

UNTERSUCHUNGEN UEBER DEN EINFLUSS VON
KALIUMDICHROMAT UND PROBENLAGERUNG AUF DIE
RADIOIMMUNOLOGISCH GEMESSENE PROGESTERON-
KONZENTRATION IN DER KUHMILCH

*Potasyumdikromat ilave edilerek ya da edilmeksizin saklanan sığır
sütlerindeki progesteron konsantrasyonlarına saklama süresinin ve
ısının etkileri üzerinde araştırmalar.*

Behiç SERPEK¹
Max DÖBELİ²

Özet : Süt örnekleri, laboratuvarlara getirilme ve işlenme sırasında değişik ısılarda ve farklı sürelerde bekletilmek zorunda kalınabilir. Bu çalışmada tablet formunda süte ilave edilen potasyumdikromat'ın depolama ısısı ve zamanına bağımlı olarak radyoimmünojenik metodu ölçülen progesteron konsantrasyonlarında sapmalara neden olmadığı araştırıldı.

Taze süte katılan potasyumdikromat tabletleri (33 mg potasyumdikromat 67 mg potasyumklorid) ölçüm değerlerini deęiřtirmedir. Pratik kořullarda ilk sırayı alan oda ısısında bekletmede ve potasyumdikromat ilave edilmeyen sütlerde zamanın ilerlemesi ile progesteron deęerlerinin düřtüęü saptandı. Bu nedenle teřhiste oluřabilecek hatalardan kaçınabilmek için süt örneklerine potasyumdikromat ilavesi önerildi. Buna karřın +37°C'lik ısıda 168 saat bekletilmeden sonra ölçülen deęer bir sıçrama yaparak bařlangıç deęerinin dört katına ulařtı. Bu olgu proteolitik oluřumlar nedeniyle antikorlara zarar veren maddelerin ortaya çıkmasına baęlanabilir.

Artı 4 ve — 20°C'lik ısılarda bekletilen potasyumdikromatlı ve potasyumdikromatsız süt örneklerinde istatistik açıdan önemsiz hafif bir düşme görüldü. Uzun zamanlı depolamalar için konservatif madde ilave edilmeksizin +4 ve — 20°C'lerin uygun depolama ısıları olduęu gözlemlendi.

- (1) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya - Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- (2) Dr. Oberass., Institut für Zuchthygiene, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich.

Altı kez dondurma ve gözme progesteron konsantrasyonları üzerinde ölçülebilir derecede bir etki göstermedi.

Zusammenfassung : Da Milchproben zwischen Gewinnung und Verarbeitung in spezialierten Labors unterschiedlichen Temperaturen und Transportzeiten ausgesetzt sind, wurde in dieser Arbeit akgeklaert, ob der einfache Zusatz von Kaliumdichromat in Tablettenform in Abhaengigkeit von Dauer und Temperatur der Lagerung zu Abweichungen der radioimmunologisch ermittelten Progesteronkonzentrationen vom Anfangsgehalt führt.

Kaliumdichromat per se veraenderte das Messergebnis nicht. Nach Aufbewahrung bei Raumtemperatur, die den praktischen Verhaeltnissen am naechsten kommt, wurden in Milchen ohne Kaliumdichromat mit fortschreitender Lagerdauer abnehmende Progesteronwerte, so dass sich ein Zusatz von Kaliumdichromat empfiehlt, um Fehlinterpretation in der Diagnostik zu vermeiden. Demgegenüber erreichten die Messwerte bei einer Aufbewahrungstemperatur von 37°C nach 168 Stunden sprunghaft das Vierfache der Ausgangskonzentration, was auf die Bildung proteolytischer und damit den Antikörper schaedigender Substanzen schliessen liess.

Aufbewahrungstemperaturen von +4 und -20°C führten in Milchen mit und ohne Kaliumdichromat zu einer leichten, aber nicht signifikanten Abnahme der Progesteronkonzentration, so dass 4°C für Proben, die kein konservierendes Agens enthalten dürfen, und -20°C für Langzeitlagerung als geeignete Aufbewahrungstemperaturen betrachtet werden dürfen. 6 maliges Einfrieren und Auftauen blieb ohne messbaren Einfluss auf die Progesteronkonzentration.

Einleitung

Die Progesteronbestimmung in der Milch zur Brunsterkennung, Traechtigkeitsdiagnose und Beantwortung tieraertzlicher Fragestellungen hat in den letzten Jahren im In- und Ausland eine breite Anwendung gefunden (2, 6, 11, 12, 14). Die dazu benützten Enzym-oder Radioimmunoassays setzen vorlaeufig unter anderem teure Geraete für die Endpunktbestimmung voraus, so dass die Analysen immer noch auf besonders ausgerüstete Diagnostiklabors beschraenkt bleiben. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, dass die Milchproben in der Regel von ihrem laendlichen Herkunftstort in ein Zentral gelegenes Labor transportiert werden müssen.

In der Zeit zwischen Probengewinnung und Verarbeitung können

patho- und apathogene Keime Ausfäulungen in der Milch verursachen, die ein exaktes Pipettieren verhindern. Zudem ist es denkbar, dass Enzymaktivitäten der Mikroorganismen das Progesteronmolekül denaturieren, was Fehlinterpretationen nach sich ziehen könnte. Zur Verhinderung des Keimwachstums werden deshalb den Milchproben bereits bei der Gewinnung konservierende Agenzien zugegeben: Chloramphenicol (3, 20), Kaliumdichromat (1, 5, 6, 16, 18) und Natriumazid allein (8, 15) oder in Kombination mit Thiomerol (19). Ueberdies werden die Proben nach Ankunft im Labor (sofern sie nicht sofort analysiert werden) bei verschiedenen Temperaturen aufbewahrt: Im Kühlschrank bei 4°C (1, 7, 16, 20) sowie im Gefrierschrank bei -10°C (9), -18°C (10) und bei -20°C (13, 17, 21).

