



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
Main Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2010

**Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva®) beim präpubertären
Stierkalb**

Gerig, T

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich
ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-42301>
Dissertation

Originally published at:

Gerig, T. Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva®) beim präpubertären Stierkalb. 2010, University of Zurich, Vetsuisse Faculty.

Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor a.i.: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun

**Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva[®])
beim präpubertären Stierkalb**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Tobias Gerig

Tierarzt

von Oberhelfenschwil/SG

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. F. Janett, Referent

PD Dr. N. Borel, Korreferentin

Zürich 2010

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Summary | 3 |
| 3 | Einleitung | 5 |
| 3.1 | Kastration beim männlichen Rind | 5 |
| 3.2 | Kastrationsmethoden | 6 |
| 3.2.1 | Blutige Kastration | 6 |
| 3.2.2 | Unblutige Kastration | 6 |
| 3.3 | Geschlechtsentwicklung beim Stierkalb | 11 |
| 3.4 | Fragestellung | 13 |
| 4 | Tiere, Material und Methoden | 14 |
| 4.1 | Tiere, Fütterung und Haltung | 14 |
| 4.2 | Krankheiten und Behandlungen | 14 |
| 4.3 | Versuchsanordnung | 15 |
| 4.4 | Bestimmung der Antikörper gegen GnRH | 16 |
| 4.5 | Bestimmung der LH-Konzentration | 16 |
| 4.6 | Bestimmung der Testosteronkonzentration | 16 |
| 4.7 | Bestimmung von Hodengewicht und Samenqualität | 17 |
| 4.8 | Statistik | 18 |
| 5 | Ergebnisse | 19 |
| 5.1 | Verträglichkeit der Impfung | 19 |
| 5.2 | Einfluss der Impfung auf die untersuchten Parameter | 20 |
| 5.2.1 | Anti-GnRH Titer | 20 |
| 5.2.2 | LH-Konzentration | 22 |
| 5.2.3 | Testosteronkonzentration | 24 |
| 5.2.4 | Skrotalumfang und Hodengewicht | 26 |
| 5.2.5 | Verhalten und Libido | 28 |
| 5.2.6 | Samenqualität | 28 |
| 5.2.7 | Körpergewicht | 30 |
| 6 | Diskussion | 32 |
| 7 | Literatur | 35 |
| 8 | Dank | 43 |

1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen einer präpubertären Immunisierung gegen GnRH mit Bopriva[®] (Pfizer Animal Health, Australien) bei Stierkälbern zu prüfen. Für die Untersuchungen wurden 6 Kälber im Alter von 3 und 6 Wochen mit je 1 ml Bopriva[®] geimpft, 6 Tiere dienten als Kontrolle. Während 30 Wochen nach der Erstimmunisierung wurden die Konzentrationen der GnRH-Antikörper, von Testosteron sowie LH und während 59 Wochen das Körpergewicht und der Skrotalumfang bestimmt. Bei der Schlachtung, 65 Wochen nach Erstimmunisierung, erfolgte die Beurteilung des Nebenhodenspermas. Die Ergebnisse zeigen, dass die Antikörpertiter nach der Boosterimpfung stark anstiegen und 2 Wochen später Maximalwerte erreichten. Die Hemmung des präpubertären LH-Anstiegs war bei Kälbern mit Bopriva[®] in den Lebenswochen 15-17 deutlich vorhanden und tiefere Werte als bei den Kontrolltieren konnten während 20 Wochen gemessen werden. Bei den geimpften Kälbern fiel der Testosteronspiegel bereits eine Woche nach der 2. Impfung unter 0.5 ng/ml Serum und blieb während mindestens 22 Wochen auf diesem tiefen Niveau. Kälber mit Bopriva[®] hatten ein verzögertes Hodenwachstum, der Skrotalumfang war stets geringer und der Eintritt der Pubertät erfolgte mindestens 6 Wochen später als bei der Kontrollgruppe. Das Körpergewicht unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Am Ende des Versuchs konnten alle Stiere anhand der Qualität des Nebenhodenspermas als fruchtbar beurteilt werden.

