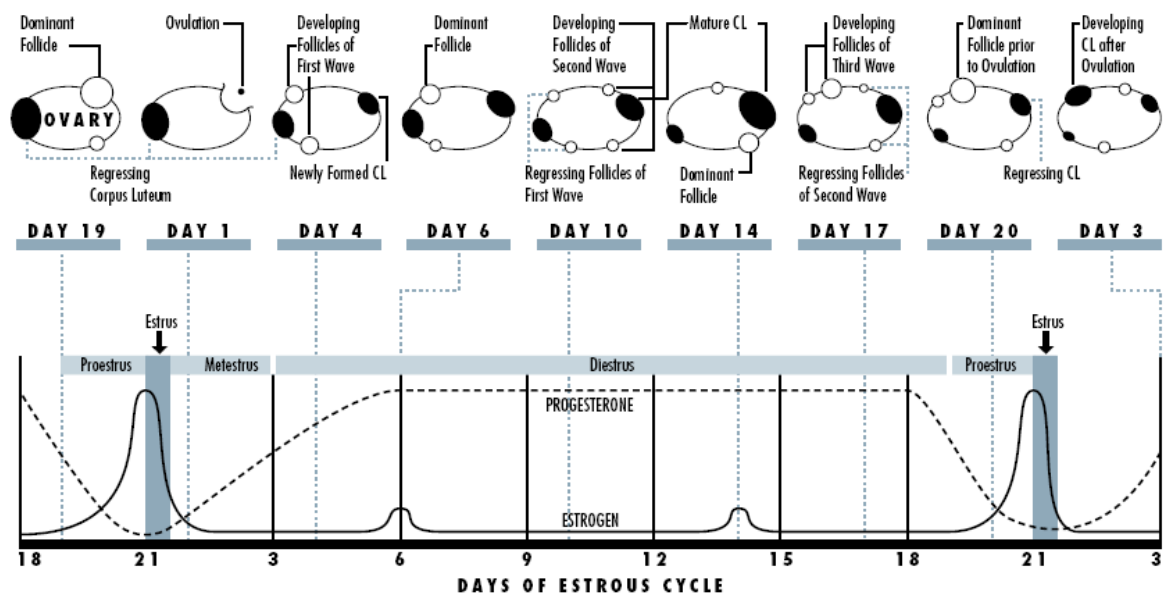


Abbildung 1: Veränderungen am Ovar während des Brunstzyklus beim Rind (nach O'Connor 1993)

Die Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus steuert die Sekretion der beiden Gonadotropine hypophysen Ursprungs, FSH und LH. Unter dem Einfluss von FSH reifen Follikel am Ovar in zwei bis vier Follikelreifungswellen in jedem Zyklus heran (Roche, 2004). Neben verlängerten Brunstzyklen werden höhere Konzeptionsraten bei Tieren mit drei Follikelreifungswellen beobachtet (Townson et al., 2002). Der so herangereifte präovulatorische Tertiärfollikel (Graafscher Follikel) sekretiert das brunstauslösende Östrogen und veranlasst die LH-Ausschüttung. Durch den LH-Peak induziert, erfolgt die

Ovulation 24 bis 30 Stunden nach Beginn des Östrus. Unmittelbar nach der Ovulation, noch unter Wirkung von LH, differenzieren sich die Follikel­epithel­zellen zu Granulosa­lutein­zellen, deren Gesamtheit das *Corpus luteum* (CL) darstellen. Der Gelbkörper, welcher bei erfolgter Konzeption als *Corpus luteum graviditatis* bestehen bleibt, synthetisiert große Mengen an Progesteron (Busch und Zerbin, 1995; Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000), das die Uterusmukosa auf die Implantation der befruchteten Oozyte vorbereitet und die Ausschüttung von FSH und LH verringert. Bei nicht erfolgter Konzeption wird durch PGF₂α uterinen Ursprungs um den Tag 14, nach dem Blütestadium des Gelbkörpers, die Luteolyse herbeigeführt. Diese ist etwa am Tag 17 des Brunstzyklus abgeschlossen (Bostedt, 2006).

2.2 Hormoneinsatz bei der Milchkuh

2.2.1 Wirkung und Einsatz von GnRH und dessen Analoga

Das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) gehört zur Gruppe der Neuropeptide und setzt sich aus zehn Aminosäuren zusammen. GnRH wird neben dem Hypothalamus auch durch anderes peripheres Gewebe wie die Gonaden exprimiert. Insgesamt 23 verschiedene GnRHs sind beim Wirbeltier (mGnRH = mammal GnRH oder auch GnRH1) bekannt (Schneider et al., 2006). GnRH wirkt regulierend auf den Hypophysenvorderlappen, wo dann LH und FSH produziert und freigesetzt werden (Bostedt, 2006). Endogenes GnRH wird in Endopeptidasen innerhalb von wenigen Minuten im Körper abgebaut (Cain, 1992). Bei der Milchkuh kommen GnRH und dessen synthetische Analoga Buserelin, Leuprolide, Nafarelin, Histrelin, Goserelin und Deslorelin zum Einsatz, die sich gegenüber dem natürlichen GnRH durch eine erhöhte Stabilität gegenüber einer enzymatischen Zerstörung, eine bis zu 200-fach höhere Rezeptorenaffinität sowie eine erhöhte Halbwertszeit auszeichnen (Thatcher et al., 1993; Conn und Crowley, 1994). Nach einer GnRH-Injektion kommt es innerhalb der nächsten 15 Minuten zu einem Anstieg der LH Serumkonzentration. Diese erreicht nach 120 Minuten ihren Höhepunkt. Nach etwa sieben Stunden erreicht sie wieder ihr Basalniveau. Ein Anstieg der FSH-Konzentration tritt etwa 45 Minuten nach GnRH-Applikation ein. Der Höhepunkt wird zeitgleich mit dem von LH erreicht (Kaltenbach et al., 1974). Zwischen der verabreichten GnRH-Dosis und der daraufhin freigesetzten LH-Menge besteht ein linearer Zusammenhang (Grunert und Zerbe, 1999a).

Neben der Ovulationsinduktion kommen GnRH-Agonisten in der Rinderpraxis aus folgenden Gründen zum Einsatz:

- *im Puerperium*: Häufig kommt es u. a. durch eine negative Energiebilanz in der Frühlaktation zu geringer GnRH-Produktion, gefolgt von gestörter Ovaraktivität (McDougall et al., 1995). Eine frühzeitige Aktivierung der Zyklusaktivität in Verbindung mit einer besseren Fruchtbarkeitsleistung durch den Einsatz von GnRH-Analoga zwischen dem 10. Tag p.p. (Fernandes et al., 1978) und dem 14. Tag p.p. (Nash et al., 1980) ist in der Literatur beschrieben.
- *zur KB*: Bei bis zu 30 % der besamten Tiere erfolgt die Ovulation verzögert, also mehr als 36 Stunden nach Brunstbeginn (Hernandez-Ceran et al., 1993). Durch die Applikation eines ovulationsinduzierenden GnRH-Agonisten lässt sich dem Gegenwirken. Auf diesem Prinzip basiert auch das CoSynch-Verfahren, bei dem terminorientierte Besamung und GnRH-Gabe zeitgleich erfolgen. Bessere Konzeptionsraten nach diesem Vorgehen werden jedoch nur bedingt berichtet (Walker et al., 2005).
- *nach KB*: Untersuchungen belegen, dass die Verabreichung von GnRH fünf bis 14 Tage nach der KB, das Auftreten der embryonalen Frühsterblichkeit verringern kann (Peters et al., 2000; Peters, 2005; Howard et al., 2006). GnRH kann die Freisetzung von Östradiol und die folgenden luteolytischen Vorgänge unterbinden (Macmillan et al., 1986; Hansel et al., 1991). Hansel et al. (1991) berichten einen Anstieg der Progesteronkonzentration, welcher in der luteotrophen Reaktion der kleinen Lutealzellen auf das durch die GnRH -Verabreichung freigesetzte LH begründet sein dürfte.
- *Therapie von Ovarzysten und Anöstrie*: Die erfolgreiche Therapie mit GnRH-Agonisten, hCG sowie einer PGF2 α - Behandlung 10 Tage später werden in der Literatur beschrieben (Kittok et al., 1973; Short et al., 1990; Amiridis, 2009; Enginler et al., 2012).
- *Ovulationssynchronisation*: (siehe hierzu Kapitel 2.3)

2.2.2 Wirkung und Einsatz von hCG

Das humane Chorion Gonadotropin stammt aus den plazentalen Syncytiotrophoblastzellen und zählt wie LH und FSH zur Familie der Glykoproteinhormone. hCG kann in Serum und Harn von Frauen während der Schwangerschaft ab der sechsten bis 14.

Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden (Hay und Lopata, 1988; de Medeiros und Norman, 2009). Im Gegensatz zu GnRH mit einer Halbwertszeit von rund fünf Stunden, ist hCG nach Verabreichung an Rinder bis zu 30 Stunden im Serum nachweisbar (Seguin et al., 1977; Chenault et al., 1990). Am weitesten verbreitet ist in der Rinderpraxis aufgrund seiner LH-ähnlichen Wirkung der Einsatz zur Ovulationsinduktion. Weitere Zeitpunkte und Indikationen der Anwendung sind:

- *vor KB*: Nutzung der positiven Wirkung auf Follikelreifung und Blutfluss im Follikelgewebe bei Verabreichung zwischen Tag 0 bzw. 7 des Zyklus (De Rensis und Peters, 1999; Aslan et al., 2011) sowie Erhöhung des Anteils der Tiere mit drei Follikelreifungswellen pro Zyklus (Sianangama und Rajamahendran, 1996).
- *hCG nach KB*: Verringerung der embryonalen Frühsterblichkeit durch die luteotrope Wirkung, d.h. Erhöhung der Progesteronsekretion des Gelbkörpers (Schmitt et al., 1996a) ab dem vierten Zyklustag (Helmer und Britt, 1987) sowie der Erhöhung des Anteils an großen Lutealzellen im Gelbkörper (Helmer und Britt, 1987).
- *Ovsynch plus hCG*: Der Austausch von GnRH gegen hCG zur Ovulationsinduktion im Rahmen des Ovsynch-Verfahrens ist vor allem durch die höhere Halbwertszeit von hCG und somit der besseren Luteinisierung des präovulatorischen Follikels begründet (Yen et al., 1968; Schmitt et al., 1996b). Es wird angenommen, dass durch die hohe Beständigkeit von hCG das Vorkommen von LH-Rezeptoren in Follikel- und Gelbkörpergewebe positiv beeinflusst wird. So führt die Verabreichung von hCG 48 Stunden nach PGF₂ α zu einer verlängerten Lebensdauer des *Corpus luteum*, folglich zu einer andauernden Progesteronsynthese und einer Aufrechterhaltung der Gravidität. Dennoch gibt es aktuell zahlreiche Studien, welche zwar eine höhere Progesteronserumkonzentration, basierend auf der hCG –Applikation, berichten, nicht jedoch höhere Trächtigkeitsraten im Vergleich zu Tieren, bei denen die Ovulation mit GnRH induziert wurde. (Schmitt et al., 1996c; De Rensis et al., 1999; De Rensis et al., 2002; De Rensis et al., 2008).

2.2.3 Wirkung und Einsatz von PGF₂ α und dessen Analoga

ProstaglandinF₂ α gehört neben PGD₂, PGE₂, PGI₂ und ThromboxanA₂ zur Familie der Prostanoiden, welche Produkte der Cyclooxygenase sind. Ausgangsstoffe sind mehrfach ungesättigte, essentielle Fettsäuren wie die Arachidonsäure. Im Stoffwechsel wird PGF₂ α innerhalb von Sekunden metabolisiert (Kindahl, 1980; Narumiya et al., 1999). Natürliches

PGF₂α (Dinoprost) sowie die synthetischen Prostaglandine F₂α Cloprostenol, Etiproston, Luprostiol und Tiaprost kommen in der Rinderpraxis hauptsächlich zur Herbeiführung einer Luteolyse zum Einsatz. Neben therapeutischen Zwecken wird PGF₂α insbesondere bei Verfahren der Brunst- und Ovulationssynchronisation eingesetzt.

- *PGF₂α im Puerperium:* Neben dem luteolytischen Effekt besitzt PGF₂α die Eigenschaft Kontraktionen der glatten Uterusmuskulatur hervorzurufen, welche die Uterusentleerung innerhalb der folgenden 96-120 Stunden bewirken (Seguin, 1980). Eine prophylaktische PGF₂α Behandlung zu einem frühen Zeitpunkt postpartum zeigen keinen Effekt auf den Puerperalverlauf (Grunert, 1999). Die zweimalige PGF₂α Behandlung von Tieren mit Anzeichen einer Endometritis in der vierten und sechsten Puerperiumwoche führt zu deutlich besseren Erstbesamungsergebnissen im Vergleich zu unbehandelten oder zu einem späteren Zeitpunkt behandelten Tieren (Falkenberg und Heuwieser, 2005).
- *Brunstsynchronisation:* PGF₂α-Brunstsynchronisationsprogramme basieren auf der Steuerung der Lutealphase und den in Abbildung 1 dargestellten Vorgängen am Ovar. Der Unterschied zur Ovulationssynchronisation liegt in der Notwendigkeit einer konsequenten, wenn auch zeitlich eingegrenzten, Brunstbeobachtung. In der Praxis kommen häufig zwei Verfahren zum Einsatz. Eine Variante erfordert eine Vorauswahl d. h. alle Tiere mit Gelbkörper erhalten eine PGF₂α-Injektion. Innerhalb der nächsten fünf bis sieben Tage erfolgt die Brunstbeobachtung und KB (Cavalieri et al., 2006). In einem anderen Verfahren erhalten alle Tiere ohne Kenntnis des Zyklusstandes PGF₂α. Alle Tiere, die innerhalb der nächsten 14 Tage in Brunst kommen, werden besamt, alle anderen erhalten eine wiederholte PGF₂α-Gabe und werden erneut auf Brunst beobachtet. In einer Studie von (Pursley et al., 1997a) zeigten 49 % der Kühe und 40 % der Rinder nach der ersten PGF₂α-Behandlung eine nutzbare Brunst mit Konzeptionsraten zwischen 46 und 71 %. Auf die zweite PGF₂α-Behandlung reagierten weitere 33 % der Kühe und 37 % der Rinder. Trächtigkeitsraten lagen zwischen 46 und 83 %.
- *Geburtseinleitung, Geburtssynchronisation und Trächtigkeitsabbruch:* Bei pathologischem Verlauf der Trächtigkeit (Steinfrucht, Eihautwassersucht, Überschreitung der Trächtigkeitsdauer) oder saisonaler Abkalbung in Fleischrinderherden, kann durch die Verabreichung von PGF₂α in Abhängigkeit von Trächtigkeitsstadium und Präparatdosierung binnen 30 bis 60 Stunden die Geburt eingeleitet werden (Schulz, 1993).

2.3 Terminorientierten Besamung mittels Ovulationssynchronisation

2.3.1 Ovsynch-Verfahren (GPG)

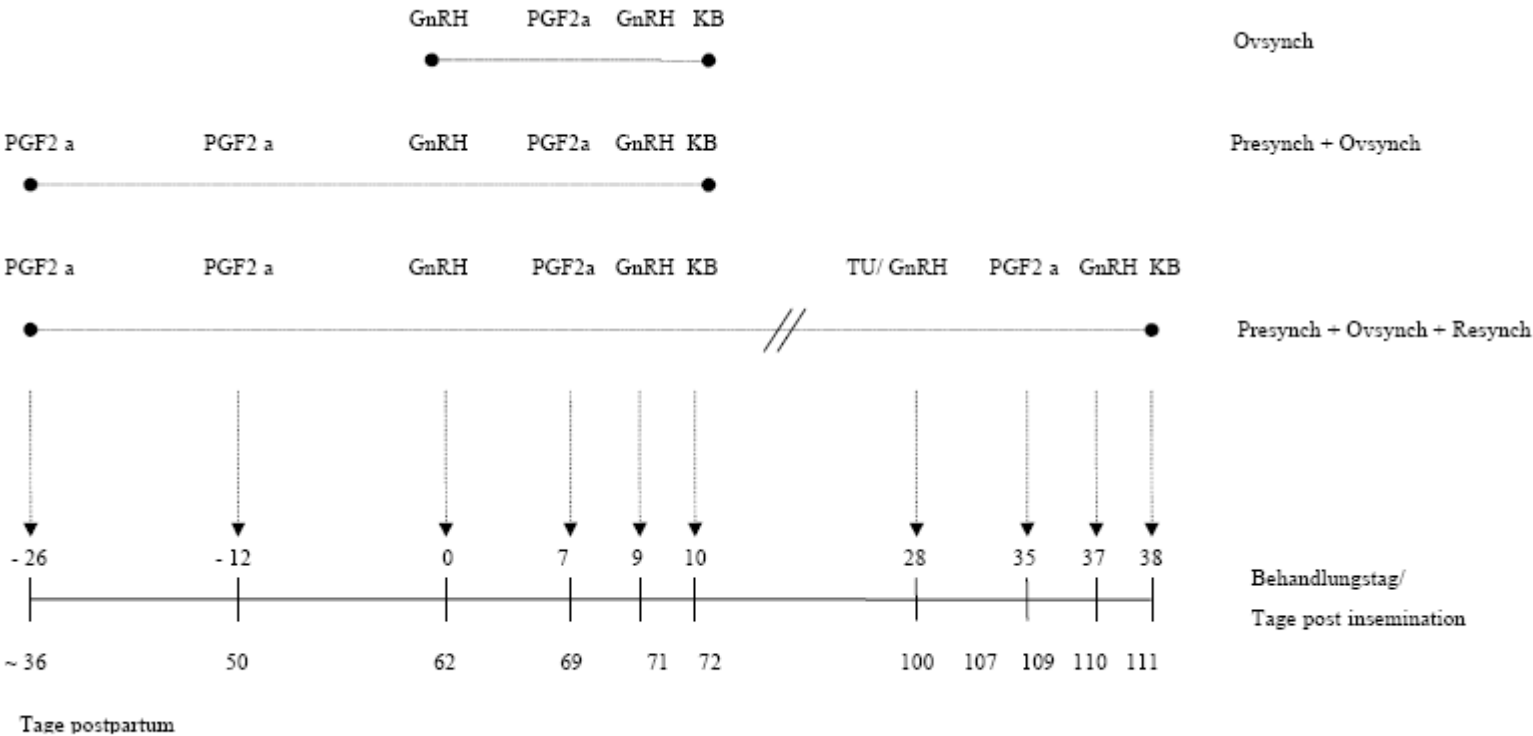
Das Ovsynch-Verfahren (Abb. 2) besteht aus einer GnRH-Injektion (i.d.R. GnRH Analoga Buserelin), die zyklusunabhängig verabreicht wird (Tag 0). Diese erste GnRH-Injektion führt bei 40 bis 90 % der behandelten primi- und pluriparen Kühe zu einer Erhöhung der LH- und Östradiol-Plasmakonzentration (Thatcher et al., 1993), wodurch die Ovulation eines vorhandenen dominanten Follikels ausgelöst und innerhalb der darauf folgenden daraolgenden zwei bis vier Tage eine neue Follikelwelle angestoßen wird (Pursley et al., 1995; Saldarriaga et al., 2007). In der Regel führt eine einmalige GnRH-Gabe in den folgenden drei bis vier Tagen zur Selektion eines dominanten Follikels, welcher nach einer durch PGF₂ α -induzierten Luteolyse zum Graaf'schen Follikel heranreift (Twagiramungu et al., 1994; Twagiramungu et al., 1995). Nullipare Tiere reagieren mit durchschnittlichen Ovulationsraten von 54 % deutlich schlechter auf die erste GnRH-Behandlung (Pursley et al., 1995; Rivera et al., 2004). Im Vergleich zu den nach spontan erfolgter Ovulation angebildetem *Corpus luteum*, weisen Tiere nach induzierter Ovulation häufig kleinere *Corpora lutea* auf (Pursley et al., 1995). Sieben Tage (Tag 7) nach der ersten GnRH-Injektion folgt die Verabreichung von PGF₂ α (i. d. R. Cloprostenol oder Dinoprostum), um die Regression eines möglicherweise angebildeten *Corpus luteum* zu bewirken. Durch eine zweite GnRH- (oder auch hCG) Injektion zwei Tage später (Tag 9) lässt sich der endogene LH-Peak verstärken (Kaim et al., 2003). Die Ovulation des präovulatorischen Follikels wird so auf einen Zeitraum von acht Stunden (24-32 Stunden später) synchronisiert. Die künstliche Besamung erfolgt ohne Brunstbeobachtung rein terminorientiert 16 bis 20 Stunden später, um die Präsenz befruchtungsfähiger Spermatozoen zu gewährleisten. Die zu erzielenden Konzeptionsraten nach Ovsynch-Behandlung werden in der Literatur mit 24 % und 55 % (Pursley et al., 1995; Pursley et al., 1997b; Xu und Burton, 1999; DeJarnette und Marshall, 2003; Keskin et al., 2010) angegeben (De Rensis et al., 2002). De Rensis et al. (2002) berichten eine Überlegenheit von Ovulationssynchronisationsprogrammen (GPG und GnRH-PGF₂-hCG) gegenüber brunstorientierter Besamung vor allem in den Sommermonaten, wenn Hitzestress sich negativ auf Fruchtbarkeit und Brunstverhalten auswirkt. Häufig jedoch, fallen die Konzeptionsraten bei terminorientiert besamten Tieren im Vergleich zu Tieren mit natürlicher Brunst niedriger aus. In der Literatur wird hier vor allem die möglicherweise unzulängliche Luteinisierung des dominanten Follikels durch mangelnde LH-Ausschüttung

als Folge der kurzen Halbwertszeit von GnRH als ursächlich beschrieben. Weiter wird von daraus resultierenden schwachen Gelbkörpern berichtet, die in ihrer Fähigkeit Progesteron zu synthetisieren beeinträchtigt sind (Southee et al., 1988; Schmitt et al., 1996b) und somit ein Bestehen der Trächtigkeit nicht gewährleisten können. In Tabelle 1 sind Nutzen und Schwachstellen des Ovsynch-Verfahrens gegenübergestellt.