Ueber mögliche Auswirkungen konservierender Agentien und der Lagertemperatur auf den Progesteron Gehalt in der Milch liegen unseres Wissens nur wenige Untersuchungen vor. Taubert et al. (19) gaben ca. 5 mg eines Pulvergemisches aus Natriumazid und Thiomerol im Verhältnis 1:10 in die Milchtransport benutzten Gefässe und beobachteten in keinem Fall Makroskopische Veränderungen der Milch; über mehr als 100 Tage bei 4 oder -20°C gelagerte Proben behielten ihre radioimmunologisch gemessenen Progesteronwerte bei. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass in dieser Studie einenteils Milchproben von niedrigem Progesteron Gehalt (0.35-4.2 ng/ml) und andernteils eine Aktivkohletrennung verwendet wurden, die insbesondere im unteren Konzentrationbereich mit nichtimmunologischen Interferenzen behaftet ist (5). Bei enzymimmunologischen Analysen von Milchproben ohne Zusatz konservierender Agenzien haben Yasura und Kleeberg-Ruppert (21) gefunden, dass die Progesteronkonzentrationen bei einer Lagertemperatur von 20°C nach 3 Tagen und bei einer Lagertemperatur von 4°C nach 1 Woche deutlich niedriger waren als bei Proben -20°C gelagert oder sofort analysiert worden waren.

Obwohl in unserem Labor seit Jahren ausschliesslich Milchproben untersucht werden, die bereits bei der Gewinnung (10 ml Endgemelk) mit 1 Kaliumdichromat-Tablette (siehe 3.1.) versetzt werden, gaben die dargelegte, wenig erhellt Situation sowie die Aussicht auf Einführung der Progesteronbestimmung in der Milch in einem Land mit anders gearteten Transport und Klimaverhältnissen Anlass zur Bearbeitung dieser Probleme.

Fragestellung

Im Routinebetrieb eines Diagnostiklabors kommt eine Langzeitlagerung der Milchen kaum in Betracht, weil die anfallenden Proben vor-

wiegend zur Traechtigkeitsdiagnose und Brunsterkennung bestimmt sind und deshalb verzugslos untersucht werden müssen. Immerhin muss damit gerechnet werden, dass unter Praxisbedingungen (besondere Transportverhaeltnisse, Festtage, Pannen im Untersuchungsgang) 2-5 Tage zwischen der Gewinnung der Probe und ihrer Verarbeitung liegen können.

Die ermittelten Messresultate fallen in Konzentrationberiche, die anhand von Erfahrungswerten eine entsprechende Interpretation der Befunde zulassen; in unserem Labor lauten die Unterscheidungskriterien wie folgt: 0-6.0 ng/ml=spricht nicht für Traechtigkeit; 6.1-9.0 ng/ml=liegt im fraglichen Bereich; 9.0 ng/ml=spricht für Traechtigkeit. Im Hinblick darauf, dass die Befundinterpretation für das Tier und für den Besitzer von weitreichender Bedeutung sein kann, stellt sich die allgemeine Frage, ob das Messresultat lediglich durch die physiologischen Gegebenheiten im Tier oder auch durch andere Faktoren, insbesondere die Zeitspanne zwischen Entnahme und Analyse der Milchprobe sowie die Temperatur waehrend dieser Phase bedingt ist.

Zur Beantwortung waren die folgenden Einzelfragen bei Milch mit hohem Progesterongehalt abzuklaeren:

- 1) Veraendert der Zusatz von Kaliumdichromat das Messresultat?
- 2) Veraendert sich das Messresultat in Milchen mit und ohne Kaliumdichromat in Abhaengigkeit von der Zeit innerhalb einer Woche?
- 3) Veraendert sich das Messresultat in Cilchen mit und ohne Kaliumdichromat in Abhaengigkeit von der Lagertemperatur?

Material und methoden

Ausgangsmaterial, Gruppeinteilung: Von einer traechtigen Kuh (7. Traechtigkeitswoche) werden am Schluss eines morgendlichen Melkaktes 200 ml Milch gewinnen und sofort ins Labor gebracht. Die Milch wird in 42 Portionen zu 5 ml in Polystyrolröhrchen¹ aufgeteilt, von denen 21 je Tablette mit 33 mg Kaliumdichromat und 67 mg Kaliumchlorid enthalten.

-
- (1) *Firma Milian S. A., CH - 1228 Plan - les - Ouates/Genève.*
 - (2) *Kaliumdichromat - Tabletten Merck - Nr. 4858.*

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

Gruppe	Kaliumdichromat	Lagertemperatur		
1	ohne	Raumtemperatur	ca	20°C
2	mit			
3	ohne	Waermeschrank		37°C
4	mit			
5	ohne	Kühlschrank		4°C
6	mit			
7	ohne	Gefrierschrank		— 20°C
8	mit			
9	ohne	Gefrierschrank		— 20°C
10	mit			

Die Gruppen 1-8 umfassen je 5 Portionen, die Gruppen 9 und 10 nur je Röhrchen.

Versuchsplan :

1) Bei Gruppe 1 wird die Progesteronkonzentration sofort (Zeitpunkt 0) sowie bei saemtlichen Gruppen nach 12, 24, 48, 72 und 168 Stunden gemessen.

2) Die Arbeitsdosis (25 µl) wird in den Gruppen 1-8 jedes mal je einem neuen Röhrchen, in den Gruppen 9 und 10 jedoch immer dem gleichen Röhrchen entnommen, dessen Inhalt zwischen den Entnahmen stets wieder eingefroren wird.

3) Unmittelbar vor der Entnahme werden die Röhrchen aus jeder Gruppe waehrend 15 Minuten in ein Wasserbad zu 37°C gestellt und anschliessend auf einem Rolmixer grundlich durchgemischt.

Progesteronbestimmung: Die Progesteronkonzentrationen werden durch Direktinkubation von 25 ul Milch in 500 ul PBS - Gel mit einem ¹²⁵I - Radioimmunoassay gemessen (5). Freies und antikörper gebundenes Hormon werden durch Immunpraecipitation voneinander getrennt.

Datenverarbeitung: Die Rohdaten werden unter Anwendung der Statistikprogramme BMDP 1 D und BMDP D 7 (4) am Rechnenzentrum der Universitaet Zürich bearbeitet³.