2 Summary

Effect of vaccination against GnRH (Bopriva[®]) in the prepubertal bull calf

The aim of this study was to evaluate the effect of immunization against GnRH with Bopriva[®] (Pfizer Animal Health, Australia) in prepubertal bull calves. For the study, 6 calves were vaccinated at the age of 3 and 6 weeks with 1 ml Bopriva[®], 6 animals served as controls. During 30 weeks after the first immunization, concentrations of GnRH antibodies, testosterone and LH were determined. Body weight and scrotal circumference were measured for 59 weeks. At slaughter, 65 weeks after first immunization, quality of epididymal sperm was evaluated. The results show that antibody titers increased significantly after the booster vaccination and reached peak values 2 weeks later. Inhibition of the prepubertal rise in LH in calves vaccinated with Bopriva[®] was clearly present from 15 until 17 weeks of age and lower values than in the control animals were measured during 20 weeks. In vaccinated calves testosterone concentrations decreased after the booster vaccination to values below 0.5 ng/ml serum and remained at least 22 weeks at this low level. Animals vaccinated with Bopriva[®] showed a delay in testes growth, scrotal circumference was always lower and puberty occurred at least 6 weeks later than in the control group. Body weight did not differ significantly between the two groups. At the end of the experiment all bulls were judged to be fertile based on the quality of epididymal sperm.

3 Einleitung

3.1 Kastration beim männlichen Rind

Unter Kastration versteht man die operative Entfernung oder Ausschaltung der Funktion der Keimdrüsen. In der Veterinärmedizin wird dieser Eingriff hauptsächlich vorgenommen, um die Fortpflanzung und damit verbundenes Verhalten zu unterdrücken. Zudem kann beim Rind durch die Kastration die Fleischqualität verbessert werden (Seideman et al., 1989). Stierkälber werden heute in Mastbetrieben kaum mehr kastriert, in Mutterkuhherden hingegen wird dieser Eingriff häufig durchgeführt. Gemäss einer repräsentativen Umfrage (Boesch et al., 2006) bei 1'185 Mutterkuhhaltern in der Schweiz lassen 70% der befragten Landwirte ihre Stierkälber kastrieren. Die Gründe dafür lauten (in abnehmender Häufigkeit): „Mehr Ruhe in der Herde“, „Vermeidung unerwünschter Trächtigkeiten“, „bessere Fleischqualität“, „Vermeidung von Gefahr für Menschen“, „Vermeidung von Gefahr für Tiere“, „Vorschriften im Zusammenhang mit der Alpung“, „Besserer Zuwachs oder Ausmastgrad“, „Label-Vorschriften“ und „Vermeidung von Konflikten mit dem Zuchtstier“ (Boesch et al., 2006).

Seit der Revision der Schweizerischen Tierschutzverordnung im Jahre 2001 ist die Kastration von Wiederkäuern grundsätzlich nur unter Schmerzausschaltung erlaubt. Neben Tierärzten dürfen auch Tierhalterinnen und Tierhalter, die einen entsprechenden Sachkundenachweis erbringen (Art. 32 Tierschutzverordnung), männliche Jungtiere im Alter von bis zu 2 Wochen kastrieren. Die benötigten Medikamente zur Schmerzausschaltung können dabei legal vom Bestandestierarzt bezogen werden, vorausgesetzt, dass eine Tierarzneimittelvereinbarung (TAMV) vorliegt. Im Gegensatz zum Schwein und Pferd findet die Kastration beim männlichen Wiederkäuer in der Regel nicht unter Allgemeinanästhesie statt. Für die Durchführung des Eingriffes in der Praxis hat sich eine Lokalanästhesie in Kombination mit einer Sedation (Steiner und Stoffel, 2008) bewährt. Das Lokalanästhetikum wird im Bereich des Skrotumhalses in beide Samenstränge und subkutan darüber verteilt (Thür et al., 2007). Bei erwachsenen Stieren hat sich die Kombination von Sedation und tiefer Epiduralanästhesie bewährt (Caulkett et al., 1993). Zur Hemmung der Schmerzreaktion nach dem Eingriff wird zusätzlich die Applikation eines nicht-steroidalen Antiphlogistikums empfohlen (Stafford et al., 2002).