Tabelle 1: Nutzen und Schwachstellen des Ovsynch-Verfahrens (Pursley et al., 1995; Pursley et al., 1997a; Pursley et al., 1997b; Stevenson et al., 1999; Fricke, 2006; Aslan et al., 2011):

Vorteile:	Nachteile:
<ul style="list-style-type: none"> • Keine Brunstbeobachtung notwendig • Brunstnutzungsrate = 100 % • Systematisiertes Reproduktionsmanagement • Nur ein Besamungstermin • Zyklusunabhängig, auch bei Azyklie • Präparatkosten werden durch kürzere Rast- und Gützeiten kompensiert 	<ul style="list-style-type: none"> • Geringere Konzeptionsraten möglich • Eventuell auftretende Kurzzyklen durch unvollständige Luteinisierung des präovulatorischen Follikels • Es gibt Hinweise auf eine Erhöhung der embryonalen Frühsterblichkeit durch verringerte Progesteronsynthese im CL

Abbildung 2: Behandlungspläne für den Einsatz des Ovsynch-Verfahrens sowie in Kombination mit dem Pre- und Resynch-Verfahren unter Berücksichtigung der Zeit post partum (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999; Fricke et al., 2003)



2.3.2 Presynch-Verfahren (PGF2 α)

Beim Presynch-Verfahren (Abb. 2) handelt es sich um eine Vorsynchronisation, welche dem Ovsynch-Verfahren vorangestellt ist. Durch die relativ lange Lutealphase wird das Ovsynch-Verfahren häufig zu einem Zeitpunkt initiiert, an dem sich am Ovar kein dominanter, ovulationsfähiger Follikel befindet. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich der Erfolg des Ovsynch-Verfahrens erhöhen lässt, wenn sich die Tiere zum Zeitpunkt der erste GnRH-Gabe zwischen dem fünften und 12. Zyklustag befinden (Peters und Pursley, 2002; Ribeiro et al., 2011). Um dies zu erreichen, hat sich die zweimalige Verabreichung von PGF2 α im Abstand von 14 Tagen, mit der zweiten Injektion 12 Tage vor Beginn des Ovsynch-Verfahrens, bewährt (Vasconcelos et al., 1999; Aslan et al., 2011). In Abhängigkeit des Behandlungsprogramms und den eingesetzten Präparaten bzw. Wirkstoffen, konnten die Trächtigkeitsraten verbessern, zum Teil drastisch erhöht werden (Moreira et al., 2001; Thatcher et al., 2002; Navanukraw et al., 2004). Im Interesse der Arbeitswirtschaftlichkeit, mit dem Hintergrund die ersten vier Injektionen (PGF2 α - PGF2 α – GnRH - PGF2 α) am selben Wochentag vorzunehmen, kann eine Verlängerung des Intervalls zwischen der zweiten PFG2 α und der ersten GnRH von 12 auf 14 Tage ohne eine Verschlechterung der Trächtigkeitsergebnisse vorgenommen werden. Im Vergleich zum Ovsynch-Verfahren wurden sowohl höhere Ovulationsraten (70 % vs. 81 %) als auch Konzeptionsraten (37 % vs. 50 %) erreicht (Navanukraw et al., 2004). Eine weitere Modifikation des Presynch-Verfahrens zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Ovulationsrate, wenn das Intervall zwischen der zweiten PGF2 α - und der ersten GnRH-Gabe auf 11 Tage reduziert werden würde (Galvao et al., 2007).

2.3.3 Resynch-Verfahren (GPG)

Da auftretende Kurzzyklen (Zykluslänge etwa 16 Tage), bedingt durch unzureichende Synchronisationsraten nach Ovsynch-Behandlung (Cordoba und Fricke, 2002) und verlängerte Verzögerungszeiten bei Tieren, die nicht erfolgreich besamt wurden (Chebel et al., 2003), als Schwachstellen des Ovsynch-Verfahrens bekannt sind, wurde das Resynch-Verfahren, welches ebenfalls auf der Steuerung von Luteal- und Follikelphase basiert, entwickelt. Fricke et al. (2003) untersuchten, im Interesse einer kontinuierlichen Wiederbelegung nicht tragender Tiere, drei Verfahren zur Resynchronisation gefolgt von einer erneuten terminorientierten KB. Um sicherzustellen, dass aus arbeitswirtschaftlichen

Gründen, wie beim Ovsynch-Verfahren, nur an zwei Wochentagen Tiere mit Präparaten behandelt werden müssen, wurden die Intervalle 19, 26 und 33 Tage nach der Ovsynch-KB gewählt, um das Resynch-Verfahren einzuleiten. Zunächst erhielten alle Tiere, unabhängig vom Trächtigkeitsstatus am 19. Tag nach KB eine GnRH-Injektion. Sieben Tage später erfolgte eine Trächtigkeitsfeststellung mittels Ultrasonographie in Kombination mit der PGF2 α -Behandlung aller Tiere, die als nichtträchtig identifiziert wurden. Weitere zwei Tage später, am Tag 28 nach der vorherigen Belegung, erfolgte ähnlich wie beim Co-Synch-Verfahren eine weitere GnRH-Gabe zeitgleich mit der erneuten terminorientierten KB. Bei diesem Vorgehen wurden Konzeptionsraten von 23 % erzielt. In einem weiteren von Fricke et al. (2003) untersuchten Verfahren wurden alle Tiere am Tag 26 bzw. Tag 33 mittels Ultrasonographie auf Trächtigkeit untersucht. Nur negative Tiere erhielten GnRH, PGF2 α weitere sieben Tage später, gefolgt von einer zweiten GnRH-Gabe und terminorientierten Besamung neun Tage nach Einleitung der Resynchronisation. So konnten die Konzeptionsraten auf 34 % bzw. 38 % gesteigert werden. Nach dem gleichen Behandlungsschema, beginnend ab Tag 21 p.i, erzielten Chebel et al. (2003) eine Konzeptionsrate

71 %. Beim Monitoring der Ovarreaktion zeigten sich verbesserte Konzeptionsraten bei Tieren, die bereits während der Ovsynch-Behandlung hohe Synchronisationsraten aufwiesen. Ein Einfluss der ersten GnRH-Gabe auf embryonale Mortalität oder Trächtigkeitsabbruch nicht bekannt (Chebel et al., 2003).

In der Praxis hat sich überwiegend das in Abbildung 2 dargestellte Resynchronisationsverfahren etabliert (Silva et al., 2007b). Weitere Verfahren der Resynchronisation mittels Progesteron (CIDR) sind in der Literatur beschrieben (Stevenson et al., 2003; El-Zarkouny und Stevenson, 2004; Cavalieri et al., 2005a; Thatcher et al., 2006). Ergebnisse aus der Literatur lassen vermuten, dass eine Kombination der drei Verfahren, Presynch, Ovsynch und Resynch, die besten Trächtigkeitsergebnisse erwarten lassen könnte (Fricke et al., 2003).

2.4 Trächtigkeit und Trächtigkeitsuntersuchung beim Rind

2.4.1 Trächtigkeit beim Rind

Die Tragedauer wird vom Alter des Muttertieres, Genetik sowie dem Geschlecht der Frucht bestimmt und beträgt bei milchbetonten Rassen im Mittel 277 Tage (Nogalski und Piwczynski, 2012). Embryonale Entwicklung, Implantation und Plazentation sowie die normale Entwicklung der Trächtigkeit beim Wiederkäuer sind in der Literatur vielfach beschrieben (Wooding, 1992; Rüsse und Grunert, 1993; Busch und Zerobin, 1995; Geisert und Malayer, 2000; Jainudeen und Hafez, 2000; McGeady et al., 2006). Die Trächtigkeit beim Rind kann auf einer Zeitachse wie folgt dargestellt werden:

- Frühembryonale Phase (bis 30. Trächtigkeitstag)
- Kleinsäckchenstadium (31. bis 60. Tag)
- Großsäckchenstadium (61. bis 90. Tag)
- Ballonstadium (91. bis 130. Tag)
- Senkungsstadium (131. bis 180. Tag)
- Endstadium (ab 181. Tag) - Anlagen vollständig, reines Wachstum (van der Weiden und Taverne, 1999).

2.4.2 Frühe Trächtigkeitsuntersuchung und embryonale Frühsterblichkeit

Die Befruchtungsraten beim Milchrind liegen zwischen 90 und 100 %. Demgegenüber steht eine tatsächliche Abkalbrate von etwa 40 %. Von der embryonalen Frühsterblichkeit bis zum 42. Tag sind insbesondere Hochleistungsherden (Diskin und Morris, 2008) sowie Kühe ab der dritten Laktation (Gehrke und Zbylut, 2011) betroffen. Etwa 70 % bis 80 % der gesamten embryonalen Verluste entstehen zwischen dem achten und 16. Tag der Trächtigkeit. Lediglich 10 % der Embryonen werden zwischen dem 16. und 42. Tag resorbiert. Weitere sieben Prozent Verluste entstehen durch Fruchtresorption im späteren Trächtigkeitsstadium (Diskin und Morris, 2008). Während beim frühen embryonalen Fruchttod bis zum 12. Tag der Zyklus der Tiere unbeeinflusst bleibt, führt der embryonale Fruchttod zu einem späteren Zeitpunkt dazu, dass die Tiere erst wieder in Brunst kommen, wenn sich der Gelbkörper zurückgebildet hat. Gründe: Die embryonale Sterblichkeit ist multifaktoriell bedingt, wobei Management und Fütterung eine übergeordnete Rolle spielen (Leroy et al., 2008a; Leroy et al., 2008b; Gehrke und Zbylut, 2011). Vielfach

diskutiert ist auch der Einfluss von rektalen Untersuchungsmethoden (z. B. durch den Eihautgriff) im frühen Trächtigkeitsstadium auf die embryonale Frühsterblichkeit (Ball und Carroll, 1963; Abbitt et al., 1978; Franco et al., 1987; Baxter und Ward, 1997; Romano et al., 2007; Romano et al., 2011).

Aufgrund des Auftretens von Fruchtverlusten, vor allem während der frühen Trächtigkeit, ist beim Einsatz aller frühen Untersuchungsmethoden eine Nachuntersuchung um den 60. Tag ratsam (Vasconcelos et al., 1999; Cordoba und Fricke, 2002).

2.4.3 Trächtigkeitsuntersuchung mittels transrektaler Palpation

Laut aktueller repräsentativer Untersuchungen in Milchviehbeständen ist die Rektalisierung, nicht zuletzt aus wirtschaftlichen und praktikablen Gründen, mit einem Anteil von 77 % bis 88 % die am häufigsten angewandte Trächtigkeitsuntersuchungsmethode in der Rinderpraxis (Rosenbaum und Warnick, 2004; Caraviello et al., 2006). In Abhängigkeit des Untersuchungszeitpunktes sind die Merkmale Doppelwandigkeit und Asymmetrie (ab Tag 28), Fluktuation im graviden Horn (ab Tag 30), Verminderung der Uteruswandstärke (ab 6. Woche) sowie Ballotement und fühlbare Karunkel (ab 12. Woche) Zeichen für eine bestehende Gravidität. Um den 121. Trächtigkeitstag kommt es zu einem Absenken des Uterus in die Bauchhöhle, woraufhin die korrekte Diagnosefindung erschwert sein kann (Busch und Zerobin, 1995). Die Trächtigkeitsfeststellung durch ein Palpieren der Eihäute (Eihautgriff, Abb. 3) zur Prüfung auf Doppelwandigkeit ist theoretisch ab dem 30. Trächtigkeitstag möglich (Alexander et al., 1995; Thompson et al., 1995; van der Weiden und Taverne, 1999), wird jedoch häufig nicht vor dem 40. Tag durchgeführt.

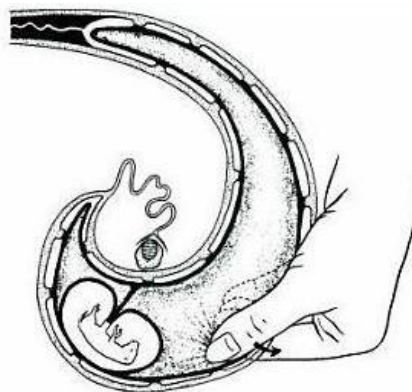


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Eihautgriffs um den 35. Trächtigkeitstag (nach Zürich aus Fruchtbarkeitsstörungen beim weiblichen Rind, 1999)

Die Herbeiführung einer erhöhten embryonalen Sterblichkeit durch manuelle Ruptur beim Betasten der Uterushörner im frühen Trächtigkeitsstadium (Tag 30-45) wird in der Literatur vielfach beschrieben und diskutiert. Eine Untersuchung von Richardson et al. (2010) beschäftigt sich mit dem Einfluss von Erfahrung des Untersuchers und Untersuchungszeitpunkt auf die embryonale Sterblichkeit. Tiere, die vor dem 53. Tag palpirt wurden, zeigten ein signifikant erhöhtes Risiko von Frühaborten. Tendenziell reduzierte sich diese Gefahr mit der Erfahrung des Untersuchers. Frühere, groß angelegte Studien von Vaillancourt et al. (1979), Franco et al. (1987) und Warnick (1995) beschreiben einen Anstieg der embryonalen Verluste von 11.8 % und 8.3 % bei Tieren, die zwischen dem 36. bzw. 46. Tag rektal untersucht wurden. Die Kontrollgruppen lagen zwischen 4.3 und 4.4 %. Während die Ergebnisse anderer Autoren zu vergleichbaren Werten kommen (Abbitt et al., 1978), stellten verschiedene andere Autoren weder einen Einfluss des Eihautgriffs um den 30. Tag noch der transrektalen Palpation im Allgemeinen bis zum 60. Tag fest (Alexander et al., 1995; Romano et al., 2006; Romano et al., 2007; Romano et al., 2011).

2.4.4 Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultrasonographie

Neben der transrektalen Palpation ist der Einsatz eines Ultraschallgeräts in vielen Betrieben das eingesetzte Verfahren zur Trächtigkeitsfeststellung (Fricke, 2002). Die Ultrasonographie, als Bestandteil des Fruchtbarkeitsmanagements, hat zahlreiche weitere diagnostische Einsatzmöglichkeiten wie die Identifikation von Zwillingsträchtigkeiten, Geschlechtsbestimmung beim Fetus sowie das Erstellen von Ovar- und Uterusbefunden (Fricke, 2002). In der Literatur werden zuverlässige Aussagen über den Trächtigkeitsstatus mit einer Spezifität von 83 % und einer Sensitivität von 95 % ab dem Tag 26 p.i. beschrieben (Pieterse et al., 1990; Szenci et al., 1998). Ab einem Untersuchungszeitpunkt von 37 p.i. Tagen und mehr erreichen beide quantitative Parameter annähernd 100 %. Die Anforderungen an das portable Ultraschallgerät sind mindestens ein Linear-Array-Schallkopf mit nutzbaren, umschaltbaren Frequenzen von 5 und 7.5 MHz bzw. 6 und 8 (Abbitt et al., 1978) MHz. Bei der eigentlichen Untersuchung werden beide Uterushörner bis in die Uterushornspitzen von lateral und von kaudal nach kranial geschallt. Dabei stellt sich beim Vorliegen einer Trächtigkeit zwischen dem Tag 25 und 30 p.i. die Fruchtblase mit einem Durchmesser von 10-20 mm und ab dem Tag 28 p.i. ein Embryo mit Herzschlag dar. Auch das Untersuchen der Ovarien wird in diesem Zusammenhang empfohlen (Pierson und Ginther, 1988; Szenci et al., 1998; Cordoba und Fricke, 2002).

2.4.5 Milchprogesterontest zur Trächtigkeitsfeststellung

Progesteron, das Gelbkörper- oder Lutealhormon, ein Steriodhormon, welches während des Zyklus vom *Corpus luteum periodicum* und während der Trächtigkeit vom *Corpus luteum graviditatis* sowie in geringen Mengen von der Plazenta synthetisiert wird (Harisch und Schwarz, 1985; Gasse et al., 1987; Grunert und Zerbe, 1999b). Zwischen zwei Tagen vor und zwei Tagen nach der Brunst liegen sehr niedrige Milch- und Serumprogesteronkonzentrationen vor (Hoffmann et al., 1976). Während der Anwesenheit eines Gelbkörpers bzw. während einer Trächtigkeit ist die Progesteronkonzentration erhöht (Caudle et al., 1980). Im Rahmen der Trächtigkeitsfeststellung können daher mit der Bestimmung der Milch- oder Serumprogesteronkonzentrationen folgende Fragestellungen geklärt werden: Befindet sich die Kuh in der Nähe einer Brunst? Liegt eine Trächtigkeit vor? Des Weiteren kann der Test dazu dienen, azyklische Tiere sowie Kühe mit persistierendem CL, verzögerter Ovulation und embryonalen Fruchttod zu identifizieren (Abb. 4, Lucy et al. 2011).

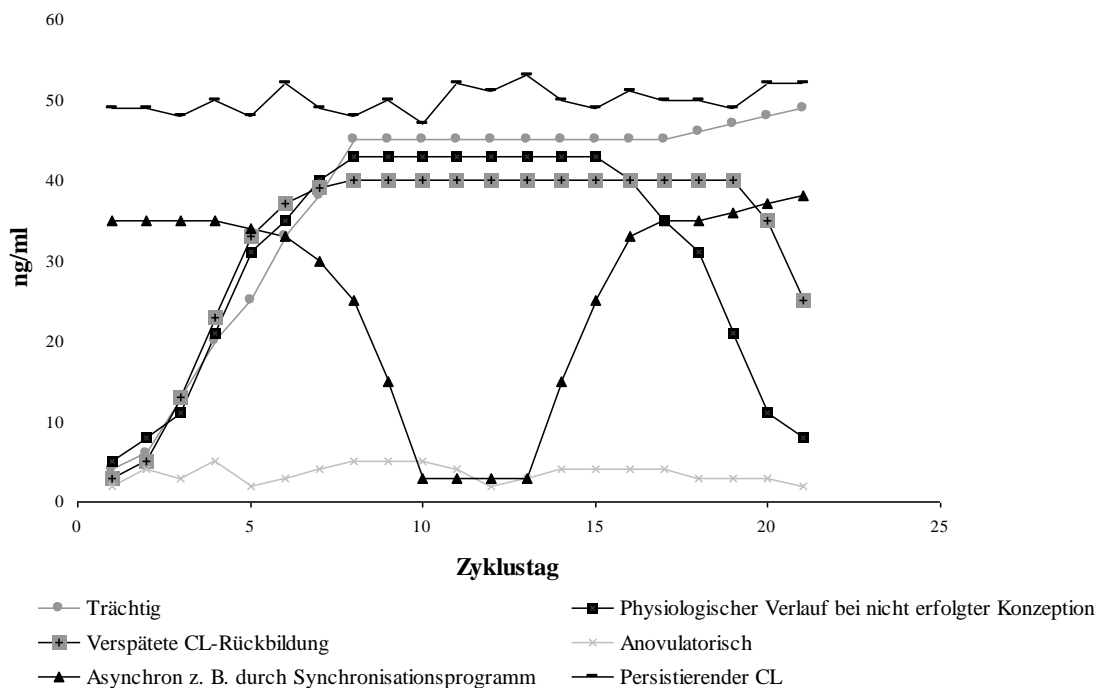


Abbildung 4: Progesteronkonzentrationsverlaufskurven bei (a) erfolgter Konzeption, (b) normalem Zyklusverlauf ohne erfolgte Konzeption, (c) verspäteter Luteolyse, (d) eingestellter Ovaritätigkeit, (e) unzureichender Vorsynchronisation mittels PGF2 α -Programm und (f) persistierendem Gelbkörper (frei nach Lucy et al. 2011)

Die Bestimmung der Milch- und Serumprogesteronkonzentration mittels radioimmunologischem Nachweisverfahren wurde in den frühen 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt (Hoffmann und Hamburger, 1973). Nicht zuletzt durch die Verfügbarkeit so genannter „Stallgassentests“ oder „Cowside-tests“ mit der die Milchkonzentration direkt vor Ort, d.h. im Stall, bestimmt werden kann, stellt der Progesterontest ein wertvolles Instrument im Reproduktionsmanagement dar. Diese Tests wurden in der Vergangenheit erfolgreich evaluiert (Nebel, 1988; Möller und Holtz, 1989a, b; Ruiz et al., 1992; Bajema et al., 1994).

Generell können nichtträchtige Tiere mit einer Milchprogesteronkonzentration von < 2.0 ng/ml (Hoffmann et al., 1976) bzw. 1.0 ng/ml (Lucy et al., 2011), bei Probenentnahme um den 21. Tag nach KB, theoretisch mit einer Sicherheit von annähernd 100 % identifiziert werden. Bei einmaliger Beprobung um Tag 21 nach der KB kann die Aussage „trächtig“ nach Literaturangaben bei einem angenommenen Grenzwert von 10 ng/ml mit einer Sicherheit von 82 % (Niggemeyer et al., 1990) bzw. 86 % bei einem Grenzwert von 11 ng/ml gestellt werden (Hoffmann und Hamburger, 1974). Durch mehrmalige Beprobung an den Tagen 21 und 28 sowie an den Tagen 21, 28 und 49 kann die Genauigkeit auf 90 % bzw. 97 % erhöht werden (Niggemeyer et al., 1990). Die Durchführung des heute häufig angewandten ELISA zur Bestimmung der Milchprogesteronkonzentration ist bei Möller (1991) im Detail dargestellt.

In der Literatur wird eine bestehende Korrelation zwischen Milchfettgehalt und Progesteronkonzentration beschrieben (Hoffmann und Hamburger, 1973; Ginther et al., 1974; Ginther et al., 1976). Die im Serum nachweisbare Progesteronkonzentration ist signifikant niedriger als die in Milch, wobei im Milchfett eine bis zu 100-fache Progesteronkonzentration im Vergleich zu Magermilch vorliegt (Heap et al., 1973; Hoffmann et al., 1976; Meyer und Güven, 1986). Daher ist zu Berücksichtigen, dass bei Mehrfachbeprobung die Probe immer aus der gleichen Gemelksfraktion stammt (Meyer und Güven, 1986).