(3) *Herrn Dr. E. Eggenberger, Fakultätsstelle für Biometrie, Veterinaer - medizinische Fakultät Zürich, danken wir für seine hilfreiche Beratung.*

Tab. 2. Statistische Masszahlen der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei Raumtemperatur

Zeit [Std.]	n	Gruppe 1: ohne Kaliumdichromat				Gruppe 2: mit Kaliumdichromat				t_3
		\bar{x}	s	$x_{\min} - x_{\max}$	t_1	\bar{x}	s	$x_{\min} - x_{\max}$	t_2	
0	20	14.7	1.1	12.4 16.6						
12	10	13.3	2.6	10.8 17.8	1.53	16.2	2.0	13.8 20.2	1.69	2.78
24	10	15.5	1.1	13.7 17.1	0.82	17.8	1.2	15.1 19.7	3.19	2.05
48	10	13.8	1.0	12.7 15.5	1.13	17.3	1.7	9.9 20.9	3.26	3.81*
72	10	12.5	0.8	11.4 13.5	3.10	16.9	1.4	15.0 19.4	3.24	5.50***
168	10	12.7	1.7	9.6 14.7	1.91	11.6	1.2	9.3 13.1	3.00	0.94

t_1 = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 1

t_2 = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 2

t_3 = Vergleich der Ergebnisse nach verschiedenen Lagerzeiten zwischen Gruppe 1 und 2

Tab. 3: Statistische Masszahlen der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei 37 °C

Zeit [Std.]	n	Gruppe 3: ohne Kaliumdichromat					Gruppe 4: mit Kaliumdichromat					
		\bar{x}	s	$x_{\min} - x_{\max}$	t_1		\bar{x}	s	$x_{\min} - x_{\max}$	t_2	t_3	
0	20	14.7	1.1	12.4	16.6							
12	10	14.5	2.5	11.2	18.2	0.25	18.2	2.4	15.1	22.5	3.97**	3.66*
24	10	20.5	7.4	15.0	38.2	6.03***	17.1	1.7	15.0	20.6	2.51	3.06
48	10	15.2	2.3	11.8	18.7	0.59	19.8	5.4	14.6	32.8	6.34***	4.98***
72	10	17.7	2.7	13.8	22.6	4.27	13.6	2.4	11.0	17.3	1.63	5.11***
168	10	55.0	7.6	41.6	62.7	38.95***	11.7	0.8	10.0	12.7	2.92	36.26***

t_1 = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 3

t_2 = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 4

t_3 = Vergleich der Ergebnisse nach verschiedenen Lagerzeiten zwischen Gruppe 3 und 4

Tab. 4. Statistische Masszahlen der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei + 4 °C

Zeit [Std.]	n	Gruppe 5: ohne Kaliumdichromat				Gruppe 6: mit Kaliumdichromat				t ₃
		\bar{x}	s	x _{min} - x _{max}	t ₁	\bar{x}	s	x _{min} - x _{max}	t ₂	
0	20	14.7	1.1	12.4 16.6						
12	10	10.2	1.2	7.8 11.8	5.12**	12.8	2.8	9.6 17.0	2.15	2.57
24	10	12.7	1.6	10.4 14.7	2.11	17.8	1.2	15.8 19.4	3.23	4.62***
48	10	12.1	1.2	9.9 13.3	3.26	13.9	1.4	11.8 16.2	1.01	1.94
72	10	13.6	1.4	11.5 16.0	1.57	12.8	1.4	9.7 14.3	2.79	1.06
168	10	13.1	2.0	11.1 16.7	1.50	12.3	0.7	11.4 13.3	2.33	0.72

t₁ = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 5

t₂ = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 6

t₃ = Vergleich der Ergebnisse nach verschiedenen Lagerzeiten zwischen Gruppe 5 und 6

Tab. 5: Statistische Masszahlen der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei - 20 °C

Zeit [Std.]	n	Gruppe 7: ohne Kaliumdichromat				Gruppe 8: mit Kaliumdichromat				t ₃
		\bar{x}	s	x _{min} - x _{max}	t ₁	\bar{x}	s	x _{min} - x _{max}	t ₂	
0	20	14.7	1.1	12.4 16.6						
12	10	12.1	3.1	8.7 19.0	3.00	11.4	2.1	5.0 15.0	3.72**	0.62
24	10	14.8	1.6	12.9 17.1	0.08	14.0	1.2	12.4 16.1	0.71	0.69
48	10	13.8	1.5	11.6 16.5	1.16	12.9	1.1	11.1 14.5	2.27	0.96
72	10	13.8	1.4	12.2 16.6	1.28	12.7	1.4	10.4 15.0	2.93	1.43
168	10	14.2	1.6	11.6 16.3	0.45	13.1	1.6	10.5 15.2	1.53	1.63

t₁ = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 7

t₂ = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 8

t₃ = Vergleich der Ergebnisse nach verschiedenen Lagerzeiten zwischen Gruppe 7 und 8

Tab 6. Statistische Masszahlen der Progesteronkonzentrationen nach mehrmaligem Einrieren auf
- 20 °C und Auftauen während 6 Tagen

Zeit [Std.]	n	Gruppe 9: ohne Kaliumdichromat				Gruppe 10: mit Kaliumdichromat				t ₃
		\bar{x}	s	x _{min} - x _{max}	t ₁	\bar{x}	s	x _{min} - x _{max}	t ₂	
0	20	14.7	1.1	12.4 16.6						
12	10	12.1	3.1	8.6 19.0	3.00	11.4	2.1	9.3 14.9	3.72*	0.62
24	10	14.8	1.5	12.9 17.1	0.08	14.0	1.2	12.4 16.1	0.71	0.69
48	10	12.7	1.8	10.8 15.7	2.44	13.2	1.0	11.5 14.6	1.92	0.45
72	10	13.3	3.0	10.0 18.8	1.98	13.7	2.2	9.8 15.6	1.48	0.43
168	10	11.4	2.1	7.7 15.0	3.20	14.7	2.8	10.7 18.2	0.04	2.81

t₁ = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 9

t₂ = Vergleich des Ausgangswertes mit den Ergebnissen innerhalb der Gruppe 10

t₃ = Vergleich der Ergebnisse nach verschiedenen Lagerzeiten zwischen Gruppe 9 und 10