3.2 Kastrationsmethoden

3.2.1 Blutige Kastration

Chirurgische Kastration

Bei der blutigen oder chirurgischen Kastration wird das Skrotum eröffnet, der Skrotalinhalt mit (bedeckte Kastration) oder ohne (unbedeckte Kastration) Tunica vaginalis vorgelagert, der Samenstrang gequetscht oder ligiert und anschliessend der Hoden abgesetzt. Es kann auch eine unbedeckte Kastration mit bedecktem Samenstrang erfolgen. Dabei werden nach Eröffnung des Processus vaginalis die Hoden vorgelagert, die Tunica vaginalis im Bereich des Samenstranges vom Skrotum freipräpariert und mit dem Samenstrang gequetscht oder ligiert. Wird mit bedecktem Samenstrang kastriert, ist das Risiko für den Vorfall von Bauchhöhlenorganen und aufsteigende Infektionen deutlich geringer als bei der unbedeckten Kastration. Das Skrotum kann vernäht (geschlossene Kastration) oder aber offen belassen werden (offene Kastration). Die blutige Kastration ist eine zuverlässige und aufwändige Methode und wird in der Schweiz grundsätzlich vom Tierarzt durchgeführt.

Pinhole-Kastration

Eine neuere (Ponvijay, 2007; Fazili et al., 2009) und minimal invasive Methode stellt die sogenannte „Pinhole“-Kastration dar, bei welcher nach Lokalanästhesie die Samenstränge ohne Eröffnung des Skrotums ligiert werden. Dabei wird der Samenstrang lateral im Skrotum fixiert, medial davon eine Kanüle (16 oder 18G) von kaudal nach kranial durch das Skrotum gestochen, ein resorbierbarer Faden durch die Hohnadel geführt und dann die Kanüle zurückgezogen. Anschliessend wird der Samenstrang nach medial verlagert, die Kanüle durch die bestehenden Stichöffnungen am Skrotum geschoben, das kraniale Fadenende durch die Kanüle geführt und diese entfernt. Schliesslich werden die Fadenenden verknotet und kurz abgeschnitten. Die Ligatur der Samenstränge führt zur ischämischen Degeneration und Atrophie der Hoden.

3.2.2 Unblutige Kastration

Eine unblutige Kastration kann mittels Gummiring, Burdizzo-Zange, chemisch, hormonell oder immunologisch vorgenommen werden.

Gummiring-Kastration

Bei der Gummiring-Kastration wird ein Gummiring mittels einer speziellen Spannzange (Elastrator) oberhalb der Hoden um den Skrotumhals gestülpt. Damit wird zuerst die Blutversorgung und später auch die Nervenversorgung des Gewebes unterbunden. Nach einigen Wochen fällt das Skrotum samt Inhalt ab. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass diese Methode mit ausgeprägten Entzündungsreaktionen und Langzeitschmerzen verbunden ist (Molony et al., 1995; Thüer et al., 2007). Die Kastration mittels Gummiring ist eine einfache und billige Methode, die in der Regel vom Tierhalter vorgenommen wird. Beim Muchsen werden die Hoden mit Hilfe eines Gummirings, der unmittelbar distal der Hoden über das Skrotum gestülpt wird, an die Bauchwand gedrängt und in dieser Position fixiert. Die erhöhte Hodentemperatur führt zur Degeneration des Keimepithels und zu Sterilität. Die endokrine Hodenfunktion tritt beim Muchs verspätet ein, doch sind Wachstum und Verhalten ähnlich wie bei intakten Stieren.