2.4.6 Bestimmung trächtigkeitsassoziierte Proteine

Die Trächtigkeitsassoziierten- und spezifischen Proteine „pregnancy-associated glycoprotein“ (PAG) und „Pregnancy-specific protein“ (PSPB), die der Familie der Aspartat-Proteasen zugehörig sind (Telugu et al., 2009), wurden erstmals in den frühen

80er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt und fortwährend beschrieben (Butler et al., 1982; Sasser et al., 1989; Xie et al., 1991; Zoli et al., 1991; Xie et al., 1994; Beckers, 1999; Beckers et al., 1999). Aufgrund des sehr ähnlichen Aminosäurekonstruktes fasste man diese plazentalen Glykoproteine zu den so genannten boPAG-1 zusammen (Beckers et al., 1999; Silva et al., 2007a). Obwohl bislang 21 bovine PAGs in der Literatur beschrieben sind (Green et al., 2000), ist insgesamt noch wenig über die PAGs und deren exakte Funktion während der Trächtigkeit bekannt. PAG wird von mono- und binuklearen Zellen (BNC) im Trophoblast und Trophoektoderm (Wooding, 1983, 1992; Green et al., 2000) bereits ab der Implantation, der Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel ab dem 16. Tag (Hartwig, 1993), gebildet und an den maternalen Blutkreislauf abgeben. Im Serum des Muttertieres kann das PAG mittels Radioimmunoassay (Zoli et al., 1992), ELISA (Friedrich und Holtz, 2004) oder einem auf dem ELISA-Prinzip basierenden Schnelltest (Green et al., 2009) nachgewiesen werden. Obwohl deutlich früher nachweisbar, lassen sich zuverlässige Aussagen über den Trächtigkeitsstatus mittels PAG-Bestimmung ab dem 28. (Zoli et al., 1992) bzw. 30. (Friedrich und Holtz, 2004) treffen. Die Genauigkeit des PAG-Trächtigkeitstests liegt in Abhängigkeit des Untersuchungszeitpunktes zwischen 94 % (ab Tag 30) und 99 % (ab Tag 40) (Friedrich und Holtz, 2010).

Zu Beginn der Trächtigkeit bis etwa zum 150. Tag steigt die PAG-Konzentration im Serum nur langsam und stufenweise (Abb. 5). Rund 10 Tage vor der Geburt kommt es zu einem starken Anstieg auf bis zu über 1.000ng/ml. Aufgrund der hohen Konzentrationen vor der Kalbung und der langen Halbwertszeit von PAG kann bis zu 100 Tage postpartum Rest-PAG nachweisbar sein (Zoli et al., 1992). Daher ist der Einsatz des PAG-Trächtigkeitstests bei sehr früh besamten Tieren mit falsch-positiven Diagnosen einhergehend. Im frühen Trächtigkeitsstadium berichten verschiedene Autoren deutlich reduzierte Halbwertszeiten von drei bis neun Tagen (Mialon et al., 1993; Szenci et al., 2003; Prvanovic et al., 2009; Giordano et al., 2012). Demnach stellt die Bestimmung der PAG-Konzentration auch ein Hilfsmittel zur Überwachung der embryonalen Vitalität und der frühzeitigen Erkennung der embryonalen Frühsterblichkeit.

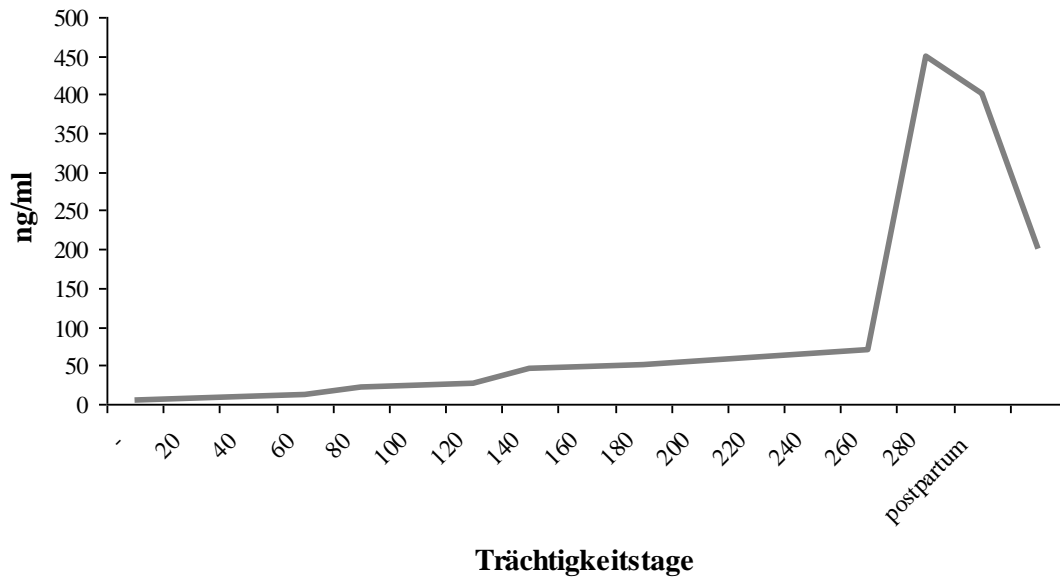


Abbildung 5: PAG-Verlauf während der Trächtigkeit sowie den ersten Wochen post partum (nach Friedrich und Holtz, 2004)

Sowohl PAG-Konzentration als auch PAG-Verlaufsprofil sind tierindividuell und können abhängig von Trächtigkeitsstadium, Fötenanzahl, Geschlecht des Fötus sowie dem eingesetzten Bullen sein (Zoli et al., 1992; Dobson et al., 1993; Lopez-Gatius et al., 2007). Eine negative Korrelation zwischen gemessener PAG-Konzentration und Milchleistung, insbesondere in der Früh-laktation sind in der Literatur beschrieben (Lopez-Gatius et al., 2007). Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass die Expression von PAG durch die Vermeidung von Hitzestress und die Verbesserung des Kuh-Komforts begünstigt wird und somit ein positiver Einfluss auf die Trächtigkeit zu erwarten ist (Serrano et al., 2009). Unter Kenntnis der tierindividuellen Schwankungen und größtenteils noch unbekanntem Einflussfaktoren auf die PAG-Konzentration, wird insbesondere bei einem frühen Untersuchungszeitpunkt und einem PAG-Wert zwischen 1.0 ng/ml und 2.0 ng/ml, eine Nachkontrolle etwa eine Woche später empfohlen (Friedrich und Holtz, 2004, 2010). Es ist bekannt, dass PAG auch in der Milch nachweisbar ist. Jedoch beträgt die Konzentration in der Milch nur etwa 3 % bis 8 % deren im Serum. Aktuelle Untersuchungen zufolge erbringt der Nachweis von PAG in der Milch vor dem 150. Tag keine zuverlässigen Aussagen über den Trächtigkeitsstatus (Friedrich und Holtz, 2010). Daher gibt es derzeit Bemühungen ein geeignetes Nachweisverfahren für PAG in Milch zu etablieren (Han et al., 2011).

Kapitel III

Kapitel III

Published in: *Reproduction in Domestic Animals*

Februar 2016:85-90.

Implementation of Fixed-time Insemination in Medium-sized Family Farms in Pasture Regions of Northern Germany

D Marthold¹, J Detterer², U Koenig von Borstel¹, M Gauly³ and W Holtz^{1*}

¹ *Department of Animal Science, Georg-August-University Goettingen, Goettingen, Germany*

² *Verein Ostfriesischer Stammviehzuechter, AI and ET Centre, Georgsheil, Germany*

³ *Faculty of Science and Technology, Free University of Bolzano, Universitaetsplatz 5, 39100 Bozen, Italy*

Abstract

A field study was conducted aimed at a) evaluating the practicability of a fixed-time insemination regime for medium-sized dairy operations of northwestern Germany, representative for many regions of Europe in terms of applicability, reproduction figures and economic considerations and b) substituting hCG for GnRH as ovulation inducing agent at the end of a presynch or ovsynch protocol in an attempt to reduce the incidence of premature luteal regression. Cows of two herds synchronized by presynch and two herds synchronized by ovsynch protocol were randomly allotted to three subgroups; in one group ovulation was induced by the GnRH analog buserelin, in another by hCG whereas the third group remained untreated. The synchronized groups were fixed-time inseminated; the untreated group bred to observed estrus. Relative to untreated herd mates, pregnancy rate in cows subjected to a presynch protocol with buserelin as ovulation inducing agent was 74%; for hCG it was 60%. In cows subjected to an ovsynch protocol the corresponding relative pregnancy rates reached 142% in the case of buserelin and 97% in the case of hCG. Average service interval was shortened by one week in the presynch- and delayed by

two weeks in the ovsynch group. It may be concluded that fixed time insemination of cows synchronized via ovsynch protocol with buserelin as ovulation inducing agent is a feasible means of improving the efficiency of herd management due to the disappearance of heat detection, standardized pregnancy check and immediately reinsamination of cows open in medium-sized dairy operations. The substitution of hCG for buserelin is not advisable.

3.1 Introduction

With increasing herd size and milk yield, estrus detection has become a serious problem in many dairy operations worldwide (Senger 1994, Lucy 2001, Lopez et al. 2004, de Vries et al. 2005, Wiltbank et al. 2006, Phillips 2010). Technical aids may, to an extent, alleviate this problem, yet at considerable effort and expense (Holtz and Meinhardt 1993, Xu et al. 1998, De la Rue et al. 2013, Fricke et al. 2014). In many pasture-based dairy operations of north-western Germany the difficulties encountered with estrus detection compel growing numbers of farmers to run a breeding bull with the herd rather than relying on artificial insemination. In recent years the proportion of artificially inseminated cows declined by about 2% per year, whereas the number of breeding bulls sold at auctions increased steadily. According to official sources the proportion of artificially inseminated cows in Germany declined from 94% in 1990 to 77% in 2013 (ADR 2013). A system of fixed-time insemination might be instrumental in countering that trend. Since the introduction of the ovsynch protocol for synchronizing estrus and ovulation in cows by Pursley and Wiltbank in 1995, fixed-time insemination has become a routine measure in increasing numbers of dairy operations. The classical ovsynch protocol comprises administration of a GnRH agonist followed, seven days later, by a luteolytic dose of PGF_{2α} and, another two days later, another dose of GnRH. Cows are expected to ovulate about 26 hours after the second GnRH-induced LH surge and are, therefore, inseminated 16 to 20 hours after the last GnRH administration. Modifications of the ovsynch protocol, such as the “cosynch-” (Geary and Whittier 1998, Geary et al. 2001), “presynch-” (Vasconcelos et al. 1999, Peters and Pursley 2002, Ribeiro et al. 2011) or “resynch- protocol “ (Fricke et al. 2003), are preferred in certain situations.

In Germany, the largest dairy producer in Europe, the dairy industry is undergoing major structural changes. From 1970 to 2013 the number of dairy farms in the north-western region, where this investigation was conducted, decreased from almost 70,000 to less than 5,000. At the same time average herd size increased from 7.5 to 75 heads and average

yearly milk yield per cow from 4717 to 8735 kg (Landeskontrollverband Weser-Ems 2013). At present, most viable farms, generally family-operated without hired labor, milk between 50 and 300 cows. Pasture contributes 25 to 75% to the forage needs. Fixed-time artificial insemination is applied sporadically at best, usually in an attempt to alleviate reproductive disorders. The present field trial was, therefore, conducted with the intention to a) explore the potential of implementing a routine fixed-time insemination program under local dairy farming conditions, typical for many regions within Europe and b) improve the efficiency of presynch and ovsynch protocols by substituting human chorionic gonadotropin (hCG), which is acting much like endogenous LH and being characterized by a particularly long half-life of 9 to 12 hours, for the GnRH analog normally used as ovulation-inducing agent at the end of the protocol, with the purpose of reducing the incidence of short cycles claimed to be an occasional sequel of synchronization protocols.

3.2 Materials and Methods

The study was conducted from autumn 2009 to spring 2011 on four family operated dairy farms typical for the pasture region of north western Germany (East Frisia). Herd structure and level of performance are summarized in Table 1. On all four farms the owner was the responsible person for reproductive management. Cows were kept in free stall barns. Due to high production and special needs in early lactation, cows between day 3 and 120 post partum were separated in a high yielding group. From April to October they had access to pasture for several hours per day. Beside grazing, cows in all herd were fed a total mixed ration based on grass silage and concentrate with an average energy content of 7,1 MJNEL, 17 % XP, 16 % XF and 32 % XS. Typical for the region, year-round calving was practiced including a six to eight week dry period, depending on the farm manager's conviction. All herds were part of the regular milk recording scheme. Estrus detection was based on twice daily visual monitoring of cows. Herd size of the four herd owners who were prepared to reliably adhere to a defined protocol over an extended period of time did not permit implementation of all treatment groups within each herd. Therefore two herds (Herds A and B) were allotted to a presynch protocol, the other two (Herds C and D) to an ovsynch protocol (Table 1). The hormonal agents used were the GnRH analog buserelin (2.5 ml Receptal®, Intervet, Unterschleissheim, Germany), the prostaglandin $F_{2\alpha}$ agonist cloprostenol (2 ml Cyclix®, Intervet, Unterschleissheim, Germany) and hCG (1500 IU Ovogest[®], Intervet, Unterschleissheim, Germany). Within each herd there were two treatment and one control group: farmers agreed to randomly assign out of every three

cows to be inseminated two to fixed-time insemination, one treated with buserelin as ovulation inducing agent, the other with hCG, and leave the third cow untreated to have her inseminated when observed in estrus. A post-partum resting period of between seven and eight weeks was accomplished by inaugurating treatment of the presynch group 26 (SEM 2) days, and of the ovsynch group 53 (SEM 2) days post-partum. For insemination cows were fixed in a head lock after milking and were inseminated with frozen-thawed semen from fertility proven AI-sires was conducted by professional technicians between 8 am and 10 a.m. Straws contained a minimum of 15×10^6 motile spermatozoa after thawing. Pregnancy was confirmed by determining pregnancy associated glycoprotein (PAG) in blood taken from the tail vein 30 to 45 days after insemination. Description of the PAG assay may be found in Friedrich and Holtz (2010).

Pregnancy results were analyzed by SAS using the procedure glimmix with the fixed effects “treatment group” (presynch, ovsynch or untreated), “ovulation inducing agent” (buserelin or hCG), “parity” (primiparous vs. pluriparous) and “herd” (A, B, C or D). “Milk yield” (kg) was considered a covariate. Interactions between herd x treatment x parity, treatment x ovulation inducing agent, treatment x parity, treatment x herd and herd x parity were also assessed. Each of the above variables was tested individually in a separate model. Overall service interval was analyzed by SAS using the procedure mixed with a model including the fixed effects “treatment group” (Presynch, Ovsynch or Untreated), “parity” (primiparous or pluriparous) and “herd” (A, B, C, D). Least square means and their standard errors were calculated for all fixed effects and pair-wise comparisons for the different levels of fixed effects were conducted. The Tukey adjustment was used to correct for multiple comparisons, if applicable.

3.3 Results

Presynch and ovsynch protocols were implemented in different herds, therefore the effects “herd” and “treatment group” were confounded. To be able to compare the treatments, pregnancy rate was expressed as percent of the pregnancy rate of untreated herd mates that were inseminated when observed in estrus. In Table 2 both absolute and relative pregnancy rates are presented. In presynch treated cows that were ovulation-induced with buserelin, relative pregnancy rate was 74%; in hCG treated cows it was 60%. The corresponding relative pregnancy rates for ovsynch treated cows were 142% when treated with buserelin and 97% when treated with hCG.

As indicated in Fig. 1, pregnancy rates in synchronized cows, regardless whether belonging to the presynch (Herds A and B) or ovsynch group (Herds C and D), were lower when hCG was used as ovulation inducing agent instead of buserelin (34% and 35% vs. 42% and 51%, both $P < 0.05$). In cows subjected to the presynch protocol, pregnancy rates were significantly lower than in herd mates bred to observed estrus, regardless whether buserelin or hCG was used as ovulation inducing agent (42% and 34% vs. 57%, both $P < 0.05$). In cows subjected to the ovsynch protocol, pregnancy rate was equivalent with untreated herd mates when hCG was used (35% vs. 36%) and significantly higher when buserelin was used (51% vs. 36%, $P < 0.05$). Across herds and synchronization protocols, of 233 cows induced to ovulate with buserelin, 44% fell pregnant, almost the same as 48% with the 168 conventionally inseminated herd mates, and significantly more than with the 217 cows induced to ovulate with hCG (34%, $P < 0.05$) (Table 2). Of 618 cows 241 (39 %) calved after 280 (± 10) days.

The mean service interval in cows subjected to a presynch protocol was two weeks shorter than in conventionally inseminated herd mates (72 and 73 vs. 86 days) and about one week longer in cows subjected to an ovsynch protocol (88 and 84 vs. 79 days), the differences of treatment groups vs. untreated controls being significant regardless whether ovulation was induced with buserelin or hCG ($P < 0.05$). The differences between buserelin and hCG were negligible ($P > 0.05$). Variability in service interval, signified by standard errors, was substantially reduced by either synchronization protocol: 8 and 22 days for buserelin- and hCG-induced cows of the presynch group and 14 and 14 days in corresponding cows of the ovsynch group, as compared to 28 and 24 days in non-treated herd mates. This reflects the degree of synchronization.

Table 1: Characterization of the four herds participating in the study (n= 618, 222 primiparous and 396 pluriparous cows). Overall 701 cows were kept in herds, 618 cows were randomly selected for the study.

Variable	Herd				Overall	
	Herd A	B	Herd C	Herd D	Mean	SD
Herd size (lactating cows)	166	229	125	181	175	43
Average age of cows (mo)	68	52	53	53	57	8
Average parity of cows included	2.6	2.3	2.5	2.4	2.4	1.5
Milk yield/d at first service (kg)	30.7	37.2	35.7	37.8	35.2	3.2
Average days in milk	325	331	331	337	331	5
Average calving interval (d)	412	444	401	406	416	19
Culling rate (%)	25.0	24.6	30.2	23.8	25.9	2.9

Table 2: Pregnancy rate and service interval in cows subjected to a presynch or an ovsynch protocol, ovulation-induced with buserelin or hCG, as compared to a control group of herd mates inseminated upon observed estrus. Pregnancy was confirmed by determining pregnancy associated glycoprotein (PAG) in blood 30 to 45 days after insemination.

	Variable	Presynch (Herds A+B)	Ovsynch (Herds C+D)	Overall (Herds A–D)
Control	No. of cows	106	62	168
	Pregnancies (%)	57 ^c	36 ^b	48 ^a
	Service interval (d)			
	Mean	86 ^b	79 ^b	84 ^b
	SE	28	24	24
Buserelin	No. of cows	159	74	233
	Pregnancies (%)	42 ^a	51 ^a	44 ^a
	Rel pregn rate (%)	74	142	92
	Service interval (d)			
	Mean	72 ^a	88 ^a	77 ^a
SE	8	14	9	
hCG	No. of cows	141	76	217
	Pregnancies (%)	34 ^b	35 ^b	34 ^b
	Rel pregn rate (%)	60	97	71
	Service interval (d)			
	Mean	73 ^a	84 ^a	77 ^a
SE	22	14	18	

^{a,b} Within columns pregnancy rates and service intervals with different superscripts differ (P<0.05)

^{a,c} Within columns pregnancy rates and service intervals with different superscripts differ (P<0.01)

3.4 Discussion

The presynch protocol differs from the ovsynch protocol in that it involves pretreatment with two injections of prostaglandin $F_{2\alpha}$ administered 26 and 12 days before the first GnRH administration, with the intention to create optimal preconditions for the ensuing ovsynch regime. In the present experiment there was no significant difference in pregnancy rate between the two protocols. In fact, a tendency toward a slight advantage of the ovsynch over the presynch protocol was observed. This is inconsistent with the bulk of literature reports (Moreira et al. 2000, Thatcher et al. 2002, Lucy et al. 2004) but in line with findings by others (Cartmill et al. 2001, Ribeiro 2011). Under the given circumstances the extra effort and expense attached to the presynch protocol did not pay off. The low pregnancy rate in herds C and D of the control group is due to the poor heat detection in those herds and work load. The results indicate that fixed time insemination is a reasonable method to improve reproductive performance in family run herds because of disappearance of time-consuming heat detection. Human chorionic gonadotropin is a natural hormone recovered from the urine of gravid women (Farrag et al. 2008). It has LH-like properties (Lei and Rao 1994, Birken et al. 1996, de Rensies et al. 2010). Due to its high glycosylation rate the clearance rate of hCG is low, biological activity, therefore, is prolonged (Cole 2010). It was expected to support maintenance of the developing corpus luteum (Fricke et al. 1993), thus reducing the incidence of premature corpus luteum regression which, according to various researchers (Vasconcelos et al. 1999, Moreira et al. 2000, Cartmill et al. 2001, Cordoba and Fricke 2002, Guemen et al. 2003, Keith et al. 2005, Keskin et al. 2010) is at times associated with estrus synchronization. In the present study, contrary to findings by Schmitt et al. (1996) and De Rensis et al. (2002), substitution of hCG for GnRH was not advantageous. In fact, in both presynch and ovsynch protocols, pregnancy rates were significantly higher when using buserelin. Studies by Roche and Crowley (1973), confirmed by own unpublished observations in goats (Saleh et al. in preparation), indicate that ovulations induced with hCG occur with a delay and less coordinated than with buserelin. Conceivably this may lead to poor timing of insemination in relation to ovulation and, hence, less satisfactory pregnancy rates. The overall pregnancy rate of 48% recorded in cows bred to estrus in the present study might appear low but reflects the situation typical for most high producing dairy operations worldwide (Dransfield et al. 1998, Lucy 2001, de Vries 2005). The pregnancy rate of 51% in cows synchronized by ovsynch protocol with buserelin as ovulation inducing agent in the present study is, thus, to be considered most satisfactory. Generally lower results are reported with

fixed-time insemination than with insemination to observed estrus. However, pregnancy rates achieved with fixed-time insemination are often calculated as proportion of all the cows subjected to the synchronization treatment, whereas, in conventionally inseminated cows only the cows that were inseminated are taken into account, disregarding the ones not detected in estrus, a proportion sometimes accounting for more than 50%. The difference in service interval of one, respectively two weeks between ovsynch and cosynch treated vs. conventionally inseminated cows was statistically significant, though of little practical relevance in view of the savings in time and labor gained by practicing fixed-time insemination, let alone the logistical and hygienic advantages associated with batch calving.

In conclusion, the present study shows that the implementation of fixed-time insemination on family-run dairy farms is feasible and may save time and effort with getting cows in calf. The presynch protocol did not produce better results than the less elaborate ovsynch protocol and substitution of hCG for buserelin as ovulation inducing agent appears not recommendable.