Allgemeine Indices in den Tabellen 2 - 7:

Werte mit * unterscheiden sich mit P<0.05

** unterscheiden sich mit P<0.01 vom jeweiligen Vergleichswert.

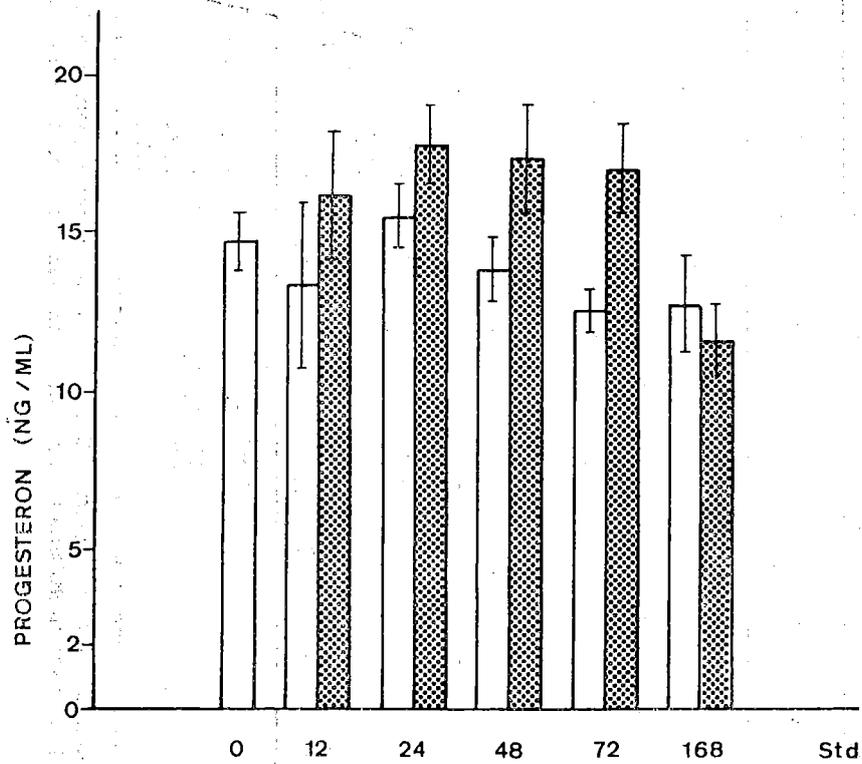
*** unterscheiden sich mit P<0.001

Tab. 7. Vergleich der durchschnittlichen Progesteronkonzentrationen nach verschiedenen Lagerzeiten bei Milchen mit und ohne Zusatz von Kaliumdichromat

Zusatz	Zeit [Std.]	Raumtemperatur			+ 37 °C			+ 4 °C			- 20 °C		
		[ng/ml]		t	[ng/ml]		t	[ng/ml]		t	[ng/ml]		t
		\bar{x}	s		\bar{x}	s		\bar{x}	s		\bar{x}	s	
Ohne Kalium- dichromat	0	14.7	1.1										
	12	13.3	2.6	1.53	14.5	2.5	0.25	10.2	1.2	5.12***	12.1	3.1	3.00
	24	15.5	1.1	0.82	20.5	7.4	6.03	12.7	1.6	2.11	14.8	1.6	0.08
	48	13.8	1.0	1.13	15.2	2.3	0.59	12.1	1.2	3.26	13.8	1.5	1.16
	72	12.5	0.8	3.10	17.7	2.7	4.27	13.6	1.4	1.57	13.8	1.4	1.28
168	12.7	1.7	1.91	55.0	7.6	38.95	13.1	2.0	1.50	14.2	1.6	0.45	
Mit Kalium- dichromat	0												
	12	16.2	2.0	1.69	18.2	2.4	3.97**	12.8	2.8	2.15	11.4	2.1	3.72*
	24	17.8	1.2	3.19	17.1	1.7	2.51	17.8	1.2	3.23	14.0	1.2	0.71
	48	17.3	1.7	3.36	19.8	5.4	6.34***	13.9	1.4	1.01	12.9	1.1	2.27
	72	16.9	1.4	3.24	13.6	2.4	1.63	12.8	1.4	2.79	12.7	1.4	2.93
168	11.6	1.2	3.00	11.7	0.8	2.92	12.3	0.7	2.33	13.1	1.6	1.53	
Vergleich zwischen Proben mit und ohne Zusatz	12			2.78			3.66*			2.57			0.62
	24			2.05			3.06			4.62***			0.69
	48			3.81*			4.98***			1.94			0.96
	72			5.50***			5.11***			1.06			1.43
	168			0.94			36.26			0.72			1.63

t = Vergleich (Student's-Test) des Ausgangswertes mit den Ergebnissen nach verschiedenen Lagerzeiten und zwischen Milchen mit und ohne Zusatz von Kaliumdichromat.

Abb. 1. Mittelwerte und Standardfehler der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei Raumtemperatur (Gruppen 1 und 2)



Legende zu den Abb. 1 - 5:

-  Ohne Kaliumdichromat
-  Mit Kaliumdichromat

Abb. 2. Mittelwerte und Standardfehler der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei 37°C (Gruppen 3 und 4)