Burdizzo-Kastration

Mit der Burdizzo-Zange wird jeder Samenstrang samt der darüber liegenden Haut an zwei Stellen während je einer Minute gequetscht (Zulauf et al., 2003), was zur Hodenatrophie führt. Dabei gilt es zu beachten, dass zwischen den beidseitigen Quetschstellen die Haut unversehrt bleibt, damit die Durchblutung des Skrotums gewährleistet ist. Die Kastration mittels Burdizzo-Zange ist einfach durchzuführen und wird vom Tierarzt oder dem ausgebildeten Tierhalter angewendet. Als Nachteil dieser Methode ist die ungenügende Zuverlässigkeit zu erwähnen (Kent et al., 1996; Stafford et al., 2002), dies insbesondere bei Kälbern in der ersten Lebenswoche. Es kann vorkommen, dass die Kälber nach Anwendung der Burdizzo-Zange zwar steril sind, jedoch noch endokrin und spermatogenetisch aktives Hodengewebe aufweisen (Steiner und Stoffel, 2008; Stoffel et al., 2009).

Chemische und hormonelle Kastration

Unter chemischer Kastration versteht man die Injektion einer sklerosierenden Substanz in das Hodengewebe mit anschließender Nekrose. Diese Methode ist sehr schmerzhaft (Fordyce et al., 1989) und sollte aus tierschützerischen Gründen nicht angewendet werden.

Die Verabreichung von Hormonen oder Antihormonen zur Unterdrückung der Fortpflanzung kommt beim Nutztier aufgrund der Rückstandsproblematik und dem Fehlen entsprechender Präparate nicht in Frage.

Immunologische Kastration

Immunologische Verfahren (Immunokastration) werden als tierfreundliche Alternative zur konventionellen Kastration bei verschiedenen Tierarten beschrieben. Eine Immunisierung kann gegen Geschlechtshormone, LH-Rezeptoren, Spermiantigene oder beim weiblichen Tier gegen Zona pellucida Proteine erfolgen (Fayrer-Hosken, 2008). GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) nimmt bei der Regulation der Geschlechtsfunktion beim männlichen wie auch beim weiblichen Tier eine zentrale Stellung ein. Es ist ein Neuropeptid und wird im Hypothalamus (Nucleus arcuatus) synthetisiert, via Axone zur Eminentia mediana im Hypophysenstiel des Hypothalamus transportiert, pulsatil an das hypophysäre Pfortadersystem abgegeben und bewirkt im Hypophysen-Vorderlappen die Freisetzung der Gonadotropine LH und FSH. GnRH ist bei allen Säugetieren identisch aufgebaut und besteht aus 10 Aminosäuren. Um eine Immunreaktion gegen körpereigenes GnRH hervorzurufen, muss bei der Produktion des Impfstoffes ein GnRH-Analogon mit einem immunogenen Protein gekoppelt (GnRH-Protein-Konjugat) und ein potentes Adjuvans dazugegeben werden. Nach Immunisierung gegen GnRH werden Antikörper gebildet, die das körpereigene GnRH neutralisieren. Dadurch kommt es zu einer verminderten Ausschüttung von LH und FSH aus dem Hypophysen-Vorderlappen und folglich zur Hemmung der Testosteronproduktion in den Leydig'schen Zwischenzellen und zur Unterdrückung der Spermatogenese (Abb. 1). Hodenatrophie, verminderte Fertilität und Libidoverlust sowie Veränderungen in Verhalten und Körperbau sind die Folgen (Jeffcoate et al., 1982; Jago et al., 1997; D'Occhio et al., 2001; Ferro et al., 2004).