3.5 References

See chapter VII

Kapitel IV

Kapitel IV

Efficiency of a fixed-time AI (TAI) in dairy cows following a Presynch- or Ovsynch protocol and the application of Buserelin or hCG as ovulation inducing agent in consideration of herd size

**D Marthold¹, J Detterer², M Thiem³, U Koenig von Borstel¹, M Gauly⁴ and
W Holtz^{1*}**

¹ Department of Animal Science, Georg-August-University Goettingen, Goettingen,
Germany

² Verein Ostfriesischer Stammviehzuechter, AI and ET Centre, Georgsheil, Germany

³ Tierarztpraxis Michael Thiem, Kraftwerkstr. 11 b, 03226 Vetschau/ Spreewald,
Germany

⁴ Faculty of Science and Technology, Free University of Bolzano, Universitaetsplatz 5,
39100 Bozen, Italy

*Corresponding author. Tel.: +49 551 395605; fax: +49 551 395587.

E-mail address: wholtz@gwdg.de (W. Holtz)

Keywords: Ovsynch, Presynch, Fixed-timed insemination, herd structure, hCG, GnRH

Abstract

The objectives of the study were to investigate the efficiency of fixed-time AI in German middle-sized family-operated versus large dairy herds, following a Pre- or Ovsynch protocol. 755 Holstein Frisian were allotted in an Ovsynch, Presynch or control group, using alternating hCG (1,500 IU, Chorulon®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Germany) or GnRH (10µg, Buserelin, Receptal®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Germany) as ovulation inducing agents. The Ovsynch regimen consisted of a GnRH injection, followed by PGF2α (500 µg Cloprostenol Estrumate®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Germany) 7 days later, followed by either GnRH or hCG two days later. AI was carried out 16 to 20 hours later with a single frozen-thawed straw of semen. Additionally 327 of cows were presynchronized with a treatment consisting of two injections of PGF2α 14 days apart. As control 372 cows were observed and inseminated when in estrus. Pregnancy was diagnosed 30 to 45 days p.i. with measuring the serum PAG-concentration. Substitution of GnRH by hCC to trigger ovulation did not lead to improved pregnancy rates (36 % versus 31 %). Overall pregnancy rate in untreated cows was 46 %. Replacement of the ovulation inducing agent GnRH by the lower cost hCG is not recommendable. Overall pregnancy rates were not different for cows in Presynch (39 %), Ovsynch (41 %) or untreated control group (48 %). Cows in large herds archived lower reproductive performance in general. Service period was shortened by 20 days in Presynch group. The results provide evidence, that TAI can be successfully applied in small herds. However, application must be considered on herd base due to management effects.

4.1 Introduction

Milk production in Germany is characterized by different herd structures and varying production conditions. Small- and middle-sized family operated dairy farms, milking between 30 and 300 cows are typical for the south and north west of Germany whereas large dairy farms, milking between 400 and 3,000 cows with hired labour, are mainly located in eastern Germany. While traditional pasture-based dairy farming, where grass supplies up to 75 % of the forage needs, is still common in smaller herd structures, large dairy operations are predicated on year-round indoor housing, feeding a total-mixed-ration, high in energy content. Despite elementary distinctions, both production systems are dealing with prolonged service periods, low estrus detection rates and decreasing AI submission rates due to high milk production and metabolic disorders (Lucy, 2001; Butler,

2003; Melendez et al., 2008; Holman et al., 2011). Therefore, Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) and Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) have been used successfully to synchronize ovulation in dairy cattle (Pursley et al., 1995; Pursley et al., 1997b; Geary et al., 2001). Those fixed-time AI protocols have been adapted to large German herds for years but have never been established in smaller herd structures on a daily base. A generally accepted regimen for ovulation synchronization in cattle, followed by fixed-time insemination (TAI), is the Ovsynch regime which was developed by Pursley and coworkers (1995). Conception rates achieved range from 20 % to 55 % (Pursley et al., 1995; Pursley et al., 1997b; Xu and Burton, 1999; DeJarnette and Marshall, 2003; De Rensis et al., 2008; Keskin et al., 2010), though the AI submission rate is close to 100 % (Stevenson et al., 1999). At a random stage of cycle, the first initiating GnRH injection (d 0) is given to trigger the ovulation of a possibly existing dominant follicle and to recruit a new follicular wave. To cause the regression of pre-existent and existing developed corpora lutea, PGF₂ α is administered seven days later (d 7). At last, 48 hours after PGF₂ α (d 9), a second GnRH injection is given to trigger ovulation 24-32 hours later (Pursley et al., 1995; Chebel et al., 2003). Reported synchronization rates vary from 75 % to 100 % (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999). However, the Ovsynch protocol has been criticized ever since because of lower conception rates compared to those achieved in cows bred to natural estrus and high costs for the hormone treatment (Fricke, 1998; Stevenson et al., 1999). In addition, particular in Europe, consumer protection aspects must not overlooked when discussing the application of hormone-based treatments in livestock. Nevertheless, a lot of research, mainly in North America, about improving the efficiency of TAI protocols has been done so far. For instance Vasconcelos et al. (1999) found that the time of initiating ovulation synchronization does have an effect on the response to the treatment. Higher conception rates were found when the Ovsynch protocol initiation was scheduled in the early to mid luteal phase of estrus (d 5-9). Thus, a regime called Presynch, which consists of two PGF₂ α injections, 14 days apart, with the second injection given 12 days before Ovsynch initiation was developed (Peters and Pursley, 2002; DeJarnette and Marshall, 2003; Ribeiro et al., 2011). So far, TAI protocols have been modified to improve economical efficiency and pregnancy rates. One of these modifications is the replacement of Buserelin by hCG as an ovulation inducing agent.

The present investigation addresses the question whether it is opportune to implement a Pre- or Ovsynch-protocol, using hCG or the costlier GnRH as ovulation-inducing agents, in small- and middle-sized dairy operations (< 300 cows) as well as in large dairy herds (> 400 cows) with hired labour.

4.2 Material and Methods

A field trial was conducted in northern Germany on a total of 1,127 lactating primi- and pluriparous Holstein Frisian cows distributed to 21 dairy farms. Seventeen of the farms were family run without hired employees with average herd size 144 (54-304) and a herd average of 7,561 to 11,103 kg milk per lactation. Four farms were large, operating with an average herd size of 734 (409-1,341) cows and average milk yield 9,989 to 10,507 kg per lactation and hired labour. All except one small herd where tie-barn were still in use, all cows were kept in free stall barns. In small family run farms cows had access to pasture during the growing season (April to October) with supplemental feeding of a balanced total mixed ration provided according to production level. In the four large herds, cows were kept indoors year-round. They were divided up into performance groups according to lactation state (100 days, 101-200 days, more than 200 days) and fed a total mixed ration according to performance. Clinically healthy cows, eligible for first service, at unknown stage of estrus were assorted to a Presynch group. In 162 of these cows GnRH and in 165 cows hCG was administered as ovulation inducing agent. Another 280 (GnRH n= 153; hCG n= 127) cows in small herds and 148 (GnRH n= 72; hCG n= 76) cows in 4 large herds were assorted to an Ovsynch group. Most of the farms, whatever the herd size was, declined the implementation of Presynch due to their daily routine. As control cows in untreated group (large dairy farms n= 128, small dairy farms n= 244), eligible for first service, were observed for estrus and inseminated to a natural occurred estrus due to the “morning-evening-rule”. Cows in Presynch group (small herds only, n=327) were administered a luteolytic dose of the prostaglandin F_{2α} agonist cloprostenol (500µg, Estrumate®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Germany) 26 (±2) days after parturition followed, by another cloprostenol injection 14 days later. Twelve days later the Ovsynch protocol was administered, constituting an initial GnRH injection (10µg, Buserelin, Receptal®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Germany) followed, seven days later, by an im injection of, alternating at random, GnRH or hCG (1,500 IU, Chorulon ®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Germany) to trigger ovulation. In first service Ovsynch group

(n=428) the initial cloprostenol injections were omitted. In all herds the treated cows were inseminated 16 to 20 hours after ovulation induction with frozen-thawed semen (15×10^6 motile spermatozoa after thawing) from fertility proven sires. Pregnancy was detected by determining the pregnancy associated glycoprotein (PAG) concentration in blood (Friedrich and Holtz, 2004) drawn from the coccygeal vein of the cows 30 to 45 days after insemination.

Pregnancy rate was specified as proportion of cows diagnosed pregnant divided by the number of cows inseminated in each group and was analyzed by SAS using the glimmix procedure with a model consisting of treatment group (Presynch and Ovsynch or Control), herd, parity and number of service. Interactions between herd x treatment x parity, treatment x parity and treatment x herd were also verified with the glimmix procedure. In addition means and standard deviation were calculated and used during comparisons. Post hoc contrasts were carried out using the Tukey-Kramer test. For all statistical analyses, α was set at 0.05.

4.3 Results

Table 1 illustrates pregnancy rates by herd structure and ovulation inducing agent. First service pregnancy rate after using Buserelin to trigger ovulation was 43 % in small structured herds and significantly higher ($P \leq 0.05$) than in large herds (28 %). When using hCG as final injection same differing pregnancy rates on farms were achieved. In small operations first pregnancy rate was 39 % compared to 22 % on farms with more than 400 cows. Pregnancy rates did differ significantly ($P \leq 0.05$). Pregnancy rates across all herds after timed AI were not lower when using hCG (31 %) compared to Buserelin (36 %) as ovulation inducing agent. Cows in untreated groups did not show different pregnancy rates (48 % vs. 44 %). Likewise, there was no difference in pregnancy rates observed between treated (43 % and 39 %) and untreated (48 %) in small herd structures. However, in large herd structures cows did show significantly higher pregnancy rates (44 %) when inseminated when in estrus, compared to those gone through an Ovsynch regimen (28 % and 22 %). Across all herds higher pregnancy rates were achieved when cows were inseminated when in estrus (36 % and 31 % vs. 46 %).

Table 2 depicts pregnancy results in the small herd structures after following a Presynch (two farms) or Ovsynch (17 farms) protocol. No differences in pregnancy rates between

cows inseminated after following a Presynch (39 %) respectively an Ovsynch (41 %) treatment were observed. In untreated cows a higher overall pregnancy rate of 48 % was observed. In addition, Buserelin was compared to hCG as ovulation inducing agent. Pregnancy rates after Ovsynch did not differ depending on ovulation inducing agent (43 % Buserelin, 39 % hCG). After following a Presynch regimen cows achieved lower (34 %) pregnancy rates after final hCG treatment compared to those cows treated with Buserelin (42 %). Overall pregnancy rate in all herds after fixed-time insemination was significantly higher in cows treated with Buserelin (43%) compared to herd mates treated with hCG (37%). In addition service periods across herd sizes and treatment protocols were observed. In small dairy operations service period was 75 ± 15 days when applying Presynch, 93 ± 31 days in Ovsynch treated cows and 84 ± 32 days in untreated cows. In large herds service period was 97 ± 24 days when applying Ovsynch and 93 ± 59 days in untreated cows. Average lactation number was 2,8 ($\pm 1,5$) for the cows in large herds and 2,4 ($\pm 1,5$) for the cows in small herds. Mean values for milk yield at time of insemination was 40,0 kg ($\pm 8,2$) in large herds and 35,7 kg ($\pm 7,5$) in small herds. Milk performance had no influence on pregnancy rate ($P= 0.967$).

Table 1: Effect of herd structure and ovulation inducing agent. Cows in first service treatment groups where inseminated following an Ovsynch regimen using Buserlin (GnRH) or hCG as ovulation inducing agents. Cows in control group where left untreated and inseminated when in estrus.

Cows milked/ herd	No. of herds	Ovulation inducing agent			Control		
		Buserelin No. of cows	Pregnant %	hCG No. of cows	Pregnant %	No. of cows	Pregnant %
144(54-304)	17	153	43 ^a	127	39 ^a	244	48 ^a
734(409-1341)	4	72	28 ^b	76	22 ^b	128	44 ^a
Total	21	225	36 ^A	203	31 ^A	372	46 ^B

^{a, b} Means within a row with different superscripts differ (P< 0.05)

^{A, B} Means within a column with different superscripts differ (P< 0.05)

Table 2: Effect of a Presynch or an Ovsynch protocol, using GnRH or hCG as ovulation inducing agent, in a comparative field study; 327 cows in two of the small-sized dairy farms (< 300 cows) were inseminated after following a Presynch protocol, another 280 cows in remaining 15 small-sized herds were allotted to an Ovsynch group. As control 106 cows in the two Presynch herds cows and 138 cows in Ovsynch herds were left untreated and inseminated when in estrus.

Variable	Presynch		Ovsynch	
	No. of cows	Pregnancies %	No. of cows	Pregnancies %
Buserelin	162	42 ^a	153	43 ^a
hCG	165	34 ^b	127	39 ^a
Control	106	54 ^a	138	41 ^{a,b}

^{a, b} Means within a column with different superscripts differ (P< 0.05)

4.4 Discussion

Adoption of TAI is increasing due to changing market structures and the whole complex of issues of getting high yielding dairy cows pregnant in time (Smith, 2011). Therefore, in large dairy herds (> 400 cows) it is common to apply fixed-time AI protocols such as Presynch or Ovsynch. In small- and middle-sized family-run dairy farms (< 300 cows), many herd owners resort to having a bull running in the herd rather than relying on AI due to problems with estrus detection and workload. Nevertheless, beside estrus detection aids such as paint sticks (tail chalk), pedometers or similar technical devices (e.g. Heatime®, SCR Engineers Ltd., Netanya, Israel), fixed-time AI regimes gain in importance and acceptance even in small- and middle-sized dairy operations. To date a lot of research on ovulation synchronization protocols that permit fixed-time AI has been done so far. Authors reported conception rates ranging from 24 % to 55 % after Ovsynch or Presynch treatment (Pursley et al., 1995; Pursley et al., 1997b; De Rensis et al., 1999; Xu and Burton, 1999; DeJarnette and Marshall, 2003; Fricke et al., 2003; Keskin et al., 2010). Beside modification of protocols termination, research on different ovulation inducing agents has been done. One hypothesis to enhance conception and pregnancy rates to TAI is the replacement of the second GnRH injection by hCG (Schmitt et al., 1996b; De Rensis et al., 1999). The human chorionic gonadotropin (hCG) is mainly a product of placental syncytiotrophoblast cells (de Medeiros and Norman, 2009) and is measurable in human maternal serum and urine from days 6 to 14 after fertilization (Hay and Lopata, 1988; Nepomnaschy et al., 2008). hCG does have an effect on follicular development and a direct gonadotrophic effect on the ovary (De Rensis and Peters, 1999). It has been demonstrated that a hCG administration on day 0 or day 7 of the estrus cycle increases follicular luteinisation, follicular blood flow (Aslan et al., 2011) and the proportion of cows performing a three-follicle wave pattern per cycle (Sianangama and Rajamahendran, 1996). An injection of hCG led to an increased hCG plasma concentration for 30 hours (Seguin et al., 1977), whereas, in contrast, former research (Chenault et al., 1990) found heightened LH serum concentrations for merely 5 hours after administration of GnRH. hCG is also assumed to have a luteotrophic effect that might be able to reduce early embryonic mortality in high-producing dairy cattle due to a higher progesterone segregation of the corpora lutea (Schmitt et al., 1996a). On the other hand, no higher pregnancy rates were recorded in cows administered hCG 48 hours before TAI compared to those treated with GnRH (Schmitt et al., 1996c; De Rensis et al., 1999; De Rensis et al., 2002; De Rensis et al., 2008).

The purpose of this study was to evaluate the efficiency of fixed-time AI following a Presynch- or Ovsynch protocol with equation of GnRH or hCG as ovulation inducing agents in German small- and middle-sized family-run dairies compared with large dairy operations in which TAI has been applied for years as part of the daily reproductive management.

In the present study TAI proved to be an advanced tool to manage reproductive performance without the need of estrus detection or technical device under certain conditions. In small herd structures pregnancy rates in treated cows (43% and 39 %) were not lower compared to untreated herd mates (48%). However, results in large herds indicate that in lactating dairy cows inseminated following an Ovsynch regimen conception rates on a herd base might be lower (22% and 28%) than those achieved in untreated cows (44 %). This might be converse to previous results (Stevenson et al., 1999; Tenhagen et al., 2004) but similar to the findings of Pursley and coworkers (1999). However, this study was conducted in different, not comparably herd structures and disparities among herd size were observed. Previous findings that correspond with our findings indicate that housing, nutrition, management, health status and environment on each individual farm have side effects on health and fertility traits (Windig et al., 2005). Hence, reasonable implementation of fixed-timed insemination must be discussed on a herd base.

The second considered aspect was the efficiency of hCG compared to GnRH as ovulation inducing agent. In general, hCG did not convince being an alternative ovulation inducing agent due to lower pregnancy rates (39% and 22%) in different herd structures (< 300 cows vs. > 400 cows) compared to Buserelin (43% and 28%). One reason for the substitution of GnRH by hCG is the high retail cost of GnRH which constitutes the majority of the treatment cost when applying GnRH base TAI protocols (Fricke, 1998). Another reason for using hCG instead of GnRH is the prolonged half-life of hCG and the assumedly positive effect of CL development (De Rensis and Peters, 1999). When substituting the second GnRH treatment by hCG treatment, previous research found equal (Schmitt et al., 1996c) or improved (De Rensis et al., 2002) pregnancy rates. Others found an increased progesterone secretion during mid-cycle in hCG-treated cows but overall conception rates of cows inseminated prior hCG treatment were not improved compared to those achieved in herdmates treated with saline (Helmer and Britt, 1986). Geary et al. (2001) reported lower pregnancy rates associated with more frequently observed short estrus cycles in hCG-treated cows (23%) than among GnRH treated herd mates (11%). Similar to our results De Rensis et al. (2002) observed lower pregnancy rates in hCG-treated cows compared to cows treated with Buserelin as ovulation inducing agent or untreated cows,

respectively. While investigating reasons for lower reproductive performance associated with an ovulation inducing hCG treatment a delayed onset of ovulation by up to 16 hours, compared to that in animals treated with GnRH, has been observed (Roche and Crowley, 1973). Although we did not determine ovarian status or time of ovulation in treated cows, it can be assumed that lower pregnancy rates in hCG-treated animals in our study might be associated to low ovulation rates, low ovarian response or short cycles as reported earlier. In summary, the replacement of Buserelin by hCG prior to fixed-time insemination is not recommendable due to our findings.

A direct comparison of Pre- and Ovsynch treatment applied before first service is not feasible as presynchronisation was only applied in small-sized herd structures. Large dairy operations were not able to implement a Presynch protocol in their daily routine. However, results in small herds indicate no difference between pregnancy rates after following an Ovsynch (41%) or a Presynch (39%) protocol. Lower pregnancy rates were observed when hCG was used after a presynchronization (34%) compared to GnRH (42%). Due to our findings it might be advisable to dispense with the use of a Presynch protocol due to extra costs for the two initial PGF 2α injections and the additional effort for treatment.

High milk performance, negative energy balance during the first third of lactation and short volunteer waiting periods have been reported as a major reason for low reproductive performance (Fonseca et al., 1983; Lucy, 2001; Butler, 2003; Zdunczyk et al., 2012). However, in this study neither milk performance among herds was different nor an effect of milk performance on pregnancy rates was observed. The time from calving to first service was not different in Ovsynch cows (95 days) and untreated cows (87 days) among herds; thus prolonged service periods in untreated cows may not explain different pregnancy rates in first service TAI cows across herds. It is unclear why first service pregnancy rates to TAI in large dairy herds were significantly lower than those achieved in small herds and untreated animals in both regions.

When discussing the effectiveness of TAI protocols, achieved conception- and pregnancy rate should not be the only determination base. Lima et al. (2010) found TAI less costly than natural service/ estrus detection in their field study. The advantage of TAI is constituted in increased AI submissions rates close to 100 % and decreased days to first service due to a systematic reproductive management. The application of TAI protocols to initiate the first postpartum service and manage voluntary waiting period and service period consequences an improved reproductive efficiency compared with relying on estrus detection (Stevenson et al., 1999). Our

results approve previous findings. Due to application of a Presynch protocol, service period in small herds was shortened by up to 20 days (Presynch: 75 days, Ovsynch: 95 days, Untreated: 87 days). Depending on farm-individual costs of milk production, this improvement will increase the profit per cow per year. However, service period was not shortened in Ovsynch treated cows. This might be associated with the less aggressive treatment design, starting from day 53 post partum. In large sized herds service period was not shortened due to the Ovsynch treatment (Ovsynch: 97, untreated 93). Thus, for those herds it might be recommendable to initiate the Ovsynch earlier in lactation to achieve a maintainable service period of 80 days. In untreated cows, observed for estrus, high standard deviations of days to first service were observed (large herds 93 ± 59 , small herds 84 ± 32). Those figures reflect the problem of decreasing estrus signs, silent estrus and hindered estrus detection in high yielding dairy cows (Hansen, 1983; Senger, 1994; Butler, 2003; Wiltbank et al., 2006; Cavestany et al., 2008). The effect of low estrus detection rates (< 60 %) on conception and pregnancy rate is considerable. A recent evaluation by Smith et al. (2011) found that a decrease of estrus detection rate to 75 % - 50 % due to fewer animals cycling or less time spent detecting estrus, the pregnancy rate will be reduced to 53% - 38%.

In conclusion, the results of the present study provide evidence, that fixed-time insemination following an Ovsynch protocol, can improve reproductive performance on a herd base by increased AI submission rates, decreased service periods and the reduction of labour costs due to elimination of estrus detection, even under traditional, small-sized German dairy farming conditions. Although GnRH is more expensive than hCG it is, due to our findings under prevalent conditions, not a suitable replacement for GnRH to induce ovulation when applying a Pre- or Ovsynch regimen. Further research on future reproductive management systems such as Ovsynch and rapid resynchronization is needed to customize protocols to the individual dairy farm level to achieve the highest success.

Acknowledgements

The authors thank Intervet Germany (Unterschleißheim) for providing Estrumate® and Receptal® and Chorulon®, the participating dairy farmers and Elisabeth Stuewe for the laboratory work and assistance.