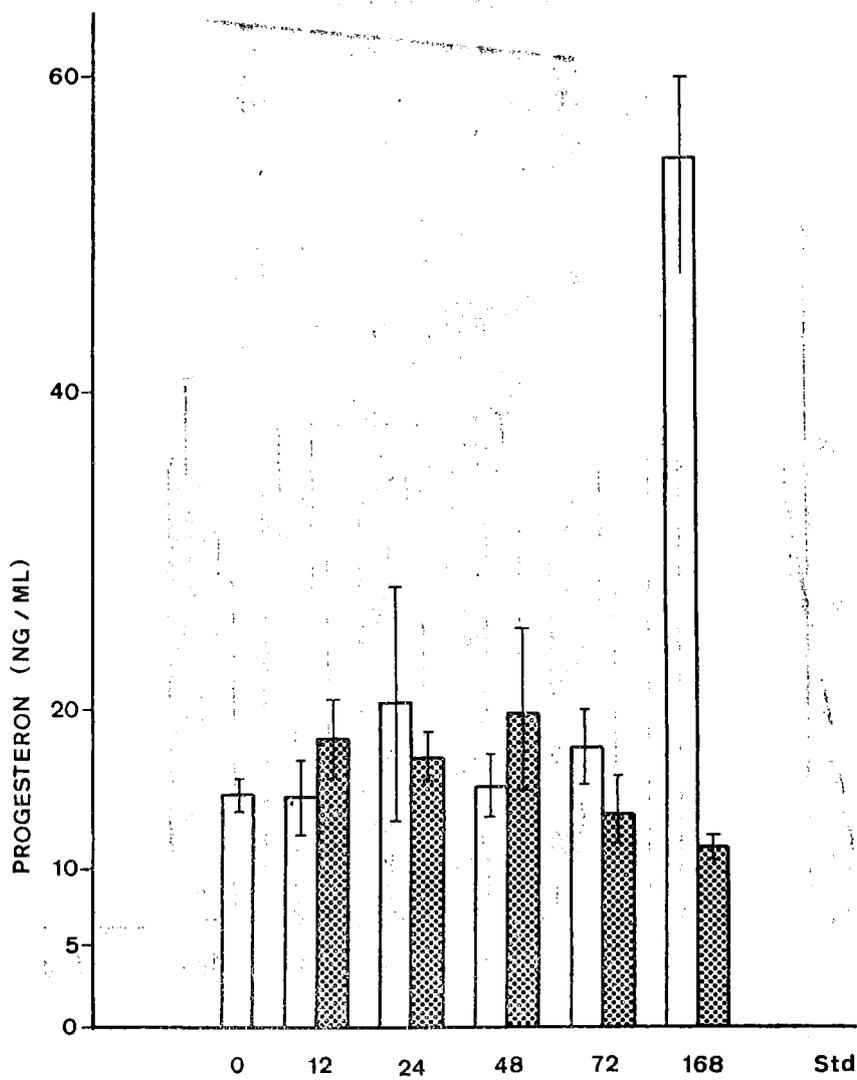


Abb. 3. Mittelwerte und Standardfehler der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei + 4°C (Gruppen 5 und 6)

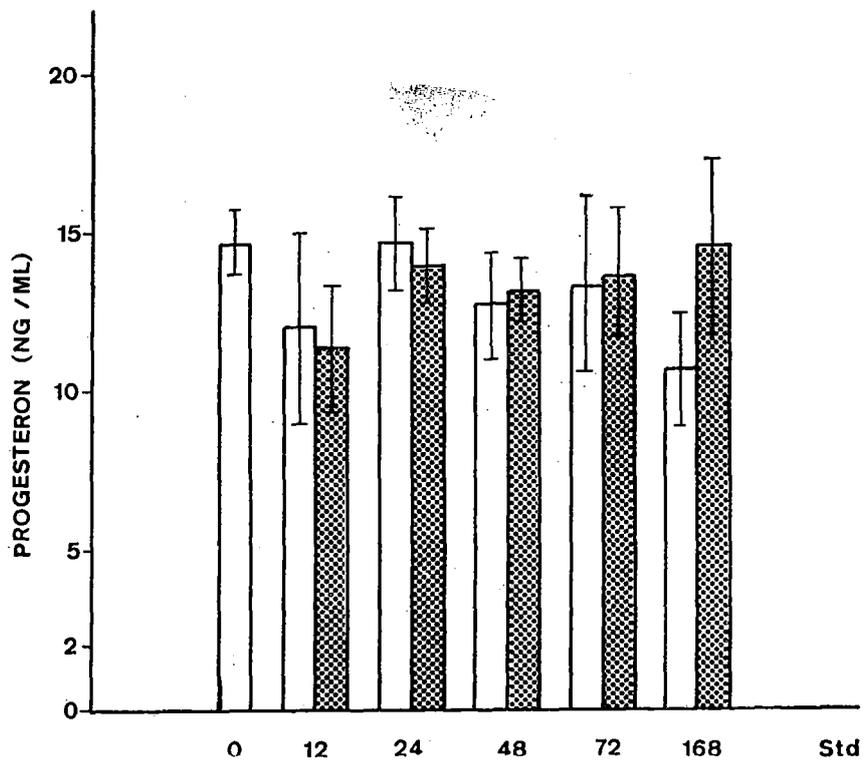


Abb. 4. Mittelwerte und Standardfehler der Progesteronkonzentrationen nach Lagerung bei -20°C
(Gruppen 7 und 8)