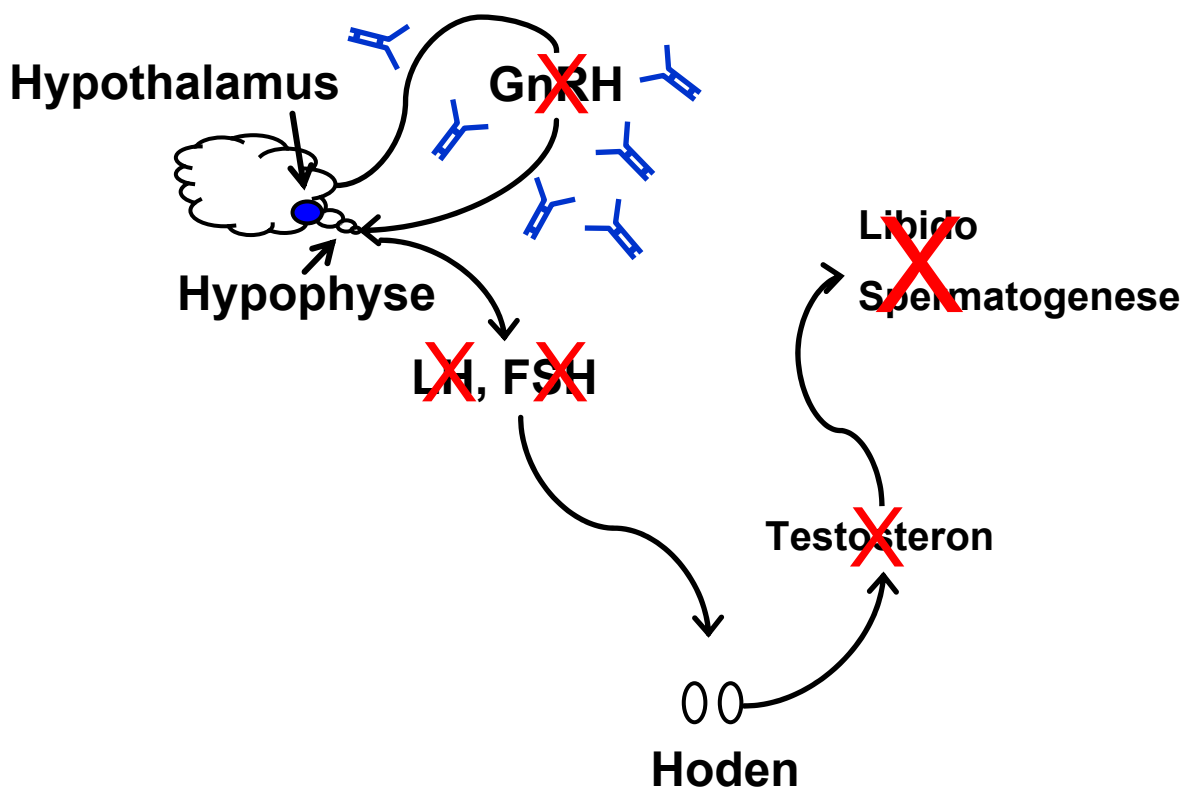
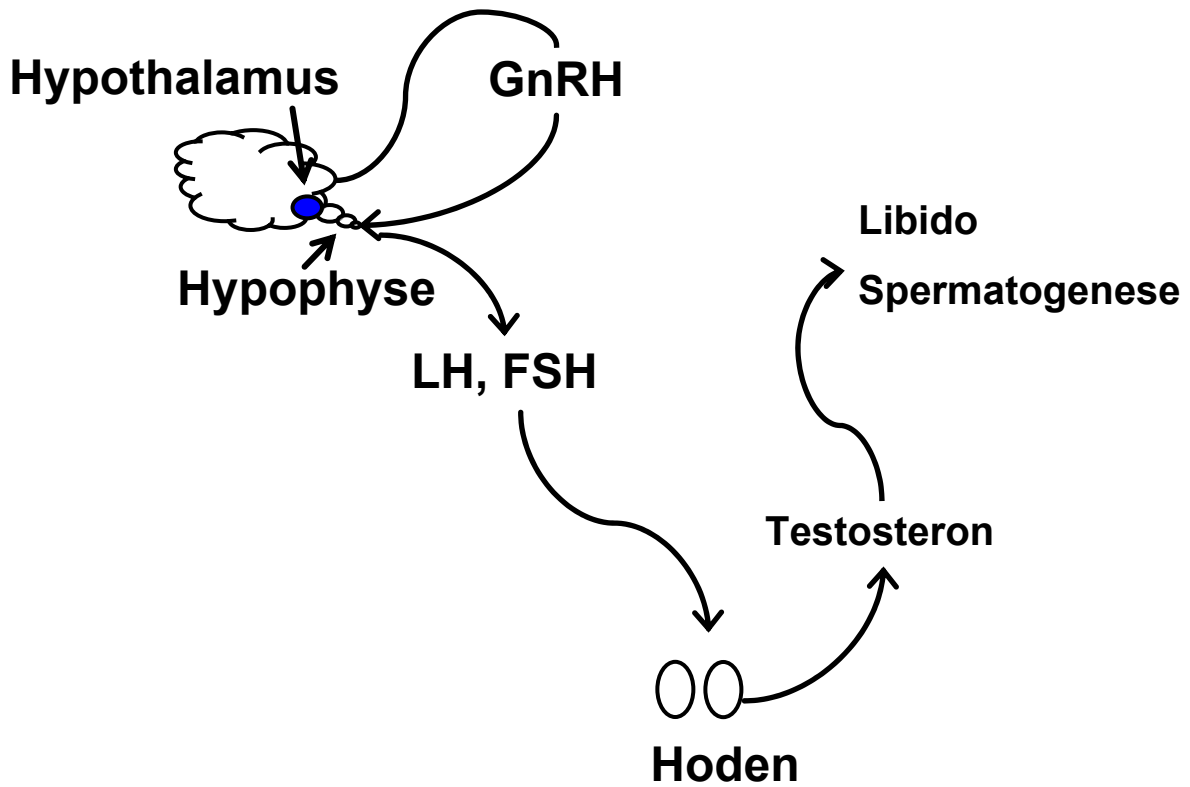