4.5 References

see chapter VII

Kapitel V

Kapitel V

Pregnancy detection in dairy cows – a comparative field study

D. Marthold¹, J. Detterer², M. Gauly¹, W. Holtz¹

¹ Department of Animal Science, Georg-August-University Göttingen, Germany

² Verein Ostfriesischer Stammviehzüchter, AI- and ET Center Georgsheil, Germany

Abstract

Bovine pregnancy is commonly diagnosed by manual palpation, ultrasonography, the determination of progesterone in milk or blood or the determination of pregnancy-associated glycoprotein in blood. To our best knowledge there is currently no study available that compares these diagnosis methods on an individual animal base under field conditions. At day 29-35 postbreeding 253 primi- and multiparous Holstein-Frisian cows were examined for pregnancy by ultrasonography using a dual frequency (5 to 7.5 MHz) or a broadband (4.5 to 8.5 MHz) transducer respectively. Simultaneous blood samples were drawn from the tail vein (coccygeal) to determine serum pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration using a competitive two-step ELISA. Additionally milk samples (post milking) were drawn on days 21, 28 and 49 from each individual cow to investigate progesterone concentrations using a commercial ELISA. On day 60 rectal palpation was conducted from an experienced performer. Calving results were settled 270 to 290 days postbreeding and were considered as reference method. Results from rectal palpation on day 60 and calving results agreed by 95.5 %. Final calving rate was 38 %. Accuracy of PAG test (91.6 %) as well as US (89.2 %) and an early stage of gestation were fairly high. A single progesterone determination on days 21, 28 or 49 did lead to a reliability ranging from 87.2 to 95.3 %. A threefold progesterone assay on milk samples on days 21 + 28 + 49 adduced accurate diagnosis close to 100%. With additional effort the measurement of milk progesterone concentration of at least two samples can provide trustworthy predications of reproductive status. For all methods more correct positive cows than correct negative cows were detected. However, those early pregnancy diagnosis methods are limited when conducted starting from 21 days postbreeding due to the appearance of early and late embryonic mortality. Discrepancies between diagnosis methods and final calving results may be associated with early examination point of time, pregnancy loss or misinterpretation. Depending on time of examination a reassessment or a

combination of a lab-based and an on-farm method is recommendable to prevent missing cows that lost pregnancy before dry off. However, ultimately price and disposability and producer's preferences will be determining which pregnancy diagnosis method is used on each individual dairy farm.

5.1 Introduction

The identification of non-pregnant cows is of preferential interest in order to achieve immediate reinsemination and reduce the average number of days open. Several methods for pregnancy diagnosis in dairy cattle have been used and evaluated in the past. Return to estrus three weeks after insemination is a fairly reliable indicator of a failed conception, however, estrus detection has increasingly become a difficult task (Pursley et al., 1995; Wiltbank et al., 2006). During the last third of gestation, pregnancy is getting increasingly conspicuous.

At that stage fetal prominences can be detected by ballottement, i.e. pushing of the gravid uterus through the abdominal wall over the right flank (van der Weiden and Taverne, 1999; Radostits et al., 2005). The most common means of pregnancy detection is transrectal palpation of reproduction tract. According to Caraviello et al.(2006) and Youngquist (2006) 88 % of the dairy operations in North America apply this technique. The method was first implemented in the 19th century (Cowie, 1948) and can reliably be applied from day 42 p.i. onwards (Abbitt et al., 1978).

As a first step feces has to be removed from the rectum. For locating the genital tract the cervix, located centrally, the pelvic floor is grasped followed by retraction of the entire genital tract. Once the uterus is located, the uterine horns are carefully palpated for consistency. First signs for a non-existing pregnancy or very early stage of gestation are a convenable uterus. Asymmetry and enlargement of the gravid horn, fluid, fluctuation, fetal membrane slip and ballottement as well as the presence of amionic vesicle, chorioallantoic membrane, cotyledons and a fetus are used, depending on stage of gestation, for determination of pregnancy (Schneider, 1981; Busch and Zerobin, 1995). Thus, the diagnosis "pregnant" is only permissible when at least one positive signs has been found. In bovine practice embryonic death associated with transrectal palpation, caused by

exercise membrane slip, has been investigated in previous studies. For instance Franco et al. (1987) found increased fetal death after the manipulation of the uterus and conceptus during pregnancy diagnosis on days 42 of 46 of gestation. The incidence of fetal death due to pregnancy diagnosis using palpation was estimated to be between 11.8 %, using the milk progesterone concentration on day 63 of gestation and 9.5 % based on results from a second transrectal examination on day 90. Abitt et al. (1987), Paisley et al. (1978), Vaillancourt et al. (1979) and Warnick et al. (1995) found increased prenatal losses due to palpation ranging from 0.7 % to 14.8 %, when conducted between week three and ten of gestation. However, other current studies disproved those results Romano et al. (2007 and 2011). Nevertheless, when bearing in mind that the palpation of the uterus at a very early stage (<42 days) can cause fetal death, the application of this method has its drawbacks.

At the beginning of the 1980's ultrasound-based diagnostic imaging gained widespread acceptance in equine practice and, later on complemented rectal palpation in the bovine to detect pregnancy and diagnose reproductive disorders (Palmer and Driancourt, 1980; Kähn, 1992). Real-time B mode ultrasonography has increasingly proved to be an efficient and practicable management tool permitting to identify non-pregnant cows as early as 28 days postbreeding (Taverne et al., 1985; Pieterse et al., 1990; Szenci et al., 1998; Cordoba and Fricke, 2002; Romano et al., 2006). Other modes of ultrasonography, amplitude (A)-mode, brightness (B)-mode and doppler mode have been investigated (Szenci et al., 1998; Romano et al., 2006) but proved to be less suited than real-time ultrasonography. In bovine practice the use of linear-array real-time B-mode with a switchable frequency (5 and 7.5 MHz or 6 and 8 MHz, respectively) has been successfully established (Taverne et al., 1985; Pierson and Ginther, 1988; Szenci et al., 1998; Youngquist, 2006; Phillips, 2010). Depending on the stage of pregnancy uterus horns are examined for the presence of an embryonic vesicle, embryonic membranes and fetal heartbeat (Nation et al., 2003). Other applications of ultrasonography comprise the identification of multiple pregnancies, detection of ovarian and uterine disorders, such as follicular or luteal cysts, and, from day 55 onward, determination of fetal sex (Cordoba and Fricke, 2002). As compared to rectal palpation, early ultrasonic pregnancy diagnosis with is less invasive and has not been connected to embryonic loss (Paisley et al., 1978; Vaillancourt et al., 1979; Nation et al., 2003).

Apart from on-farm methods of pregnancy detection, a variety of laboratory-based procedures have been implemented, based on the determination of certain hormones or pregnancy-specific proteins (Zoli et al., 1991; Zoli et al., 1992; Szenci et al., 1998; Friedrich and Holtz, 2004; Green et al., 2005). Morton et al. (1974, 1977) discovered the early pregnancy factor (EPF), also known as early conception factor (ECF), in serum of gravid mice and women using a rosette inhibition test. Later this factor was also isolated in the blood of sheep and cattle (Morton et al., 1979; Nancarrow et al., 1981). EPF is a glycoprotein with growth- regulatory and immunomodulatory properties which is required to successfully establish pregnancy and for proliferation of both normal and neoplastic cells and can be detected from six hours after mating onward in humans, mice, sheep and cattle (Morton et al., 1974; Cavanagh, 1996). In cows significant differences between pregnant and non-pregnant cows can be detected after day 13 of pregnancy EPF is also been suggested as a means to monitor viability of bovine embryos (Sakonju et al., 1993). However, due to the laborious procedure the determination has never been adopted to the field (Lucy et al., 2011).

In 1973 Hoffmann and Hamburger established the system of progesterone determination in milk and blood. Progesterone is primarily synthesized by the corpus luteum and to a lesser extent by the placenta (Harisch and Schwarz, 1985; Gasse et al., 1987). The method is based on the that low progesterone concentrations prevail from two days before and until two days after estrus (Hoffmann et al., 1976). and high progesterone concentration exist when a CL is present (Caudle et al., 1980), has been described to be an effective method to monitor ovarian activity and determine the best time for artificial insemination (Cox et al., 1978; Schams et al., 1978; Holtz et al., 1986). However, due to the difficulty and confinement, such as time and facility aspects and radioactive waste, with radioimmunoassay, commercially available enzyme-linked immunosorbent assays and cow-side- or on-farm-tests have been developed and evaluated from 1981 onwards (Arnstadt, 1983; van de Wiel and Koops, 1986; Nebel et al., 1987; Nebel, 1988; Möller and Holtz, 1989a, b; Nebel et al., 1989; Moeller, 1991; Ruiz et al., 1992; Bajema et al., 1994). As compared to laboratory-based tests, those on-farm tests are designed to determine binomial - high or low - progesterone concentrations (Nebel et al., 1989). Nebel et al. (1987) found an overall agreement between ELISA and RIA of 90.9 %, with being more accurate in detecting low progesterone concentrations. To achieve high accuracy and

confidence in detecting pregnant cows, three samplings on days 21, 28 and 49 postbreeding proved to be particularly effective (Niggemeyer et al., 1990). However, pregnancy can be excluded with an accuracy approaching 100 % for cows manifesting 5 ng/ml and below milk progesterone concentration when sampled once three weeks after insemination (Heap et al., 1976; Holtz et al., 1986; Möller and Holtz, 1989a; Niggemeyer et al., 1990).

A reliable method of pregnancy detection is the measurement of substances produced by the conceptus such as oestrogens, mainly synthesized in the ovarians, the placenta, the adrenal glands and testes. During pregnancy oestrogenes migrate from the fetal part of the placenta into the maternal blood circulation (Heap et al., 1981; Safar-Hermann et al., 1987). Thus the determination of oestrogens, in cattle predominantly unconjugated oestrogens, oestradiol-17 α and oestradiol-17 β , in maternal blood (Robertson, 1979; Hoffmann, 1997) and products of metabolism such as milk (Monk, 1975; Pape Zambito, 2008), urine (Hoffmann, 1997) and feces (Mostl, 1984) is a reliable indicator for an intact conceptus and has been successfully used for pregnancy diagnosis in cattle (Mostl, 1984; Lopes, 2007), sheep (Carnegie and Robertson, 1978), goats (Tamanini et al., 1986; Ledezma-Torres, 2002), horses (Evans et al., 1984) and zoo and wildlife animals such as yak or caribou (Safar-Hermann et al., 1987; Messier, 1990). It is known that the oestrogen concentration increases while gestation progresses; But due to the findings of Robertson and King (1979) oestrone in maternal blood is not reliable measurable before day 117, oestradiol sulphates not until day 97 and oestrone sulphate not until day 72. Nevertheless, the determination of oestrogens, even in the second and third trimester of gestation is a useful tool to monitor vitality of the conceptus. The determination in milk, faeces or urine is also limited by the late presence (from day 80-100) of oestrogens during gestation (Heap et al., 1981; Mostl, 1984; Pape Zambito, 2008).

In 1982 Butler and coworkers described the pregnancy-specific proteins (PSPB) for the first time when they found aspartic acid proteinases in bovines with placental origin. Later, in 1991 Zoli and coworker isolated the pregnancy-associated glycoprotein (PAG). Further research found that PAG and PSPB do have a similar amino acid structure and nucleotide sequences. Thus, PAG and PSPB were reclassified (Beckers, 1999; Silva et al., 2007a) as boPAG-1. To date, 21 distinct bovine PAG that belong to the large family of aspartic

proteinase have been identified. Furthermore detection of pregnancy with determining pregnancy-associated/ -specific proteins in blood has been proved to be effective in goats (Humblot et al., 1990), sheep (Ranilla et al., 1997), deer (Haigh et al., 1988), reindeer (Savela et al., 2009), bison (Haigh et al., 1991) and other ruminant mammals. Those pregnancy-associated glycoproteins are predominantly synthesized in the binucleate cells but also expressed throughout the trophoctoderm of the placenta (Zoli et al., 1991; Green et al., 2000) as soon as 16-25 days after conception (Hartwig, 1993; Green et al., 2000), depending on PAG pattern and progress of pregnancy. It is known, that binucleate cells represent around 20 % of trophoctoderm cells and fuse with maternal uterine cells (Wooding, 1983, 1992). Due to this fusion PAG are transferred to the maternal blood circulation (Wooding, 1983), where they can be measured and constitute a reliable indicator for pregnancy from day 28-30 onwards with an accuracy between 89 and 99 % (Zoli et al., 1992; Friedrich and Holtz, 2004). In 1989 a commercial RIA for determining the protein in maternal serum to detect early pregnancy in dairy cattle was developed (Sasser et al., 1989). Later, enzyme-linked immunosorbant assays (ELISA) were developed and successfully applied (Friedrich and Holtz, 2004; Green et al., 2005).

Additionally, PAG is detectable in milk but limited under commercial laboratory conditions due to its low concentration in milk of 3-4 % compared to serum concentration and milk fat content (Friedrich and Holtz, 2010; Han et al., 2011). Overall, to date only little is known about the actual function of PAG for gestation and offspring. However, previous research found that PAG can be an indicator for stage of gestation, fetus number, sex embryonic health and vitality (Mialon et al., 1993; Szenci et al., 2003; Prvanovic et al., 2009; Giordano et al., 2012).

The present study, aims at the evaluating different means pregnancy diagnoses under field conditions, by applying them to the same cows and following them up until calving.

5.2 Material and Methods

The study was conducted on ten family-run dairy farms in north-western Germany. Average herd size was 144 (SD 78) Holstein-Frisian cows, yielding on average, 36.5 (SD 7.8) kg milk at the time of insemination. A total of 253 primi- and pluriparous cows with

2.2 (SD 1.3) lactations, were inseminated with frozen-thawed semen more than 50 days after calving. Animals had been subjected to an Ovsynch protocol and insemination was conducted 16 hours after the final injection. On days 21, 28 and 49 5 ml strippings of milk were taken after milking, stored at -19°C and analyzed for progesterone content by ELISA according to van de Wiel and Koops (1986), modified by Moeller (1991). Progesterone concentrations of 7 ng/ml or more were taken as indication of the presence of a functional corpus luteum.

Transrectal ultrasonography was conducted by one of two experienced professionals (AI technician and veterinarian) between 29 and 35 days after insemination using a real time B-mode ultrasound scanner (“Piedata Tringa”, dual frequency 5 to 7.5 MHz, Pie Data, West Sussex UK, respectively “Easy Scan”, broadband 4.5 to 8.5 MHz, BCF, Livingston UK). Feces was manually removed from the rectum; the transducer, covered with lubricant, was introduced and both uterine horns were scanned. Fetal heart beat was taken as indicator of an existing pregnancy.

After the ultrasonic measurement a blood sample of 2 to 5ml was drawn from the tail vein (vena coccygealis ventralis) using an aspiration system (Monovette®). Blood was stored in a chilled state for up to 3 days, then centrifuged at $1,500 \times g$ for 10 minutes. The PAG concentration in serum was measured by a competitive two-step ELISA using a polyclonal bPAG-1-IgG rabbit antiserum as described by Friedrich and Holtz (2010). If PAG concentrations in blood were 2.0 ng/ml or more, cows were referred pregnant. Cows with PAG-concentrations between 1 and 1.99 ng/ml were classified as questionably and were not included in the analysis. On day 60 postbreeding all cows underwent rectal palpation by one of three experienced professionals (two AI technicians and a veterinarian). Pregnancy was confirmed when one or more signs of pregnancy (asymmetry of uterine horns, fetal membrane slip, reorganization of an amnionic vesicle) were positive. Uterine horns were manually examined for asymmetry and in the case of an existing asymmetry the fetal membrane slip was conducted. In addition the amnionic vesicle, a spherical, fluid-filled structure recognizable after day 60 of gestation, was palpated.

All cows were followed up until calving, the average duration of pregnancy being 280 days. A deviation of 10 days both ways was considered normal. Cows that were recognized

to be non-pregnant were inseminated when at return to estrus. The reliability of the various methods of pregnancy detection was assessed relative to the calving results.

Each method was evaluated according to the calving result using the chi square equation or UNIANOVA of SPSS 19.0. Differences were considered as significant at $P < 0.05$.

5.3 Results

Of 253 inseminated cows 40 left herds before calving. Of the remaining 213 cows 81 (38 %) calved after 280 (± 10 days). The results of various pregnancy diagnoses relative to the calving result are presented in Table 1. Highest overall reliability was achieved by three milk samplings on days 21, 28 and 49 (97.6 %) followed by manual palpation on day 60 (95.3 %). Two milk progesterone determinations three and four (91.9 %) or three and seven weeks post insemination (88.4 %) were slightly less reliable and of the single determination the one at seven weeks (95.3 %) was highly reliable, whereas those at four (87.2 %) and three weeks (88.3 %) were less so. The determination of PAG in blood resulted in an overall accuracy of 91.6 % followed by Ultrasound on days 29 to 34 (89.2 %).

Out of 213 ultrasonographically examined cows 43.2 % were classified as pregnant due to a verifiable embryo with proper heart beat. On day 60 p.i., 39.9 % of the 213 cows were diagnosed as pregnant by rectal palpation. Neither the time of US examination nor the conducting professional had an influence on accuracy ($P > 0.05$). With regard to calving, 17 cows were diagnosed pregnant when using ultrasound but did not calve in time. Overall 4 cows were diagnosed incorrectly pregnant with regard to results from manual palpation on day 60. However, it was not possible to determine whether pregnancy loss or an error occurred, but it is more likely that those cows lost pregnancy after they were diagnosed pregnant on days 29-34.

When comparing calving outcome with results from palpation on day 60 a total of 7 cows that were diagnosed pregnant but did not calve in time was found. Those 7 cows were

classified as pregnant using ultrasound; 6 of those cows were diagnosed as pregnant by determination of PAG in blood. In 2 cows milk progesterone on each of the three test days was > 7 ng/ml; a third cow showed a decline in milk progesterone below 5 ng/ml on day 49. Of the 4 remaining cows no milk samples were drawn due to the production system. Our findings amounted up to 3.3 % of cows that obviously lost pregnancy after palpation on day 60.

A total of 3 rectally palpated cows were diagnosed non-pregnant on day 60, but did calve in time. In two cases cows were also diagnosed as non-pregnant by US and PAG determination but were bred a second time 20 respectively 21 days after first service and calved 285 to 288 days due to second service. A third cow received a second service 40 days after first service and calved 285 days after first service but was also diagnosed as non-pregnant by US and PAG determination. It seems obvious that those three cows did fail to conceive to first service and calved due to second service earlier than expected.

Table 1: Reliability of various methods of pregnancy detection assessed in 213 dairy cows, 81 (38 %) of which were calving 270 to 290 days after insemination.

Method	Pregnant correct %	Non-pregnant correct %	Overall Reliability %
Manual palpation (day 60)	96.5	94.5	95.3
Ultrasound days 29 to 34)	81.5	95.0	89.2
PAG (day 29 to 34)	83.6	96.8	91.6
Progesterone ^a			
Day 21	82.1	93.6	88.3
Day 28	97.6	77.3	87.2
Day 49	98.0	92.0	95.3
Days 21 + 28	98.0	85.0	91.9
Days 21 + 49	93.6	82.1	88.4
Days 28 + 49	97.6	77.3	87.2
Days 21 + 28 + 49	98.0	97.1	97.6

^aBased on 100 cows, only (41 % pregnant, 59 % non-pregnant), that were not milked by a robotic milking system.

5.4 Discussion

The present study addressed the evaluation of relevant pregnancy diagnosis methods in bovine practice accomplished simultaneously in the same dairy cows. It is known, that fertilization rate in dairy cattle is close to 100 % (Diskin and Morris, 2008). However, in high producing dairy herds actual calving rate is only 40 % due to early and late embryonic mortality and only a small proportion of fertilization failure (Diskin et al., 2006; Diskin and Morris, 2008). This data is confirmed by our findings (38 % final calving outcome). Thus, when discussing accuracy of early pregnancy methods between days 21 and 60 compared to calving outcome, the appearance of pregnancy loss cannot be ignored and depict the limiting factor of early pregnancy diagnosis in cattle. In all methods, except rectal palpation it was more likely to detect non-pregnant cows than pregnant cows. This is of particularly interest when using PGF2 α based synchronization programs such as Resynch as early as 24 days post breeding. However, it has be kept in mind, that rectal palpation was done at an much later stage of pregnancy, when compared with the other techniques.

Rectal palpation, the common method for pregnancy testing in most dairy herds, has been sceptical considered due to potentially occurring pregnancy losses after early pregnancy diagnosis. In particular, rectal palpation has been suspected to increase the incidence of prenatal mortality, when conducted at less then 35 days post breeding, due to fetal rupture (Ball and Carroll, 1963; Abbitt et al., 1978; Paisley et al., 1978; Vaillancourt et al., 1979; Franco et al., 1987; Warnick, 1995). When compared with calving data, no significant differences in pregnancy diagnosis among ultrasonography, PAG determination and palpation were found in our study. Admittedly we conducted rectal palpation later than it is common in bovine practice, to ensure examination was conducted beyond the time of 42 days that is usually associated with early embryonic mortality (Romano et al., 2007) and due to resent results Richardson et al. (2010) that found a significant effect on fetal loss when palpation was conducted earlier than 53 days post breeding. Furthermore the conducting professionals in this study hold 15 + years of experience in palpation which minimize the likelihood of errors or fetal rupture. However, because of cost-benefit reasons it is still the primary method used for pregnancy diagnosis (Fricke, 2006) and it is questionable if laboratory-based methods will display transrectal palpation.

When comparing calving outcome with results from early pregnancy diagnosis using US, an accuracy of 89.2 % is similar to those figures reported earlier when US was used as early as 29 days (Taverne et al., 1985; Pieterse et al., 1990; Nation et al., 2003). No matter whether uterine fluid or embryonic heartbeat are used as positive signs for pregnancy, a 100 % accuracy is impossible to achieve due to physiological as well as pathological make-up of individual animals (Pieterse et al., 1990; Kastelic et al., 1991). However, with first pregnancy diagnosis made 41 days p.i or later (Maurice et al., 1989) found a higher likeliness of a born calf compared to very early pregnancy tests. Similar to Nation et al. (2003), who reported 9 % of fetal loss between US on day 28 p.i. and reassessment in week 13, fetal loss respectively an increased amount of uterine fluid in the periestrus period (Pieterse et al., 1990) might be an explanation for the 17 cows diagnosed incorrectly as positive in our study. Incorrect negative diagnoses were made only in a small proportion and might be connected with anatomic conditions mainly in mature, multiparous cows (Gonzalez et al., 2004).