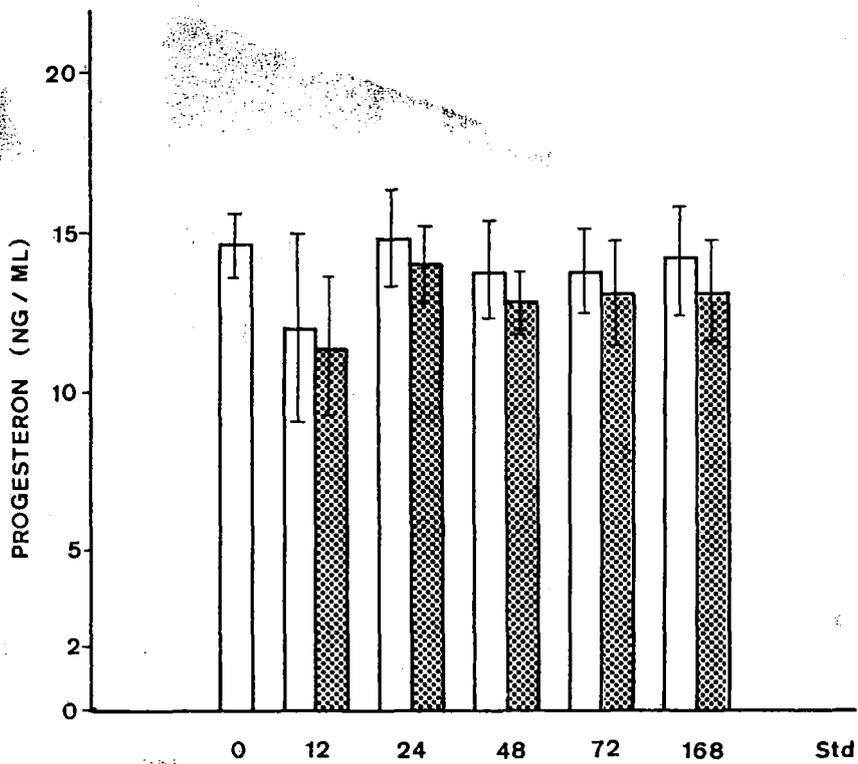
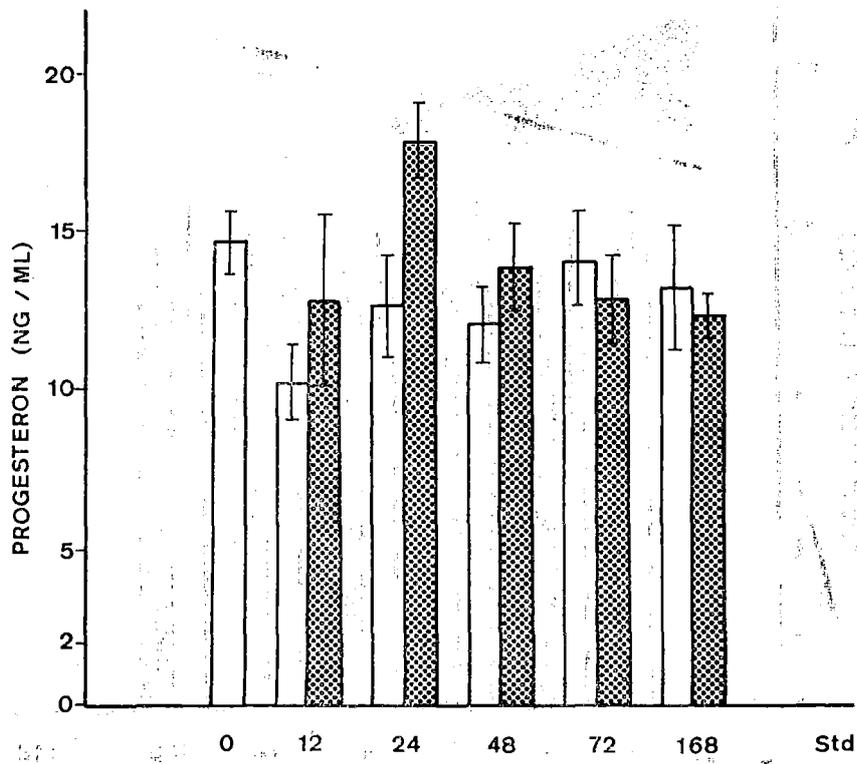


Abb. 5. Mittelwerte und Standardfehler der Progesteronkonzentrationen nach mehrmaligem Einfrieren auf -20°C und Auftauen (Gruppen 9 und 10)



Diskussion

Da der Progesteron Gehalt in der Milch zur Zeit nur in spezialisierten Labors bestimmt werden kann, sind die Milchproben zwischen Gewinnung und Verarbeitung unterschiedlichen Temperature und Transportzeiten ausgesetzt. Obwohl die Zugabe konservierender Agenzien makroskopische Veränderungen des Probenmaterials in der Regel verhindert, blieb bislang die Frage weitgehend offen, ob ein solches Agens neben der beabsichtigten Hemmwirkung auf Mikroorganismen möglicherweise per se das Messresultat beeinträchtigen könnte. Die vorliegende Arbeit sollte deshalb abklären, ob der einfach durchzuführende Zusatz von Kaliumdichromat in Tablettenform bei verschiedenen Lagertemperaturen zu Abweichungen der Messergebnisse vom anfänglich vorhandenen Progesteron Gehalt führt.

Die Bestimmung des Progesteron Gehaltes in der Nativmilch wenige Minuten nach Entnahme lieferte eine Konzentration von 14.7 (12.4 - 16.6) ng/ml, der vorbehaltlos bei einer Trächtigkeitdauer von 2 Monaten erwartet werden darf. Die nachfolgenden Vergleiche beziehen sich, sofern nichts anderes vermerkt wird, auf diesen Ausgangswert.

Die Lagerung der Milchen bei Raumtemperatur (Tab. 2, Abb. 1) kommt den Verhältnissen unter Praxisbedingungen am nächsten. In den unbehandelten Proben stellten wir eine abnehmende, aber nicht signifikante Tendenz mit fortschreitender Lagerdauer fest. Im Hinblick auf die laborintern gebräuchlichen Unterscheidungskriterien für die Befundinterpretation (siehe 2), könnte die beobachtete Abnahme allerdings in jenen Fällen bedeutsam werden, in denen der ursprüngliche Gehalt an der unteren Grenze eines Konzentrationsbereiches liegt, und zwar in der Weise, dass die gemessene Konzentration dem unteren Bereich zugeordnet und demzufolge fälschlicherweise als «fraglich» oder «nicht trächtig» beurteilt werden müsste. Zudem darf angenommen werden, dass die Abnahme des Progesteron Gehaltes umso stärker ausfallen dürfte, je massiver die Milch von progesteronabbauenden Mikroorganismen befallen ist.

Unsere Befunde decken sich mit jenen von Yasahura und Kleeberg-RUPPERT (21) insofern, als diese Autoren nach Lagerung bei 20°C ebenfalls einen deutlichen Progesteronabfall, jedoch erst nach 3 Tagen mitteilten. Dass sich dort die Abnahme nicht schon früher einstellte, könnte neben der Verschiedenheit im Bestimmungsverfahren - damit erklärt werden, dass die erwähnten Autoren ihre Milchproben bis zur Erfassung des Ausgangswertes während maximal 8 Stunden bei 4°C gelagert hatten, während unsere Milchen ab Entnahme bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden.