Abbildung 1: Schematische Darstellung der endokrinen Regulation der Sexualfunktion beim männlichen Tier (oben) und deren Beeinflussung durch Immunisierung gegen GnRH (unten).

Vor 30 Jahren wurde der erste Impfstoff gegen GnRH (Vaxstrate[®], Peptide Technology, N.S.W., Australien) zur Hemmung der Fortpflanzungsfunktion beim weiblichen Rind in Australien auf den Markt gebracht (Hoskinson et al., 1990). Dieser Impfstoff wurde aus dem Handel gezogen, diente aber als wichtige Grundlage zur Herstellung der schweine- und pferdespezifischen Impfstoffe Improvac[®] (seit 2007 in der Schweiz für das Schwein zugelassen) und Equity[®] (Pfizer Animal Health, Australien). In Neuseeland ist seit November 2007 der speziell für das Rind entwickelte Impfstoff Bopriva[®] (Pfizer Animal Health, Australien) zur Hemmung der Testosteronsekretion bei Stieren registriert. Gemäss Herstellerangaben sollen durch die Impfung mit Bopriva[®] das Sexual- und Aggressionsverhalten von Masttieren unterdrückt und damit die Haltung und das Management vereinfacht werden. In den USA ist GonaCon[®] (U.S. Department of Agriculture, Pocatello, USA) zur Hemmung der Fortpflanzung beim Weisswedelhirsch im Handel und für einen weiteren Impfstoff (Repro-Bloc[®], Amplicon, Washington, USA) läuft die Zulassung für Tiere, die nicht zur Lebensmittelgewinnung dienen.