Different progesterone levels as indicator for an existing pregnancy were evaluated before (Hoffmann et al., 1976; Abbitt et al., 1978; Cox et al., 1978; Pieterse et al., 1990). The accuracy of the milk progesterone test depends on the time of sampling. In agreement with Niggemeyer (1990) and Möller and Holtz (1989) we found an increase in accuracy with the number of samples per animal taken, while the positive predict value was higher than the negative. Thus, when applying milk progesterone tests, reliable results are only convertible with the effort of additional sampling. In our study a threshold of 7 ng/ml proved to be efficient in most cows when determining pregnancy. The loss of accuracy in detecting non-pregnant cows when samples were taken on days 21 + 49 or 28 + 49 respectively might be associated with the chosen threshold of 7 ng/ml. Niggemeyer (1990) and Arnstadt (1983) found higher accuracy in some individual animals when a threshold of 5 ng/ml or 10 ng/ml respectively was chosen to determine pregnancy status. In general the milk progesterone test can provide a valuable tool for monitoring reproductive status in herds, determination of optimal time for AI, early embryonic death or abnormal cycle length (Cox et al., 1978; Holtz et al., 1986).

As the second evaluated laboratory-based diagnosis method in this study, the PAG test proved to be a highly accurate method with a negative predict value close to 100 %.

Similar results have been found earlier (Zoli et al., 1992; Szenci et al., 1998; Friedrich and Holtz, 2004, 2010). However, of 213 cows 59 were eliminated from data due to questionable (1.00-1.99 ng/ml) PAG results. This was according to the results of Friedrich and Holtz (2010), who suggested a reassessment of cows manifesting PAG concentrations of 1.00 and 1.99 ng/ml, when blood samples were drawn at less than 35 days postbreeding. The average difference between questionable pregnant and questionable non-pregnant cows that actually calved is 0.43 ng/ml. At this point in time reliable diagnosis in cows, manifesting PAG concentrations between 1.00 and 1.99 at an early stage of gestation (< 35 days) are not possible and more research is needed. Additionally the use of the PAG test can be limited due to long half life of PAG. Residual PAG from the previous pregnancy has been found for nearly 100 p.p. in serum (Zoli et al., 1992) and in cows that conceived but lost pregnancy for up to 5 days. Both cases might lead to cows incorrectly diagnosed pregnant, when service period is less than 70 days or when fetal death occurred lately. In our study, average service period was long enough to avoid incorrect diagnosis due to residual PAG. Similar to US, diagnosis pretend incorrect positive with determining the PAG concentration around day 30 may be attributed to early embryonic death.

Both laboratory based methods, PAG test and progesterone test, provide reliable results at an early stage of gestation. Additionally, the drawing of blood or milk samples is non-invasive for the embryo regardless of the stage of gestation. However, high variation in PAG-concentrations by the individual cow correlated with breed of mother, fetal sex (Zoli et al., 1992), milk performance, paternal effects (Lopez-Gatius et al., 2007) and fetal number (Patel et al., 1997; Lopez-Gatius et al., 2007) aggravate reliable diagnoses at an very early stage of gestation at this stand of knowledge. Conversely, the reason for deficient acceptance of lab-based methods in bovine practice might be the fact that those methods do not provide immediate testimony about pregnancy status or reproductive disorders.

Expense and practicability of each individual diagnosis method are playing the major role when considering the application of the one or the other diagnosis method. In many cases pregnancy diagnosis, using rectal palpation or ultrasound, is offered by A.I. technician and veterinarians as part of their daily service for a small amount. Laboratory-based methods such as the determination of PAG or progesterone, with prices starting from currently 5 to

7 € per sample, are not competitive in some regions at this point of time when compared to 3 € per cow for rectal palpation. However, both laboratory-based methods are competitive with ultrasound; costs per cow range between 8 and 15 €. On the other hand those laboratory-based methods offer the advantage of independence and practicability for the producer. Dairy producers are eligible, after a brief instruction by a veterinarian, to draw blood in their own herd. The collection of both, blood (PAG) or milk (progesterone), can be easily established as part of the daily herd management.

5.5 Conclusion

In conclusion, with this study, we showed that the four evaluated pregnancy diagnosis methods provide reliable diagnosis with a high accuracy for milk progesterone determination; ultrasound and PAG test, as early as 21 to 35 days postbreeding. Even if increasing herd sizes and the use of reproductive management tools such as aggressive Ovsynch-Resynch protocols demand methods to identify non-pregnant cows as soon as possible, the benefit of declined days open due to early pregnancy diagnosis is limited by the incidence of early embryonic mortality, variations by the individual animal and the availability of an experienced professional. Laboratory based methods, such as the determination of PAG, offer an alternative to ultrasound and rectal palpation and will gain in importance. Nevertheless, an anew pregnancy check later in pregnancy is essential. Ultimately price and disposability and producer's preferences will be determining which pregnancy diagnosis method is used on each individual dairy farm.

5.6 References

See chapter VII

Acknowledgements

The authors thank Intervet Germany (Unterschleißheim) for providing Estrumate® and Receptal® and Chorulon®, the participating dairy farmers and Elisabeth Stüwe for the laboratory work and assistance.

Kapitel VII

Kapitel VI

Schlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit besteht aus drei Versuchen: Die erste Untersuchung beschäftigt sich mit der terminorientierten künstlichen Besamung unter Anwendung des Ovsynch- bzw. Presynch-Protokolls in mittelgroßen ostfriesischen Milchvieherden (Besamungsgebiet Verein Ostfriesischer Stammviehzüchter). Zugleich soll der Frage nachgegangen werden, ob durch den Einsatz von hCG anstelle von GnRH zur Ovulationsauslösung über eine bessere Gelbkörperausbildung und damit eine Verringerung von frühen Trächtigkeitsabbrüchen zu erreichen ist. In der zweiten Untersuchung wird die Anwendung des Pre- und Ovsynch-Verfahrens ebenfalls unter Einsatz von GnRH und hCG, in vier brandenburgischen Großbetrieben und 17 niedersächsischen Familienbetrieben gegenübergestellt. In der dritten Untersuchung werden praxisrelevante Methoden der Trächtigkeitsuntersuchung beim Milchrind in einer Feldstudie verglichen.

Im ersten Versuch sollte untersucht werden, ob die terminorientierte Besamung nach Ovsynch- und Presynch-Behandlung erfolgreich in kleinere bis mittlere Herdenstrukturen (50 bis 300 Kühe), wie sie typisch für den Nordwesten Deutschlands sind, etabliert werden kann. Zugleich sollte der Austausch von GnRH durch hCG zur Ovulationsauslösung erprobt werden. Humanes Choriongonadotropin besitzt LH-Wirkung und zeichnet sich durch eine sehr lange Halbwertszeit aus. Daher wurde vermutet, dass hCG nachhaltiger auf die Gelbkörperausbildung wirkt als ein GnRH-Analog und damit eine Verringerung von frühen Trächtigkeitsabbrüchen zu erreichen wäre.

Die Untersuchung an 618 primi- und pluriparen Holstein-Frisian Kühen erfolgte zwischen September 2008 und Februar 2011. Auf vier Betrieben wurden 450 besamungsfähige Tiere zufällig ohne tierärztliche Voruntersuchung ausgewählt. In zwei Betrieben wurden die Tiere nach dem Presynch-Verfahren (n=300) behandelt; in den anderen beiden Betrieben nach dem Ovsynch-Verfahren (n=150). Tiere in beiden Behandlungsgruppen erhielten, unabhängig vom Zyklusstatus, eine GnRH-Injektion (10µg Buserelin, Receptal®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) gefolgt, sieben Tage später, von einer luteolytischen PGF₂α-Injektion (Estrumate®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland). Weitere zwei Tage später erhielt die eine Hälfte der Behandlungsgruppe eine

zweite, ovulationsinduzierende GnRH-Injektion (10µg Buserelin, Receptal®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland). Die andere Hälfte erhielt hCG (1.500 IE, Chorulon®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland). Tiere in der Behandlungsgruppe Presynch waren ausserdem zusätzlich vorsynchronisiert worden. Dies erfolgte durch zwei PGF2 α -Injektionen (500µl Cloprostenol, Estrumate®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) im Abstand von 14 Tagen, wobei die zweite Injektion 12 Tage vor der GnRH-Gabe erfolgte. In allen Behandlungsgruppen erfolgte die Besamung, unabhängig von Brunstsymptomen, 16-20 Stunden nach der ovulationsinduzierenden Injektion (GnRH oder hCG). Das Presynch-Verfahren bestand aus zwei PGF2 α Injektionen (500µl Cloprostenol, Estrumate®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) im Abstand von 14 Tagen, wobei die zweite Injektion 12 Tage vor der ersten GnRH Injektion erfolgte. Weitere 168 Tiere blieben zur Kontrolle und wurden bei der nächstfolgenden Brunst besamt. Zwischen dem 30. und 45. Tag nach der Besamung wurde allen Tieren eine Blutprobe aus der Schwanzvene (Vena coccygealis ventralis) entnommen um anhand der im institutseigenen Labor vorgenommenen PAG-Bestimmung das Vorhandensein einer Trächtigkeit zu überprüfen.

Die erzielten Trächtigkeitsraten in den Behandlungsgruppen Presynch- (34 bis 42 %) oder Ovsynch-Verfahren (35 bis 51 %) sowie den unbehandelten Kühen (36 bis 57 %) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Verwendung von GnRH anstelle von hCG resultierte in einer Verschlechterung der Trächtigkeitsraten von 44 % (42 bis 51 %) auf 34 % (34 bis 35 %). Der Unterschied der hCG-behandelten Tiere zu den unbehandelten Tieren (48 %) war nicht signifikant.

Durch die Anwendung des Presynch-Verfahrens in den entsprechenden Betrieben, konnte eine Verkürzung der Rastzeit auf 72 Tage im Vergleich zu den unbehandelten Tieren mit 80 Tagen erzielt werden. Der Einsatz des Ovsynch-Verfahrens erbrachte keine Verkürzung der Rastzeit (85 Tage).

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass Ovulationssynchronisationsprogramme wie das Pre- oder Ovsynch-Verfahren mit gleichbleibenden Trächtigkeitsraten aber einer Erhöhung der Brunstnutzungsrate auch in kleineren und mittleren Herdenstrukturen zum Einsatz kommen können. Aus ökonomischen und arbeitswirtschaftlichen Gründen ist der erhöhte Präparat-

und Arbeitsaufwand beim Presynch-Verfahren unter den gegebenen Bedingungen aufgrund der gleich bleibenden Trächtigkeitsraten nicht zu rechtfertigen. Der Austausch von GnRH durch hCG führte zu keiner Verbesserung der Trächtigkeitsraten und ist unter Berücksichtigung der Studienbedingungen nicht zu empfehlen. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die untersuchten Betriebe nicht direkt miteinander verglichen werden können und die beschriebenen Resultate unter anderen Bedingungen möglicherweise anders ausfallen können. Da der Einsatz von Hormonen im Rahmen von Fruchtbarkeitsprogrammen beim Rind von der Öffentlichkeit häufig als kritisch angesehen wird, ist anzumerken, dass die eingesetzten Präparate in äusserst geringen Dosen verabreicht wurden, um auf diese Weise physiologisch Abläufe zu synchronisieren.

Die Zielstellung des Feldversuchs war, die Effizienz der terminorientierten Besamung in den für die deutsche Landwirtschaft traditionellen Betriebsstrukturen (Familienbetrieb bis 300 Kühe) und Großbetrieben mit Fremdarbeitskräften (400 bis 1.200 Kühe) gegenüberzustellen. In diesem Zusammenhang wurde, ähnlich der Fragestellung in Versuch 1, die Ovulation bei einem Teil der Kühe mit hCG anstelle von GnRH induziert, sowie Presynch- und Ovsynch-Verfahren durchgeführt.

Insgesamt 1.509 primi- und pluripare Kühe der Rasse Holstein Frisan wurden in 17 niedersächsischen familiengeführten Betrieben und 4 brandenburgischen Großbetrieben in den Versuch aufgenommen und wie folgt in Behandlungsgruppen eingeteilt:

- 409 Kühe (Niedersachsen) und 247 Kühe (Brandenburg): Ovsynch-Verfahren
- 327 Kühe (Niedersachsen): Presynch-Verfahren
- 360 Kühe (Niedersachsen) und 166 Kühe (Brandenburg): besamt bei Brunsteintritt

Kühen in der Ovsynch-Gruppe wurde unabhängig vom Zyklusstand GnRH (10µg Buserelin, Receptal®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland), gefolgt, sieben Tage später, von PGF2α (500µl Cloprostenol, Estrumate®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) intramuskulär verabreicht. Die Ovulation wurde zwei Tage später, bei der einen Hälfte der Tiere mit der Gabe von GnRH (10µg Buserelin, Receptal®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) und bei der anderen Hälfte mit hCG (1.500 IE, Chorulon®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) induziert.

Das Presynch-Verfahren bestand aus zwei PGF2 α -Injektionen (500 μ l Cloprostenol, Estrumate®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) im Abstand von 14 Tagen, gefolgt , 12 Tage vor der ersten GnRH-Gabe (10 μ g Buserelin, Receptal®, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Deutschland). Alle Kühe wurden terminorientiert 16 bis 20 Stunden später besamt. Zur Bildung einer unbehandelten Vergleichsgruppe wurden aus jeder Herde insgesamt 526 Kühe, ausgewählt und gemäß der Morgens-Abends-Regel besamt, sobald eine Brunst erkennbar war. Zwischen dem 30. und 45. Tag nach der Besamung wurde allen Tieren eine Blutprobe aus der Schwanzvene (Vena coccygealis ventralis), zwecks Trächtigkeitsuntersuchung mittels PAG entnommen.

Die Trächtigkeitsraten über alle Betriebe hinweg lag nach Presynch-Behandlung zwischen 34 % (hCG) und 44 % (GnRH) bzw. nach Ovsynch-Behandlung zwischen 34 % (hCG) und 41 % (GnRH). Bei Kühen die nach Brunstbeobachtung besamt wurden, wurde eine durchschnittliche Trächtigkeitsrate von 45 % erreicht. Deutliche Unterschiede wurden bei Betrachtung der Besamungsnummer festgestellt. Die Erstbesamungsergebnisse nach terminorientierter Besamung fielen mit 33 % (Ovsynch) bis 39 % (Presynch) deutlich niedriger aus als die der unbehandelten Kontrolltiere (46 %). Der Trächtigkeitserfolg bei Nachbesamung fiel generell mit 34 bis 41 % günstiger aus als nach terminorientierten Erstbesamung. Kein Unterschied wurde bei den Trächtigkeitsraten von terminorientiert nachbesamten Kühen (41 %) und den entsprechenden Kontrolltieren (34 %) ermittelt. Die Rastzeit betrug in den niedersächsischen Betrieben 75 Tage bei Presynch-Behandlung, 93 Tage bei Ovsynch-Behandlung und 84 Tage bei den unbehandelten Tieren, und bei den brandenburgischen Betrieben 97 Tage bei Ovsynch-Behandlung und 93 Tage bei den Kontrolltieren. Durch die Anwendung des Presynch-Verfahrens in den niedersächsischen Betrieben konnte die Rastzeit von durchschnittlich 95 Tagen in der Ovsynch-Gruppe und 87 Tagen in der Kontrollgruppe auf 75 Tage verkürzt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Reproduktionsleistung der Kühe in den niedersächsischen und brandenburgischen Betrieben unterschied. Jedoch kann die terminorientierte Besamung in beiden Produktionssystemen erfolgreich integriert werden. Der Einsatz von hCG statt GnRH zur Ovulationsinduktion erwies sich als nicht effektiv und ist unter den gegebenen Bedingungen nicht anzuraten. Generell wurde beobachtet,

dass die Erstbesamungsergebnisse nach terminorientierter Besamung niedriger ausfielen als die der erstbesamten unbehandelten Tiere, was jedoch möglicherweise auf die kürzere Rastzeit zurückzuführen ist. Umgekehrt spiegeln die Trächtigkeitsergebnisse bei Wiederbelegung in der unbehandelten Gruppe in den brandenburgischen Betrieben die Problematik der erschwerten Brunstkontrolle bei Hochleistungskühen, insbesondere im mittleren Laktationsstadium, wieder. Daher kann insbesondere für Nachbesamungen das Ovsynch-Verfahren unter den dort herrschenden Bedingungen empfohlen werden.

Bei kritischer Betrachtung beider Feldstudien zum Ovsynch-Verfahren muss berücksichtigt werden, dass einzelnen Betriebe oder gar Regionen nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Um präzisere Aussagen treffen zu können, wäre eine Durchführung der terminorientierten Besamung über einen längeren Zeitraum in vergleichbaren Beispielbetrieben mit einer zeitgleichen Erfassung weiterer Fruchtbarkeitsparameter unter Berücksichtigung von Haltung, Fütterung und Gesundheitsstatus der Tiere anzuraten. Um die tatsächlichen Ursachen für das schlechte Abschneiden der hCG-behandelten Tiere zu ergründen, wäre es notwendig die Vorgänge am Ovar, beispielsweise mit Ultraschall, zu überwachen. Insgesamt ist jedoch anzumerken, dass es bei der Einführung eines systematischen Reproduktionsmanagement darauf ankommt, dass alle Behandlungen gewissenhaft entsprechend dem Behandlungsplan durchgeführt und dokumentiert werden. Zusätzlich sollten Besamungsdurchführung und Umgang mit dem Sperma optimiert werden.

Ziel des dritten Versuchs war, in der Praxis angewandte Trächtigkeitsuntersuchungsmethoden nämlich die manuelle Palpation, die Ultraschalldiagnostik, die Bestimmung des Pregnancy-Associated-Glycoprotein (PAG) im Blut sowie der Milchprogesteronbestimmung hinsichtlich ihrer Aussagesicherheit, gemessen am Abkalbeergebnis, gegenüberzustellen. Im Zuchtgebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) wurden 213 primi- und pluripare Holstein-Frisian Kühe in zehn ausgewählten Betrieben besamt und mit den genannten Diagnoseverfahren auf deren Trächtigkeitsstatus hin geprüft. Die für den Milchprogesterontest erforderlichen Nachgemelksproben wurden von den jeweiligen Betriebsleitern an Tag 21, 28 und 49 p.i. aus dem Nachgemelk gewonnen und bis zum Zeitpunkt der Laboranalyse tiefgefroren. Die Trächtigkeitsfeststellung mittels Ultrasonographie wurde zwischen dem 29. und 35. Tag

p.i. durch einen versierten Tierarzt bzw. Besamungsbeauftragten unter Verwendung einer real-time B-mode Scanners durchgeführt. Zugleich wurde für die Bestimmung der PAG-Konzentration zwischen dem 29. und 35. Tag p.i. den Kühen Blut aus der Schwanzvene (Vena coccygealis ventralis) entnommen und mittels ELISA analysiert. Die manuelle rektale Palpation des Uterus am Ende des Kleinsäckchenstadiums erfolgte am Tag 60 p.i. durch einen Tierarzt oder Besamungsbeauftragten mit mehrjähriger Berufserfahrung. Als Referenzmethode (100 %) wurde die Abkalbung (physiologische Tagezeit 280 ± 10 Tage) gewählt. Die tatsächliche Abkalberate betrug 38 %. Demzufolge lag die Aussagesicherheit des Milchprogesterontest, durchgeführt am Tag 21 bei 88.3 %, am Tag 28 bei 87.2% und bei am Tag 49 bei 95.3 %. Die Kombination der einzelnen Probetage 21, 28 und 49 erbrachte die höchste Aussagesicherheit von 97.6 %, wobei die Betrachtung zweier Probetage mit Genauigkeiten von 87.4 % (Tag 28 und 49) und 91.9 % (Tag 21 + 28) deutlich niedriger lagen. Mittels Ultraschall zwischen dem 29. und 35. Tag nach Besamung wurden 89.2 % der Kühe, richtig diagnostiziert. Der PAG Trächtigkeitstest erreichte eine Aussagesicherheit von 91.6 %. Bei Durchführung der manuellen Palpation wurden 95.3 % der Kühe richtig als tragend bzw. nicht-tragend erkannt. Während für den Ultraschall und den PAG-Trächtigkeitstest die Wahrscheinlichkeit einer korrekt gestellten Diagnose „nicht-tragend“ höher (95.0 % bis 96.8 %) war, wurden mit den Methoden manuelle Palpation und Milchprogesterontest tragende Tiere zuverlässiger erkannt (93.6 % bis 96.5 %).

Zusammenfassend, bei Betrachtung der Ergebnisse muss angemerkt werden, dass grundsätzlich der zeitliche Abstand vom Besamungstermin der verschiedenen Methoden berücksichtigt werden. Je früher die Diagnose erfolgt, desto größer wird der Einfluss der embryonalen Mortalität sein. Andererseits ist eine möglichst frühe Feststellung einer ausgebliebenen Trächtigkeit im Sinne einer baldigen Wiederbelegung erstrebenswert. Folglich wäre eine möglichst zuverlässige frühe Trächtigkeitsdiagnose erstrebenswert, der gegebenenfalls eine Nachkontrolle zu einem späteren Zeitpunkt folgen müsste. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist zu beachten, dass sowohl Ultraschall als auch manuelle Palpation von versierten Fachleuten durchgeführt wurden. Im Einzelfall könnten daher die Ergebnisse, in Abhängigkeit der Erfahrung des Untersuchers, deutlich abweichen.

Insgesamt besteht bei den laborgebundenen Diagnosemethoden noch Bedarf an umfassenden Studien. Jedoch bietet insbesondere der PAG-Trächtigkeitstest in Kombination mit einem strukturierteren Reproduktionsprogramm eine konkurrenzfähige Alternative zur Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall oder Palpation. Neben Untersuchungszeitpunkt und Aussagesicherheit werden im Einzelfall jedoch der Preis der Untersuchung, örtliche Gegebenheiten wie die Verfügbarkeit der einzelnen Methoden, individuelles Reproduktionsmanagement und Betriebsstruktur entscheiden, welche Trächtigkeitsuntersuchungsmethode zum Einsatz kommt.