Im Gegensatz zu den Nativproben lagen in Milchen mit Zusatz von Kaliumdichromat nach Lagerung bei Raumtemperatur die Progesteronkonzentrationen geringgradig, aber wiederum nicht signifikant über dem Ausgangswert, der erst nach 6 Tagen unterschritten wurde. Die Gegenüberstellung der Befunde aus nativen und behandelten Milchen weist darauf hin, dass ein Zusatz von Kaliumdichromat beim routinemässigen Versand von Milchproben durchaus angezeigt ist. Damit dürfte ein Abbau des Progesteronmoleküls durch Mikroorganismen mindestens während der normalerweise zu erwartenden Transportzeiten verhindert werden.

Bei einer Aufbewahrungstemperatur von 37°C (Tab. 3, Abb. 2) lagen die Progesteronkonzentrationen bei behandelten Proben in den ersten 48 Stunden zum Teil signifikant über dem Ausgangswert, der aber nach 72 und 168 Stunden unterschritten wurde. Nach längerer Aufbewahrungsdauer - bei Raumtemperatur wie insbesondere bei 37°C - scheint Progesteron trotz Kaliumdichromat abgebaut zu werden. Unter extrem hohen Temperaturen und bei langen Transportzeiten könnte dies möglicherweise dadurch verhindert werden, dass die Kaliumdichromatkonzentration erhöht wird, indem 1 Tablette in einem kleineren Milchvolumen aufgelöst bzw. in einem kleineren Entnahmeröhrchen an den Tierbesitzer abgegeben wird.

Nativmilchen zeigten durchwegs erhöhte Durchschnittskonzentrationen; nach 168 Stunden unterschieden sich alle 10 Einzelwerte hochsignifikant vom Ausgangsgehalt. Dieses Phänomen könnte einerseits mit einer temperaturabhängigen Änderung in der physikalischen Erscheinungsform der Fetttröpfchen begründet werden: Als Folge ihrer Grössenzunahme wird das Aufräumen beschleunigt und damit die angewandte Durchmischung des Röhrcheninhaltes wirkungslos, so dass beim Wegpipettieren der Arbeitsdosis vorwiegend Fettanteile mit grösseren Mengen des fettlöslichen Progesteronmoleküls entnommen werden. Da sich dieselben Vorgänge auch in Kaliumdichromat - Milchen abspielen würden, dort jedoch entsprechende Folgen nicht beobachtet wurden, muss diese Erklärung fallen gelassen werden. Andererseits kann bei Nativmilchen, die bei 37°C geradezu bebrütet werden, ein massives Keimwachstum angenommen werden. Dabei entstehen zweifelsohne auch proteolytische Substanzen, die den 1. wie den 2. Antikörper zerstören, oder es bilden sich Substanzen, welche die Reaktion zwischen (markiertem und unmarkiertem) Progesteron und seinem Antikörper verhindern. Unter beiden Bedingungen käme es zu einer unspezifisch erniedrigten Bindung des Tracers an den Antikörper, der dessen ungeachtet oder auch unvollständig präzipitiert wird und nachfolgend mit seiner tiefen Radioaktivität eine hohe Progesteronkonzentration vortäuscht.

Nach Aufbewahrung bei + 4°C (Tab. 4, Abb. 3) wurden sowohl bei Nativ- wie auch bei Kaliumdichromat-Milchen gegenüber dem Ausgangswert leicht erniedrigte Konzentrationen gemessen, die über 6 Tage hinweg auf der gleichen Höhe blieben. Demnach scheint eine niedrige Temperatur für die Unterdrückung des Progesteronabbaus, zumindest in Milchen ohne massiven Keimgehalt auszureichen. Dies dürfte vor allem für jene Bestimmungsverfahren bedeutungsvoll sein, bei denen die Milchen frei von unspezifischen Farbstoffen oder Enzymhemmern sein müssen, weil die Endbestimmung nach einer enzymatischen Farbreaktion erfolgt.

Bei - 20°C eingefrorenen Milchen (Tab. 5, Abb. 4) waren wiederum in beiden Gruppen die Progesteronkonzentrationen gegenüber dem Ausgangswert erniedrigt. Die Differenz war noch kleiner als bei der Lagerung knapp über dem Nullpunkt, was darauf hinweist, dass das Einfrieren den Progesteronabbau nachhaltig unterdrückt und somit eine ideale Konservierungsart für Langzeitlagerung darstellt.

Ueberraschend war die Beobachtung, dass sich in den Gruppen 9 und 10 (Tab. 6, Abb. 5) die Progesteronkonzentrationen trotz mehrmaligen Einfrierens und Auftauens nur unwesentlich vom Ausgangswert unterschieden. Die Messwerte lagen zwar geringfügig tiefer, liessen aber weder eine zeitabhängige Tendenz noch einen quantitativen Unterschied zu den bloss 1 Mal eingefrorenen und aufgetauten Milchen in den Gruppen 7 und 8 erkennen. Die erwartete Ausfällung von Proteinen als Folge wiederholter Konzentrationsänderungen im Mikrobereich trat nicht oder nicht in einem sich manifestierenden Ausmass auf. Ob sich diese Beobachtung auch nach mehr als 6-maligem Einfrieren und Auftauen machen lässt, bleibt offen.

Zusammenfassend können aus den erwähnten Daten (siehe auch Tab. 7) die vorgegebenen Fragen wie folgt beantwortet und die entsprechenden Schlussfolgerungen für die praktische Anwendung der Progesteronbestimmung in der Milch gezogen werden:

1. Der Zusatz von Kaliumdichromat verändert per se den Progesteron-gehalt nicht.
2. Während der untersuchten Lagerdauer von 6 Tagen liessen sich zeitabhängige Veränderungen nur bei Milchen ohne Kaliumdichromat beobachten: Bei Raumtemperatur aufbewahrte Proben zeigten schon sinnig fortsetzte. Bei 37°C aufbewahrten Milchen erreichte die Progesteronkonzentration, der sich mit zunehmender Lagerdauer gleichsinnig fortsetzte. Bei 37°C aufbewahrten Milchen erreichte die Progesteronkonzentration nach 168 Stunden sprunghaft das Vierfache

des Ausgangswertes, was auf die Bildung proteolytischer Substanzen mit denaturierender Wirkung auf die Antikörper im Inkubat zurückgeführt wurde.