Die Wirksamkeit der Impfung gegen GnRH konnte in zahlreichen Versuchen beim Rind (Jeffcoate et al., 1982; Hoskinson et al., 1990; Jago et al., 1997; Finnerty et al., 1998; Cook et al., 2000; D'Occhio et al., 2001; Aissat et al., 2002; Neeson und Colson, 2004; Stevens et al., 2005; Geary et al., 2006; Theubet et al., 2010), Schaf (Jeffcoate et al., 1982; Brown et al., 1994; Brown et al., 1995; Janett et al., 2003; Ferro et al., 2004; Ülker et al., 2005; Janett et al., 2009a), Schwein (Bonneau et al., 1994; Dunshea et al., 2001; Jaros et al., 2005; Claus et al., 2007; Clarke et al., 2008; Zamaratskaia et al., 2008, Fuchs et al., 2009), Pferd (Schanbacher und Pratt, 1985; Dalin et al., 2002; Turkstra et al., 2005; Imboden et al., 2006; Elhay et al., 2007; Janett et al., 2009b) und bei Wildtieren (Miller et al., 2000; Curtis et al., 2002; Miller et al., 2004) nachgewiesen werden. Was die Reversibilität der Impfwirkung anbelangt, ist beim Rind keine sichere Aussage möglich, da die meisten Untersuchungen von begrenzter Dauer waren und deshalb eine anhaltende Unterdrückung der Fortpflanzungsfunktion nicht nachgewiesen werden konnte (D'Occhio et al., 2001). Beim Schaf hingegen ist bekannt, dass die Impfung gegen GnRH die Fortpflanzung langfristig beeinträchtigen kann (Brown et al., 1994; Brown et al., 1995; Clarke et al., 1998; Janett et al., 2003). So zeigten 20-25% der präpubertär im Alter von 3-4 und 13-14 Wochen gegen GnRH immunisierten männlichen Lämmer mit 2 Jahren eine verminderte Hodengrösse (Brown et al., 1994). In einer weiteren Studie (Janett et al., 2003) wies eines von 10

männlichen Lämmern ein Jahr nach der Impfung mit Improvac[®] kleine Hoden und anhaltend tiefe Testosteronkonzentrationen ($<0,1$ ng/ml) im Plasma auf. Nach prä- oder peripubertärer Impfung von weiblichen Lämmern waren im Alter von 2 Jahren mindestens 60% der Tiere immer noch anöstrisch und wiesen kleine Uteri und Ovarien auf (Brown et al., 1995). Als Ursache für die anhaltende Unterdrückung (3-4 Jahre) der Gonadenfunktion bei präpubertär geimpften Schafen wurde eine reduzierte GnRH-Sekretion ermittelt (Clarke et al., 1998). Bei Ebern, welche im Alter von 4 Monaten gegen GnRH geimpft worden waren, konnten 2 Monate später histologische Veränderungen im Bereich der Eminentia mediana am Hypophysenstiel des Hypothalamus gefunden werden (Molenaar et al., 1993). In einer neueren Arbeit beim Eber (Hilbe et al., 2006) konnten jedoch weder im Hypothalamus noch in der Hypophyse impfbedingte Veränderungen beobachtet werden.

3.3 Geschlechtsentwicklung beim Stierkalb

Das Hodenwachstum verläuft beim Stierkalb nicht kontinuierlich, sondern beschreibt eine sigmoide Kurve. Nach anfänglich langsamem Wachstum folgt ab ungefähr der 25. Lebenswoche eine Phase mit schnellerem Hodenwachstum. Diese dauert bis zum Eintritt in die Pubertät, welcher abhängig von Rasse und Gewicht ist und zwischen der 37. und 50. Lebenswoche stattfindet (Rawlings et al., 2008). Generell sind Milchrassen früher geschlechtsreif als Fleischrassen (Lunstra et al., 1978; Evans et al., 1995). Die klinische Definition des Erreichens der Geschlechtsreife setzt ein Ejakulat mit einer Gesamtspermienzahl von mindestens 50 Millionen und mehr als 10% motile Spermien voraus (Wolf et al., 1965). Diese Anforderungen werden in der Regel unabhängig von der Rasse bei einem Skrotalumfang von 28 cm erfüllt (Wolf et al., 1965; Lunstra et al., 1978).