Kapitel VII

Kapitel VII

Literaturverzeichnis/ References

- Abbitt, B., Ball, L., Kitto, G. P., Sitzman, C. G., Wilgenburg, B., Raim, L. W., and Seidel, G. E. (1978). Effect of 3 Methods of Palpation for Pregnancy Diagnosis Per Rectum on Embryonic and Fetal Attrition in Cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173, 973-977.
- ADR (2010). Rinderproduktion in Deutschland 2010, Zucht Besamung Leistungsprüfung in Deutschland. Bonn, Ausgabe 2011.
- Alexander, B. M., Johnson, M. S., Guardia, R. O., Van de Graaf, W. L., Senger, P. L., and Sasser, R. G. (1995). Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology* 43, 551-556.
- Amiridis, G. S. (2009). Comparison of Aspiration and Hormonal Therapy for the Treatment of Ovarian Cysts in Cows. *Acta Veterinaria Hungarica* 57, 521-529.
- Arnstadt, K. I. (1983). Steroid determination in milk by enzyme immunoassay (EIA). *The Journal of steroid biochemistry* 19, 423.
- Aslan, S., Arslanbas, D., Beindorff, N., and Bollwein, H. (2011). Effects of Induction of Ovulation with GnRH or hCG on Follicular and Luteal Blood Flow in Holstein-Friesian Heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 781-786.
- Bajema, D. H., Hoffman, M. P., Aitchison, T. E., and Ford, S. P. (1994). Use of cow-side progesterone tests to improve reproductive performance of high-producing dairy cows. *Theriogenology* 42, 765-771.
- Ball, L., and Carroll, E. J. (1963). Induction of Fetal Death in Cattle by Manual Rupture of Amniotic Vesicle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 142, 373-&.
- Baxter, S. J., and Ward, W. R. (1997). Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. *Veterinary Record* 140, 287-288.
- Beckers, J. F. (1999). Inactive members of the aspartic proteinase family, the ruminants pregnancy-associated glycoproteins for serological diagnosis. *Annales De Medecine Veterinaire* 143, 253.
- Beckers, J. F., Drion, P. V., Garbayo, J. M., Perenyi, Z., Zarrouk, A., Sulon, J., Remy, B., and Szenci, O. (1999). Pregnancy Associated Glycoproteins in ruminants: Inactive members of the aspartic proteinase family. *Acta Veterinaria Hungarica* 47, 461-469.
- Bostedt, H. (2006). Fruchtbarkeitsmanagement beim Rind.
- Busch, W., and Zerobin, K. (1995). Fruchtbarkeitskontrolle beim Rind. in *Fruchtbarkeitskontrolle bei Groß- und Kleintieren* Sonderauflage, Enke Verlag, Stuttgart, 71-211.

- Butler, J. E., Hamilton, W. C., Sasser, R. G., Ruder, C. A., Hass, G. M., and Williams, R. J. (1982). Detection and Partial Characterization of 2 Bovine Pregnancy-Specific Proteins. *Biology of Reproduction* 26, 925-933.
- Butler, W. R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* 83, 211-218.
- Cain, J. L. (1992). The use of reproductive hormones in canine reproduction. *Problems in veterinary medicine* 4, 453-470.
- Caraviello, D. Z., Weigel, K. A., Fricke, P. M., Wiltbank, M. C., Florent, M. J., Cook, N. B., Nordlund, K. V., Zwald, N. R., and Rawson, C. L. (2006). Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *Journal of Dairy Science* 89, 4723-4735.
- Carnegie, J. A., and Robertson, H. A. (1978). Conjugated and Unconjugated Estrogens in Fetal and Maternal Fluids of the Pregnant Ewe: A Possible Role for Estrone Sulfate during Early Pregnancy. *Biology of Reproduction* 19, 202-211.
- Cartmill, J. A., El-Zarkouny, S. Z., Hensley, B. A., Lamb, G. C., and Stevenson, J. S. (2001). Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *Journal of Dairy Science* 84, 1051-1059.
- Caudle, A. B., Clekis, T., Thompson, F. N., and Vancamp, S. D. (1980). Progesterone in Bovine-Milk Fat. *Theriogenology* 14, 329-338.
- Cavalieri, J., Hepworth, G., Fitzpatrick, L. A., Shephard, R. W., and Macmillan, K. L. (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 65, 45-64.
- Cavalieri, J., Rabiee, A. R., Hepworth, G., and Macmillan, K. L. (2005a). Effect of artificial insemination on submission rates of lactating dairy cows synchronised and resynchronised with intravaginal progesterone releasing devices and oestradiol benzoate. *Animal Reproduction Science* 90, 39-55.
- Cavalieri, J., Rabiee, A. R., Hepworth, G., and Macmillan, K. L. (2005b). Effect of artificial insemination on submission rates of lactating dairy cows synchronised and resynchronised with intravaginal progesterone releasing devices and oestradiol benzoate. *Animal Reproduction Science* 90, 39-55.
- Cavanagh, A. C. (1996). Identification of early pregnancy factor as chaperonin 10: implications for understanding its role. *Reviews of reproduction* 1, 28-32.
- Cavestany, D., Fernandez, M., Perez, M., Tort, G., Sanchez, A., and Sienna, R. (2008). Oestrus behaviour in heifers and lactating dairy cows under a pasture-based production system. *Veterinary Quarterly* 30, 10-36.
- Chebel, R. C., Santos, J. E. P., Cerri, R. L. A., Galvao, K. N., Juchem, S. O., and Thatcher, W. W. (2003). Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial

- insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60, 1389-1399.
- Chebel, R. C., Santos, J. E. P., Cerri, R. L. A., Rutigliano, H. M., and Bruno, R. G. S. (2006). Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *Journal of Dairy Science* 89, 4205-4219.
- Chenault, J. R., Kratzer, D. D., Rzepkowski, R. A., and Goodwin, M. C. (1990). Lh and Fsh Response of Holstein Heifers to Fertirelin Acetate, Gonadorelin and Buserelin. *Theriogenology* 34, 81-98.
- Conn, P. M., and Crowley, W. F. (1994). Gonadotropin-Releasing-Hormone and Its Analogs. *Annual Review of Medicine* 45, 391-405.
- Cordoba, M. C., and Fricke, P. M. (2002). Initiation of the breeding season in a grazing-based dairy by synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science* 85, 1752-1763.
- Cowie, A. T. (1948). Pregnancy diagnosis tests: a review. . *Commonwealth Agricultural Bureaux, Joint Publication Number* 13, 11.
- Cox, N. M., Thompson, F. N., and Culver, D. H. (1978). Milk Progesterone to Predict Reproductive Status in a Commercial Dairy-Herd. *Journal of Dairy Science* 61, 1616-1621.
- de Medeiros, S. F., and Norman, R. J. (2009). Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Human Reproduction Update* 15, 69-95.
- De Rensis, F., Allegri, M., and Seidel, G. E. (1999). Estrus synchronization and fertility in post-partum dairy cattle after administration of human chorionic gonadotrophin (HCG) and prostaglandin F-2 alpha analog. *Theriogenology* 52, 259-269.
- De Rensis, F., Marconi, P., Capelli, T., Gatti, F., Facciolongo, F., Franzini, S., and Scaramuzzi, R. J. (2002). Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or hCG. *Theriogenology* 58, 1675-1687.
- De Rensis, F., and Peters, A. R. (1999). The control of follicular dynamics by PGF2 alpha, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 49-59.
- De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., and Lopez-Gatius, F. (2008). Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 69, 1077-1082.
- de Vries, A., van Leeuwen, J., Thatcher, W. (2005). Economics of Improved Reproductive Performance in Dairy Cattle. *Department of Animal Science, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Science, University of Florida.* online available <http://edis.ifas.ufl.edu>.

- DeJarnette, J. M., and Marshall, C. E. (2003). Effects of pre-synchronization using combinations PGF(2 alpha) and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 77, 51-60.
- Diskin, M. G., and Morris, D. G. (2008). Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 260-267.
- Diskin, M. G., Murphy, J. J., and Sreenan, J. M. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* 96, 297-311.
- Dobson, H., Rowan, T. G., Kippax, I. S., and Humblot, P. (1993). Assessment of Fetal Number, and Fetal and Placental Viability Throughout Pregnancy in Cattle. *Theriogenology* 40, 411-425.
- Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E., and Warnick, L. D. (1998). Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *Journal of Dairy Science* 81, 1874-1882.
- El-Zarkouny, S. Z., and Stevenson, J. S. (2004). Resynchronizing Estrus with Progesterone or Progesterone Plus Estrogen in Cows of Unknown Pregnancy Status. *Journal of Dairy Science* 87, 3306-3321.
- Enginler, S. O., Gunduz, M. C., Alkan, S., and Esen, F. (2012). Large Follicular Cyst in a Holstein Cow. *Pakistan Veterinary Journal* 32, 138-140.
- Evans, K. L., Kasman, L. H., Hughes, J. P., Couto, M., and Lasley, B. L. (1984). Pregnancy diagnosis in the domestic horse through direct urinary estrone conjugate analysis. *Theriogenology* 22, 615-620.
- Falkenberg, U., and Heuwieser, W. (2005). Influence of time of initiation of a prostaglandin F-2 alpha protocol in dairy cows with puerperal endometritis. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 112, 252-256.
- Fernandes, L. C., Thatcher, W. W., Wilcox, C. J., and Call, E. P. (1978). Lh-Release in Response to GnRH During Postpartum Period of Dairy-Cows. *Journal of Animal Science* 46, 443-448.
- Fonseca, F. A., Britt, J. H., McDaniel, B. T., Wilk, J. C., and Rakes, A. H. (1983). Reproductive Traits of Holsteins and Jerseys - 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. *Journal of Dairy Science* 66, 1128-1147.
- Franco, O. J., Drost, M., Thatcher, M. J., Shille, V. M., and Thatcher, W. W. (1987). Fetal Survival in the Cow after Pregnancy Diagnosis by Palpation Per Rectum. *Theriogenology* 27, 631-644.
- Fricke, P. M. (1998). Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 50, 1275.

- Fricke, P. M. (2002). Scanning the future - Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85, 1918-1926.
- Fricke, P. M. (2006). Sync Programs and Ultrasound: Are We Getting in there too Early?
- Fricke, P. M., Caraviello, D. Z., Weigel, K. A., and Welle, M. L. (2003). Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *Journal of Dairy Science* 86, 3941-3950.
- Friedrich, M., and Holtz, W. (2004). Establishment of an ELISA to assess PAG-concentrations in blood and milk of dairy cows. *Reprod. Abstract. Ser.* 31, 21.
- Friedrich, M., and Holtz, W. (2010). Establishment of an ELISA for Measuring Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in Serum or Milk and Its Application for Early Pregnancy Detection. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 142-146.
- Galvao, K. N., Sa, M. F., and Santos, J. E. P. (2007). Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 4212-4218.
- Gasse, H., Lommetz, C., Hoedemaker, M., and Peukert-Adam, I. (1987). Physiologische und klinische Aspekte einer im Trächtigkeitsverlauf veränderlichen Mikromorphologie des bovinen Corpus luteum*. *Reproduction in Domestic Animals* 22, 215-222.
- Geary, T. W., Salverson, R. R., and Whittier, J. C. (2001). Synchronization of ovulation using GnRH or hCG with the CO-Synch protocol in suckled beef cows. *Journal of Animal Science* 79, 2536-2541.
- Geary, T. W., and Whittier, J. C. (1998). Effects of a Timed Insemination Following Synchronization of Ovulation Using the Ovsynch or CO-Synch Protocol in Beef Cows. *The Professional Animal Scientist* 14, 217-220.
- Gehrke, M., and Zbylut, J. (2011). Factors Connected with Pregnancy Loss in Dairy Cows. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 55, 457-464.
- Geisert, R. D., and Malayer, J. R. (2000). Implantation. in *Reproduction in Farm Animals* 7th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 126-140.
- Ginther, O. J., Nuti, L., Wentworth, B. C., and Tyler, W. J. (1974). Progesterone Concentration in Milk and Blood During Pregnancy in Cows. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 146, 354-357.
- Ginther, O. J., Nuti, L. C., Garcia, M. C., Wentworth, B. C., and Tyler, W. J. (1976). Factors Affecting Progesterone Concentration in Cows Milk and Dairy-Products. *Journal of Animal Science* 42, 155-159.
- Giordano, J. O., Guenther, J. N., Lopes Jr, G., and Fricke, P. M. (2012). Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy-specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 683-697.

- Gonzalez, F., Cabrera, F., Batista, M., Rodriguez, N., Alamo, D., Sulon, J., Beckers, J. F., and Gracia, A. (2004). A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays. *Theriogenology* 62, 1108-1115.
- Goodling, R. C., Shook, G. E., Weigel, K. A., and Zwald, N. R. (2005). The effect of synchronization on genetic parameters of reproductive traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 88, 2217-2225.
- Green, J. A., Parks, T. E., Avalle, M. P., Telugu, B. P., McLain, A. L., Peterson, A. J., McMillan, W., Mathialagan, N., Hook, R. R., Xie, S. C., and Roberts, R. M. (2005). The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology* 63, 1481-1503.
- Green, J. A., Xie, S. C., Quan, X., Bao, B. N., Gan, X. S., Mathialagan, N., Beckers, J. F., and Roberts, R. M. (2000). Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reproduction* 62, 1624-1631.
- Green, J. C., Volkmann, D. H., Poock, S. E., McGrath, M. F., Ehrhardt, M., Moseley, A. E., and Lucy, M. C. (2009). Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle. *Journal of Dairy Science* 92, 3819-3824.
- Grunert, E., and Zerbe, H. (1999a). Grundlagen der Hormontherapie. in *Grunert E. und Berchtold, Fruchtbarkeitsstörungen beim weiblichen Rind* 3. Auflage, Parey Bucherverlag Berlin, 159-176.
- Grunert, E., and Zerbe, H. (1999b). Grundlagen der Hormontherapie. in *Fruchtbarkeitsstörungen beim weiblichen Rind* 3. Auflage, Parey Bucherverlag Berlin, 1999, 159-176.
- Gümen, A., Guenther, J. N., and Wiltbank, M. C. (2003). Follicular Size and Response to Ovsynch Versus Detection of Estrus in Anovular and Ovular Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 86, 3184-3194.
- Haigh, J. C., Cranfield, M., and Sasser, R. G. (1988). Estrus Synchronization and Pregnancy Diagnosis in Red Deer. *Journal of Zoo Animal Medicine* 19, 202-207.
- Haigh, J. C., Gates, C., Ruder, A., and Sasser, R. (1991). Diagnosis of pregnancy in wood bison using a bovine assay for pregnancy-specific protein B. *Theriogenology* 36, 749-754.
- Han, R. X., Kim, H. R., Diao, Y. F., Lee, M. G., and Jin, D. i. (2011). Detection of early pregnancy-specific proteins in Holstein milk. *Journal of Proteomics* 75, 3221-3229.
- Hansel, W., Alila, H. W., Dowd, J. P., and Milvae, R. A. (1991). Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 43, 77-89.

- Hansen, L. B. (1983). Yield and fertility relationships in dairy cattle. *Journal of dairy science* 66, 293.
- Harisch, G., and Schwarz, R. (1985). Zur Biochemie der Corpora lutea periodica, der Follikel-Lutein-Zysten, der Nebennierenrinde und der Hypophyse des Rindes*. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 32, 381-390.
- Hartwig, H. (1993). Entwicklung der normalen Gravidität. in *Busch und Schulz: Geburtshilfe bei Haustieren*, 57-100.
- Hay, D. L., and Lopata, A. (1988). Chorionic-Gonadotropin Secretion by Human-Embryos Invitro. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 67, 1322-1324.
- Heap, R. B., Flint, A. P., Hartmann, P. E., Gadsby, J. E., Staples, L. D., Ackland, N., and Hamon, M. (1981). Oestrogen production in early pregnancy. *J Endocrinol.* 1981;89 Suppl:77P-94P.
- Heap, R. B., Gwyn, M., Laing, J. A., and Walters, D. E. (1973). Pregnancy diagnosis in cows; changes in milk progesterone concentration during the oestrous cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunoassay. *The Journal of Agricultural Science* 81, 151-157.
- Heap, R. B., Holdsworth, R. J., Gadsby, J. E., Laing, J. A., and Walters, D. E. (1976). Pregnancy Diagnosis in Cow from Milk Progesterone Concentration. *British Veterinary Journal* 132, 445-464.
- Helmer, S. D., and Britt, J. H. (1986). Fertility of dairy cattle treated with human chorionic gonadotropin (hCG) to stimulate progesterone secretion. *Theriogenology* 26, 683-695.
- Helmer, S. D., and Britt, J. H. (1987). Hormone-Secretion and Characteristics of Estrous Cycles after Treatment of Heifers with Human Chorionic-Gonadotropin or Prostaglandin-F2-Alpha During Corpus-Luteum Formation. *Journal of Animal Science* 64, 782-789.
- Hernandez-Ceran, J., Zarco, L., and Lima-Tamayo, V. (1993). Incidence of delayed ovulation in Holstein heifers and its effects on fertility and early luteal function. *Theriogenology* 40, 1073-1081.
- Hoffmann, B. (1997). Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 105, 296.
- Hoffmann, B., Gunzler, O., Hamburger, R., and Schmidt, W. (1976). Milk Progesterone as a Parameter for Fertility-Control in Cattle - Methodological Approaches and Present Status of Application in Germany. *British Veterinary Journal* 132, 469-476.
- Hoffmann, B., and Hamburger, W. (1974). Determination of Progesterone in Milk by Radioimmunoassay and Its Application for Diagnosis of Bovine Fertility. *Acta Endocrinologica* 75, 90-90.

- Hoffmann, V. B., and Hamburger, R. (1973). Progesteron in der Milch: Radioimmunologische Bestimmung, Beziehungen zur Gelbkörperfunktion and MilCHFettkonzentration*. *Reproduction in Domestic Animals* 8, 154-162.
- Holman, A., Thompson, J., Routly, J. E., Cameron, J., Jones, D. N., Grove-White, D., Smith, R. F., and Dobson, H. (2011). Comparison of oestrus detection methods in dairy cattle. *Veterinary Record* 169, 47.
- Holtz, W., Vonbrackel, A., and Kuster, J. (1986). The Milk Progesterone Test - a Means to Improve Fertility in Dairy Herds. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 33, 321-336.
- Howard, J. M., Manzo, R., Dalton, J. C., Frago, F., and Ahmadzadeh, A. (2006). Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 95, 224-233.
- Humblot, P., Demontigny, G., Jeanguyot, N., Tetedoie, F., Payen, B., Thibier, M., and Sasser, R. G. (1990). Pregnancy-Specific Protein-B and Progesterone Concentrations in French Alpine Goats Throughout Gestation. *Journal of Reproduction and Fertility* 89, 205-212.
- Jainudeen, M. R., and Hafez, E. S. E. (2000). Gestation, Prenatal Physiology, and Parturition. in *Reproduction in Farm Animals* 7th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, USA 140-157.
- Kähn, W. (1992). Ultrasonography as a diagnostic tool in female animal reproduction. *Animal Reproduction Science* 28, 1-10.
- Kaim, M., Bloch, A., Wolfenson, D., Braw-Tal, R., Rosenberg, M., Voet, H., and Folman, Y. (2003). Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *Journal of Dairy Science* 86, 2012-2021.
- Kaltenbach, C. C., Dunn, T. G., Kiser, T. E., Corah, L. R., Akbar, A. M., and Niswende, G. D. (1974). Release of Fsh and Lh in Beef Heifers by Synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone. *Journal of Animal Science* 38, 357-362.
- Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., and Ginther, O. J. (1991). Ultrasonic-Detection of the Conceptus and Characterization of Intrauterine Fluid on Days 10 to 22 in Heifers. *Theriogenology* 35, 569-581.
- Keith, B. R. (2005). Effect of presynchronization using prostaglandin F_{2α} and a milk-ejection test on pregnancy rate after the timed artificial insemination protocol, Ovsynch. *Theriogenology* 63, 722.
- Keskin, A., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Gumen, A., Karakaya, E., Darici, R., and Okut, H. (2010). Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and conception rates in cyclic lactating dairy cows. *Theriogenology* 74, 602-607.

- Kindahl, H. (1980). Prostaglandin Biosynthesis and Metabolism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 176, 1173-1177.
- Kittok, R. J., Britt, J. H., and Convey, E. M. (1973). Endocrine Response after GnRH in Luteal Phase Cows and Cows with Ovarian Follicular Cysts. *Journal of Animal Science* 37, 985-989.
- Lima, F. S., De Vries, A., Risco, C. A., Santos, J. E. P., and Thatcher, W. W. (2010). Economic comparison of natural service and timed artificial insemination breeding programs in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 93, 4404-4413.
- Ledezma-Torres, R. A. (2002). Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) im Blut vom Schaf und Östrogen-Konzentration im Kot der Ziege als Hilfsmittel zur Trächtigkeitsdiagnose. *Göttingen, Univ., Diss., 2002* Cuvillier Verlag Göttingen.
- Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I. G. F., and Bols, P. E. J. (2008a). Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I - The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 612-622.
- Leroy, J. L. M. R., Van Soom, A., Opsomer, G., Goovaerts, I. G. F., and Bols, P. E. J. (2008b). Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part II - Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 623-632.
- Lopes, A. S. (2007). Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal reproduction science* 99, 34.
- Lopez-Gatius, F., Garbayo, J. M., Santolaria, P., Yaniz, J., Ayad, A., de Sousa, N. M., and Beckers, J. F. (2007). Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. *Domestic Animal Endocrinology* 32, 29-42.
- Lucy, M., Green, J., and Poock, S. (2011). Pregnancy determination in cattle: A review of a available alternatives. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science* 84, 1277-1293.
- Lucy, M. C., McDougall, S., and Nation, D. P. (2004a). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproduction Science* 82-3, 495-512.
- Lucy, M. C., McDougall, S., and Nation, D. P. (2004b). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Animal Reproduction Science* 82-83, 495-512.