Lagertemperaturen von + 4 und - 20°C liessen keine zeitbedingten Abweichungen vom Ausgangswert erkennen.

3. Veränderungen der Messresultate in Abhängigkeit von der Temperatur fanden sich insbesondere nach Aufbewahrung bei Raumtemperatur, die den praktischen Gegebenheiten am nächsten kommt, sowie bei 37°C. Die bei Raumtemperatur mit fortschreitender Lagerdauer abnehmenden Progesteronkonzentrationen könnten zu Fehlinterpretationen in der Diagnostik führen, so dass ein Zusatz von Kaliumdichromat empfehlenswert ist.

Bei + 4 und bei - 20°C gelagerten Proben waren die Progesteronkonzentrationen in Proben mit und ohne Kaliumdichromat leicht, aber nicht signifikant erniedrigt gegenüber dem Ausgangswert, so dass 4°C für Proben, die kein konservierendes Agens enthalten dürfen, und - 20°C für Langzeitlagerung geeignete Aufbewahrungstemperaturen darstellen. 6-maliges Einfrieren und Auftauen blieb ohne messbaren Einfluss auf die Progesteronkonzentration.

Literaturverzeichnis

1. Bamberg, E., Choi, H. S. und Möstl, E. (1981). Anwendungsmöglichkeiten der Progesteronbestimmung in der Milch von Kühen. Wien Tierärztl. Mschr, 68, 185 - 187.
2. Booth, J. M., Davies, J. and Holdsworth, R. J. (1979). Use of the milk progesterone test for pregnancy determination. Br. vet. J., 135, 478 - 488.
3. Braun, U. (1978). Der Progesterongehalt im Blutplasma und in der Milch während der Frühgravidität bei Kühen. Schweiz. Arch. Tierheilk, 120, 253 - 261.
4. Dixon, W. J. (1983). Biomedical Computer Programs. University of California Press, Los Angeles.
5. Döbeli, M. (1980). Comparative studies in radioimmunoassay of progesterone in plasma and milk of cows using double antibody technique and dextran-coated charcoal separation. 2nd International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Lucerne, Switzerland.

7. Elsaesser, F., Ellendorff, F. und Smidt, D. (1979). Die Milchprogesteron - Bestimmung als Mittel zur Objektivierung des Fruchtbarkeitsstatus von Milchkuhherden in der Post-partum-Phase. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 86, 45 - 84.
8. Foulkes, J. A., Cookson, A. D. and Sauer, M. J. (1982). AI in cattle based on daily microtitre plate enzymeimmunoassay of progesterone in whole milk. Br. vet. J. 138, 515 - 521.
9. 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. J. Agric. Sci., Camb., 81, 151 - 157.
10. Hoffmann, B. und Hamburger, R. (1973). Progesteron in der Milch: Radioimmunologische Bestimmung, Beziehungen zur Gelbkörperfunktion und MilCHFettkonzentration. Zuchthyg., 8, 154 - 162.
11. Hoffman, B., Hamburger, R. und Hollwich, W. (1977). Bestimmung von Progesteron direkt in MilCHFett als verbessertes Verfahren zur Fertilitätskontrolle bei der Kuh. Zuchthyg. 12, 1 - 7.
12. Günzler, O., Korndörfer, L., Lohoff, H., Hamburger, R. und Hoffmann, B. (1975). Praktische Erfahrungen mit der Progesteronbestimmung in der Milch zur Erfassung des Fertilitätsstandes bei der Kuh. Tierärztl. Umschau, 30, 111 - 118.
13. Losert, J. und Holtz, W. (1984). Anwendung des Enzymimmunoassays (EIA) zur Feststellung des Milchprogesterongehalts bei Stuten. Zuchthyg., 19, 1 - 6.
14. Pennington, J. A., Spahr, S. L. and Lodge, J. R. (1976). Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk. J. Dairy Sci., 59, 1528 - 1531.
15. Sauer, M. J., Foulkes, J. A., and O'Neill, P. M. (1982). Use of microtitre platte EIA for direct determination of progesterone in whole milk: Application of heterologous systems for improved sensitivy. Br. vet. J., 138, 522 - 531.
16. Stevens, K., Long, S. E. and Perry, G. C. (1981). A method to reduce non - specific binding in whole milk progesterone radioimmunoassays. Br. vet, J., 137, 17 - 20.
17. Stolla, R. und Bader, H. (1984). Milchprogesteronkonzentration bei Stuten im post - partalen Zeitraum und in der frühen Trächtigkeit. Zuchthyg. 19, 7 - 13.

18. Stupnicki, R. and Kula, E. (1980). Direct radioimmunoassay of progesterone in milk using a radioiodinated progesterone derivative. *Anim. Reprod. Sci.*, 3, 113 - 118.
19. Taubert, H., Barth, T., Hempel, G. und Graeser, K. (1984). Die Progesteron - bestimmung für die Reproduktionskontrolle bei Kühen mittels eines Tritium - Radioimmunoassays. I. Mitteilung: Zur Methodik un zur Wahl des Prüfmaterials. *Arch. exper. Vet. med., Leipzig*, 38, 37 - 48.
20. Thun, R., Eggenberger, E., Zerobin, K., Summermatter, P., Flükiger, A. und Gaillard, C. (1980). Praktische Erfahrung mit dem Milch- Progesteron Test (MPT) zur Brunst - und Nonreturn - Diagnose beim Rind. *Zuchthyg.* 15, 7 - 14.
21. Yasuhara, T. und Kleeberg - Ruppert, S. (1984). Erfahrungen mit dem Enzymimmunoassay zur Progesteronbestimmung, insbesondere in Gesamtmilch ohne Extraktion. *Tierärztl. Umschau*, 39, 687 - 692.