- Macmillan, K. L., Taufa, V. K., and Day, A. M. (1986). Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (Buserelin) in cattle. III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. *Animal Reproduction Science* 11, 1-10.
- Maurice, E. W., LaFaunce, N., and Mohammed, H. U. (1989). Calving outcomes for cows diagnosed pregnant or nonpregnant by per rectum examination at various intervals after insemination. *Can Vet J* 30, 867-870.
- McDougall, S., Williamson, N. B., and Macmillan, K. L. (1995). GnRH induces ovulation of a dominant follicle in primiparous dairy cows undergoing anovulatory follicle turnover. *Animal Reproduction Science* 39, 205-214.
- McGeady, T. A., Quinn, P. J., FitzPatrick, E. S., Ryan, M. T., and Chahalan, S. (2006). Form of Implementation and Plazentation. in *Veterinary embryology* 1st Edition, Blackwell Publishing, UK, 78-101.
- Meikle, A., Kulcsar, M., Chilliard, Y., Febel, H., Delavaud, C., Cavestany, D., and Chilbroste, P. (2004). Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* 127, 727-737.
- Melendez, P., Duchens, M., Perez, A., Moraga, L., and Archbald, L. (2008). Characterization of estrus detection, conception and pregnancy risk of Holstein cattle from the central area of Chile. *Theriogenology* 70, 631-637.
- Messier, F. (1990). Caribou pregnancy diagnosis from immunoreactive progestins and estrogens excreted in feces. *Journal of Wildlife Management* 54, 279.
- Meyer, H. H. D., and Güven, B. (1986). Improvement of microtitration plate enzyme immunoassays for steroid determination by a second antibody technique. *The Journal of steroid biochemistry* 25, 50.
- Mialon, M. M., Camous, S., Renand, G., Martal, J., and Menissier, F. (1993). Peripheral Concentrations of a 60-Kda Pregnancy Serum-Protein During Gestation and after Calving and in Relationship to Embryonic Mortality in Cattle. *Reproduction Nutrition Development* 33, 269-282.
- Moeller, R. (1991). Enzymeimmunoassays with second antibody for progesterone and porcine LH. *Diss Goettingen*, 1-125.
- Möller, R., and Holtz, W. (1989a). Cowside-tests for progesterone - a useful tool for farmers and veterinarians. *Zuchthygiene-Reproduction in Domestic Animals* 24, 158.
- Möller, R., and Holtz, W. (1989b). Hygia Cowside Milk Progesterone Kit Examined. *Zuchthygiene-Reproduction in Domestic Animals* 24, 35-37.
- Monk, E. L. (1975). Relationships between immunoreactive estrone and estradiol in milk, blood, and urine of dairy cows. *Journal of dairy science* 58, 34.
- Moosbauer, S. (2012). Haltung, Selektion und Umgang mit Natursprungbullen. *Schriftreihen der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft* (1611-4159), 56.

- Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C. A., Mattos, R., Lopes, F., and Thatcher, W. W. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 84, 1646-1659.
- Morton, H., Hegh, V., and Clunie, G. J. A. (1974). Immunosuppression Detected in Pregnant Mice by Rosette Inhibition Test. *Nature* 249, 459-460.
- Morton, H., Nancarrow, C. D., Scaramuzzi, R. J., Evison, B. M., and Clunie, G. J. A. (1979). Detection of Early-Pregnancy in Sheep by the Rosette Inhibition Test. *Journal of Reproduction and Fertility* 56, 75-80.
- Mostl, E. (1984). Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol-17 [alpha] in faeces. *British Veterinary Journal* 140, 287.
- Nancarrow, C. D., Wallace, A. L., and Grewal, A. S. (1981). The early pregnancy factor of sheep and cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 30, 191-9.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiological Reviews* 79, 1193-1226.
- Nash, J. G., Ball, L., and Olson, J. D. (1980). Effects on Reproductive-Performance of Administration of GnRH to Early Postpartum Dairy-Cows. *Journal of Animal Science* 50, 1017-1021.
- Nation, D. P., Malmo, J., Davis, G. M., and Macmillan, K. L. (2003). Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. *Australian Veterinary Journal* 81, 63-65.
- Navanukraw, C., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Kirsch, J. D., Grazul-Bilska, A. T., and Fricke, P. M. (2004). A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 1551-1557.
- Nebel, R. L. (1988). On-Farm Milk Progesterone Tests. *Journal of Dairy Science* 71, 1682-1690.
- Nebel, R. L., Altemose, D. L., Munkittrick, T. W., Sprecher, D. J., and McGilliard, M. L. (1989). Comparisons of eight commercial on-farm milk progesterone tests. *Theriogenology* 31, 753-764.
- Nebel, R. L., Whittier, W. D., Cassell, B. G., and Britt, J. H. (1987). Comparison of On-Farm and Laboratory Milk Progesterone Assays for Identifying Errors in Detection of Estrus and Diagnosis of Pregnancy. *Journal of Dairy Science* 70, 1471-1476.
- Nepomnaschy, P. A., Weinberg, C. R., Wilcox, A. J., and Baird, D. D. (2008). Urinary hCG patterns during the week following implantation. *Human Reproduction* 23, 271-277.
- Niggemeyer, H., Meinhardt, H., and Holtz, W. (1990). Determining Pregnancy in the Cow with the Milk Progesterone Test and Ultrasound. *Reprod. Dom. Anim.* 25.

- Nogalski, Z., and Piwczynski, D. (2012). Association of Length of Pregnancy with Other Reproductive Traits in Dairy Cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25, 22-27.
- O'Connor M. (1993). Heat Detection and Timing of Service
- Paisley, L. G., Mickelsen, W. D., and Frost, O. L. (1978). Survey of Incidence of Prenatal Mortality in Cattle Following Pregnancy Diagnosis by Rectal Palpation. *Theriogenology* 9, 481-491.
- Palmer, E., and Driancourt, M. A. (1980). Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology* 13, 203-216.
- Pape Zambito, D. A. (2008). 17 β -Estradiol and Estrone Concentrations in Plasma and Milk During Bovine Pregnancy. *Journal of dairy science* 91, 127.
- Patel, O. V., Sulon, J., Beckers, J. F., Takahashi, T., Hirako, M., Sasaki, N., and Domeki, I. (1997). Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *European Journal of Endocrinology* 137, 423-428.
- Peters, A. R. (2005). Veterinary clinical application of GnRHâ€”questions of efficacy. *Animal Reproduction Science* 88, 155-167.
- Peters, A. R., Martinez, T. A., and Cook, A. J. C. (2000). A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11â€”14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317-1326.
- Peters, M. W., and Pursley, J. R. (2002). Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF(2 alpha) and GnRH. *Journal of Dairy Science* 85, 2403-2406.
- Phillips, C. J. C. (2010). Breeding and Reproduction in Principles of cattle production. 2nd edition, 50-75.
- Pierson, R. A., and Ginther, O. J. (1988). Ultrasonic-Imaging of the Ovaries and Uterus in Cattle. *Theriogenology* 29, 21-37.
- Pieterse, M. C., Szenci, O., Willemse, A. H., Bajcsy, C. S. A., Dieleman, S. J., and Taverne, M. A. M. (1990). Early-Pregnancy Diagnosis in Cattle by Means of Linear-Array Real-Time Ultrasound Scanning of the Uterus and a Qualitative and Quantitative Milk Progesterone Test. *Theriogenology* 33, 697-707.
- Prvanovic, N., Tomaskovic, A., Grizelj, J., Kocila, P., and Samardzija, M. (2009). Monitoring of early pregnancy and early embryonic mortality by ultrasound and determination of pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in cows. *Veterinarski Arhiv* 79, 259-267.
- Pursley, J. R., Kosorok, M. R., and Wiltbank, M. C. (1997a). Reproductive Management of Lactating Dairy Cows Using Synchronization of Ovulation. *Journal of Dairy Science* 80, 301-306.

- Pursley, J. R., Mee, M. O., and Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of Ovulation in Dairy-Cows Using Pgf(2-Alpha), and GnRh. *Theriogenology* 44, 915-923.
- Pursley, J. R., Wiltbank, M. C., Stevenson, J. S., Ottobre, J. S., Garverick, H. A., and Anderson, L. L. (1997b). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science* 80, 295-300.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., and Hinchcliff, K. W. (2005). Clinical examination and making a diagnosis. *Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.*, 3-41.
- Ranilla, M. J., Sulon, J., Mantecon, A. R., Beckers, J. F., and Carro, M. D. (1997). Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Ruminant Research* 24, 125-131.
- Rensis, F. D. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology* 60, 1139.
- Ribeiro, E. S., Cerri, R. L. A., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Silvestre, F. T., Greco, L. F., Thatcher, W. W., and Santos, J. E. P. (2011). Reproductive performance of grazing dairy cows following presynchronization and resynchronization protocols. *Journal of dairy science* 94, 4984-96.
- Richardson, R. D., Mortimer, R. G., and Whittier, P. (2010). Comparison of Fetal Losses from Diagnosis of Pregnancy Using Ultrasonography or Rectal Palpation in Beef Heifers by Novice or Experienced Technicians. *The Professional Animal Scientist* 26, 341-346.
- Risco, C. A., Moreira, F., DeLorenzo, M., and Thatcher, W. W. (1998). Timed artificial insemination in dairy cattle - Part II. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 20, 1284-+.
- Rivera, H., Lopez, H., and Fricke, P. M. (2004). Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed AI or AI after removed tail chalk. *Journal of Dairy Science* 87, 2051-2061.
- Robertson, H. A. (1979). Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy. *Reproduction* 55, 463.
- Roche, J. F. (2004). Follicular waves in cattle. *Veterinary Research Communications* 28, 107-110.
- Roche, J. F., and Crowley, J. P. (1973). Fertility of Heifers Inseminated at Predetermined Intervals Following Treatment with Mga and Hcg to Control Ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 35, 211-216.
- Rohen, J. W., and Lütjen-Drecoll, E. (2000). Fortpflanzungsorgane (Reproduktionssystem). in *Funktionelle Histologie* 4. Auflage, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 344-400.

- Romano, J. E., Thompson, J. A., Forrest, D. W., Westhusin, M. E., Tomaszweski, M. A., and Kraemer, D. C. (2006). Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology* 66, 1034-1041.
- Romano, J. E., Thompson, J. A., Kraemer, D. C., Westhusin, M. E., Forrest, D. W., and Tomaszweski, M. A. (2007). Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology* 67, 486-493.
- Romano, J. E., Thompson, J. A., Kraemer, D. C., Westhusin, M. E., Tomaszweski, M. A., and Forrest, D. W. (2011). Effects of early pregnancy diagnosis by palpation per rectum on pregnancy loss in dairy cattle. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* 239, 668-673.
- Rosenbaum, A., and Warnick, L. D. (2004). Pregnancy diagnosis in dairy cows by palpation or ultrasound: a survey of US veterinarians. *Proceedings 37th AABP Annual Meeting, Forth Worth, TX*, 198.
- Ruiz, F. J., Oltenacu, P. A., and Smith, R. D. (1992). Cost-Benefit Evaluation of On-Farm Milk Progesterone Testing to Monitor Return to Cyclicity and to Classify Ovarian Cysts. *Journal of Dairy Science* 75, 1036-1043.
- Rüsse, I., and Grunert, E. (1993). Die normale Gravidität. in *Tiergeburtshilfe* 4. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg
- Safar-Hermann, N., Ismail, M. N., Choi, H. S., Möstl, E., and Bamberg, E. (1987). Pregnancy diagnosis in zoo animals by estrogen determination in feces. *Zoo Biology* 6, 189-193.
- Sakonju, I., Enomoto, S., Kamimura, S., and Hamana, K. (1993). Monitoring Bovine Embryo Viability with Early-Pregnancy Factor. *Journal of Veterinary Medical Science* 55, 271-274.
- Saldarriaga, J. P., Cooper, D. A., Cartmill, J. A., Zuluaga, J. F., Stanko, R. L., and Williams, G. L. (2007). Ovarian, hormonal, and reproductive events associated with synchronization of ovulation and timed appointment breeding of Bos indicus-influenced cattle using intravaginal progesterone, gonadotropin-releasing hormone, and prostaglandin F-2 alpha. *Journal of Animal Science* 85, 151-162.
- Sasser, R. G., Crock, J., and Ruder-Montgomery, C. A. (1989). Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 37, 109-13.
- Savela, H., Vahtiala, S., Lindeberg, H., Dahl, E., Ropstad, E., Beckers, J. F., and Saarela, S. (2009). Comparison of accuracy of ultrasonography, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein tests for pregnancy diagnosis in semidomesticated reindeer. *Theriogenology* 72, 1229-1236.
- Schams, D., Schallenberger, E., Menzer, C., Stangl, J., Zottmeier, K., Hoffmann, B., and Karg, H. (1978). Profiles of LH, FSH and progesterone in postpartum dairy cows and their relationship to the commencement of cyclic functions. *Theriogenology* 10, 453-468.

- Schmitt, E. J. P., Barros, C. M., Fields, P. A., Fields, M. J., Diaz, T., Kluge, J. M., and Thatcher, W. W. (1996a). A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *Journal of Animal Science* 74, 1915-1929.
- Schmitt, E. J. P., Diaz, T., Barros, C. M., delaSota, R. L., Drost, M., Fredriksson, E. W., Staples, C. R., Thorner, R., and Thatcher, W. W. (1996b). Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science* 74, 1074-1083.
- Schmitt, E. J. P., Diaz, T., Drost, M., and Thatcher, W. W. (1996c). Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *Journal of Animal Science* 74, 1084-1091.
- Schneider, F. (1981). Möglichkeiten und Grenzen der Trächtigkeitsdiagnose beim Rind. *Informationsblatt* 57, *Vortrag anlässlich der internationalen Fachtagung für künstliche Besamung in Wels/ Österreich*, 5-6.
- Schneider, F., Tomek, W., and Gruendker, C. (2006). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. *Theriogenology* 66, 691-709.
- Schulz, J. (1993). Medikamentöse Maßnahmen in der Geburtshilfe. in *Fruchtbarkeitskontrolle bei Groß- und Kleintieren* 1. Auflage, Enke Verlag Stuttgart, 115-129.
- Seguin, B. E. (1980). Role of Prostaglandins in Bovine Reproduction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 176, 1178-1181.
- Seguin, B. E., Oxender, W. D., and Britt, J. H. (1977). Effect of Human Chorionic-Gonadotropin and Gonadotropin-Releasing Hormone on Corpus-Luteum Function and Estrous-Cycle Duration in Dairy Heifers. *American Journal of Veterinary Research* 38, 1153-1156.
- Senger, P. L. (1994). The Estrus Detection Problem - New Concepts, Technologies, and Possibilities. *Journal of Dairy Science* 77, 2745-2753.
- Serrano, B., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Almeria, S., Garcia-Ispuerto, I., Bech-Sabat, G., Sulon, J., de Sousa, N. M., Beckers, J. F., and Yaniz, J. L. (2009). Factors Affecting Plasma Pregnancy-associated Glycoprotein 1 Concentrations Throughout Gestation in High-producing Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 600-605.
- Short, R. E., Bellows, R. A., Staigmiller, R. B., Berardinelli, J. G., and Custer, E. E. (1990). Physiological-Mechanisms Controlling Anestrus and Infertility in Postpartum Beef-Cattle. *Journal of Animal Science* 68, 799-816.
- Sianangama, P. C., and Rajamahendran, R. (1996). Effect of hCG administration on day 7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. *Theriogenology* 45, 583-592.

- Silva, E., Sterry, R. A., Kolb, D., Mathialagan, N., McGrath, M. F., Ballam, J. M., and Fricke, P. M. (2007a). Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science* 90, 4612-4622.
- Silva, E., Sterry, R. A., Kolb, D., Wiltbank, M. C., and Fricke, P. M. (2007b). Effect of pretreatment with prostaglandin F-2 alpha before resynchronization of ovulation on fertility of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 5509-5517.
- Smith, M. F., Perry, G. A., Atkins, J.A., Jinks, E.M., Pohler, K.G., Patterson, D.J. (2011). Keys to a successful estrus synchronization and artificial insemination program. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 105-121.
- Southee, J. A., Hunter, M. G., and Haresign, W. (1988). Function of Abnormal Corpora-Lutea Invivo after GnRH-Induced Ovulation in the Anestrous Ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* 84, 131-137.
- St-Pierre, N. R., Cobanov, B., and Schmitkey, G. (2003). Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries1. *Journal of dairy science* 86, E52-E77.
- Stevenson, J. S., Johnson, S. K., Medina-Britos, M. A., Richardson-Adams, A. M., and Lamb, G. C. (2003). Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. *Journal of Animal Science* 81, 1681-1692.
- Stevenson, J. S., Kobayashi, Y., and Thompson, K. E. (1999). Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including OvSynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F-2 alpha. *Journal of Dairy Science* 82, 506-515.
- Szenci, O., Beckers, J. F., Humblot, P., Sulon, J., Sasser, G., Taverne, M. A. M., Varga, J., Baltusen, R., and Schekk, G. (1998). Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology* 50, 77-88.
- Szenci, O., Beckers, J. F., Sulon, J., Bevers, M. M., Borzsonyi, L., Fodor, L., Kovacs, F., and Taverne, M. A. M. (2003). Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy associated glycoprotein 1 in heifers. *Veterinary Journal* 165, 307-313.
- Tamanini, C., Chiesa, F., Prandi, A., and Galeati, G. (1986). Estrone and estrone conjugate plasma levels throughout pregnancy in the goat: Their determination as a pregnancy diagnosis test. *Animal Reproduction Science* 11, 35-42.
- Taverne, M. A. M., Szenci, O., Szűcs, J., and Piros, A. (1985). Pregnancy diagnosis in cows with linear-time ultrasound scanning: A preliminary note. *Veterinary Quarterly* 7, 264-270.
- Telugu, B., Walker, A. M., and Green, J. A. (2009). Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family - analysis of gene sequences,

regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. *Bmc Genomics* 10.

- Tenhagen, B. A., Drillich, M., Surholt, R., and Heuwieser, W. (2004). Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: Reproductive and economic considerations. *Journal of Dairy Science* 87, 85-94.
- Thatcher, W. W., Bilby, T. R., Bartolome, J. A., Silvestre, F., Staples, C. R., and Santos, J. E. P. (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30-44.
- Thatcher, W. W., and Chenault, J. R. (1976). Reproductive physiological responses of cattle to exogenous prostaglandin F₂α. *Journal of dairy science* 59, 1366-1375.
- Thatcher, W. W., Drost, M., Savio, J. D., Macmillan, K. L., Entwistle, K. W., Schmitt, E. J., Delasota, R. L., and Morris, G. R. (1993). New Clinical Uses of GnRH and Its Analogs in Cattle. *Animal Reproduction Science* 33, 27-49.
- Thatcher, W. W., Moreira, F., Pancarci, S. M., Bartolome, J. A., and Santos, J. E. P. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 243-254.
- Thompson, J. A., Marsh, W. E., Etherington, W. G., Momont, H. W., and Kinsel, M. L. (1995). Evaluation of the Benefits of the Timing of Pregnancy Testing by Transrectal Palpation in Dairy-Cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207, 1462-&.
- Townson, D. H., Tsang, P. C. W., Butler, W. R., Frajblat, M., Griel, L. C., Johnson, C. J., Milvae, R. A., Niksic, G. M., and Pate, J. L. (2002). Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of Animal Science* 80, 1053-1058.
- Twagiramungu, H., Guilbault, L. A., and Dufour, J. J. (1995). Synchronization of Ovarian Follicular Waves with a Gonadotropin-Releasing-Hormone Agonist to Increase the Precision of Estrus in Cattle - a Review. *Journal of Animal Science* 73, 3141-3151.
- Twagiramungu, H., Guilbault, L. A., Proulx, J. G., and Dufour, J. J. (1994). Influence Corpus-Luteum and Induced Ovulation on Ovarian Follicular Dynamics in Postpartum Cyclic Cows Treated with Buserelin and Cloprostenol. *Journal of Animal Science* 72, 1796-1805.
- Vaillancourt, D., Bierschwal, C. J., Ogwu, D., Elmore, R. G., Martin, C. E., Sharp, A. J., and Youngquist, R. S. (1979). Correlation between Pregnancy Diagnosis by Membrane Slip and Embryonic Mortality. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175, 466-468.
- van de Wiel, D. F. M., and Koops, W. (1986). Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma. *Animal Reproduction Science* 10, 201-213.

- van der Weiden, G. C., and Taverne, M. (1999). Trächtigkeitsuntersuchung in *Grunert E. und Berchtold, Fruchtbarkeitsstörungen beim weiblichen Rind* 3. Auflage; Parey Buchverlag Verlag, Berlin 78-91. .
- Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Rosa, G. J. M., Pursley, J. R., and Wiltbank, M. C. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52, 1067-1078.
- Walker, R. S., Burns, P. D., Whittier, J. C., Sides, G. E., and Zalesky, D. D. (2005). Evaluation of Gonadotropin-Releasing Hormone and Insemination Time Using the Co-Synch Protocol in Beef Cows. *The Professional Animal Scientist*, 190-194.
- Warnick, L. D. (1995). The relationship of the interval from breeding to uterine palpation for pregnancy diagnosis with calving outcomes in Holstein cows. *Theriogenology* 44, 811.
- Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S., and Gumen, A. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17-29.
- Windig, J. J., Calus, M. P. L., and Veerkamp, R. F. (2005). Influence of Herd Environment on Health and Fertility and Their Relationship with Milk Production. *Journal of dairy science* 88, 335-347.
- Wooding, F. B. P. (1983). Frequency and Localization of Binucleate Cells in the Placentomes of Ruminants. *Placenta* 4, 527-539.
- Wooding, F. B. P. (1992). The Synepitheliochorial Placenta of Ruminants - Binucleate Cell Fusions and Hormone Production. *Placenta* 13, 101-113.
- Xie, S. C., Low, B. G., Nagel, R. J., Beckers, J. F., and Roberts, R. M. (1994). A Novel Glycoprotein of the Aspartic Proteinase Gene Family Expressed in Bovine Placental Trophectoderm. *Biology of Reproduction* 51, 1145-1153.
- Xie, S. C., Low, B. G., Nagel, R. J., Kramer, K. K., Anthony, R. V., Zoli, A. P., Beckers, J. F., and Roberts, R. M. (1991). Identification of the Major Pregnancy-Specific Antigens of Cattle and Sheep as Inactive Members of the Aspartic Proteinase Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10247-10251.
- Xu, Z. Z., and Burton, L. J. (1999). Reproductive performance of dairy heifers after estrus synchronization and fixed-time artificial insemination. *Journal of Dairy Science* 82, 910-917.
- Yen, S. S. C., Llerena, O., Little, B., and Pearson, O. H. (1968). Disappearance Rates of Endogenous Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin in Man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 28, 1763.
- Youngquist, R. S. (2006). Pregnancy Diagnosis. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. August 30 and 31, 2006, St. Joseph, Missouri.*

- Zdunczyk, S., Janowsky, T., and Baranski, W. (2012). Late embryonic mortality and fetal losses in eighth dairy herds in Poland. *Reproduction in Domestic Animals, Abstracts 45. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Berlin, 29. Februar - 2. März 2012* 47, 57.
- Zoli, A. P., Beckers, J. F., Woutersballman, P., Closset, J., Falmagne, P., and Ectors, F. (1991). Purification and Characterization of a Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein. *Biology of Reproduction* 45, 1-10.
- Zoli, A. P., Guilbault, L. A., Delahaut, P., Ortiz, W. B., and Beckers, J. F. (1992). Radioimmunoassay of a Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in Serum - Its Application for Pregnancy Diagnosis. *Biology of Reproduction* 46, 83-92.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken (dazu zählen auch Internetquellen) entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Göttingen, 26.September 2012

Daniela Marthold