Unmittelbar nach der Geburt bilden sich, während der Phase des langsamen Hodenwachstums, Präspmatogonien und einige Spermatogonien sowie adulte Leydig'sche Zwischenzellen und undifferenzierte Sertolizellen aus. Während des raschen Hodenwachstums kommt es zu einer markanten Zunahme von Durchmesser und Länge der Tubuli seminiferi, welche mit einer starken Vermehrung und Differenzierung der Keimzellen einhergeht. Reife Spermatozoen erscheinen ab einem Alter von 32-40 Wochen, die Population der Leydig'schen Zwischenzellen ist ab 30 Wochen und jene der Sertolizellen ab einem Alter von 30-40 Wochen etabliert (Wrobel, 2000).

Die Serumkonzentration von LH ist während der ersten 4-5 Lebenswochen tief, erreicht anschliessend im Alter von 12-16 Wochen Maximalwerte, fällt dann bis zur 25. Lebenswoche wieder auf Ausgangswerte ab und bleibt während der Pubertät auf tiefem Niveau (Rawlings et al., 1978; Lacroix und Pelletier, 1979; McCarthy et al., 1979; Amann und Walker, 1983; Rodriguez und Wise, 1989; Rawlings und Evans, 1995; Evans et al., 1996; Aravindakshan et al., 2000; Bagu et al., 2006; Rawlings et al., 2008). Der temporäre postnatale Anstieg der LH-Sekretion kommt durch eine erhöhte Pulsfrequenz der LH-Ausschüttung zustande (Evans et al., 1993) und wird durch eine Zunahme der GnRH-Sekretion hervorgerufen (Rodriguez und Wise, 1989). Als Ursache für die transiente Erhöhung der GnRH- und LH-Sekretion wird eine vorübergehend verminderte opioiderge Hemmung angenommen (MacDonald et al., 1990; Evans et al., 1993; Chandolia et al., 1997b). Es wird vermutet, dass der präpubertäre Gonadotropinanstieg einen bedeutenden Einfluss auf die Hodenentwicklung beim Stierkalb hat (Deaver et al., 1988; Evans et al., 1995; Chandolia et al., 1997a; Chandolia et al., 1997b; Rawlings et al., 2008). So ist bekannt, dass bei frühreifen Rassen der präpubertäre Gonadotropinanstieg stärker ausgeprägt ist als bei spätreifen Rassen (Evans et al., 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass beim Stierkalb durch die intermittierende Verabreichung von GnRH im Alter von 4 bis 8 Wochen der Eintritt in die Pubertät um einen Monat vorverschoben werden kann (Madgwick et al., 2008). Eine Hemmung der GnRH-Sekretion durch Verabreichung eines langwirkenden GnRH-Agonisten im Alter von 6 bis 18 Wochen führte zu einer deutlichen Verzögerung der Hodenentwicklung (Chandolia et al., 1997a). Im Gegensatz zum LH folgt der Verlauf der Serumkonzentration von FSH während der Geschlechtsentwicklung keinem klaren Muster und ist individuell unterschiedlich (Rawlings et al., 2008).

Die Serumkonzentration von Testosteron steigt von Geburt an vorerst langsam und dann individuell ab Lebenswoche 20 bis 35 rasch an (Secchiari et al., 1976; Lacroix et al., 1977; Sundby und Velle, 1980; Miyamoto et al., 1989; Rawlings und Evans, 1995; Evans et al., 1996). Gleichzeitig mit dem Testosteronanstieg kommt es ab Lebenswoche 20 bis 25 zum raschen Hodenwachstum und zum Einsetzen der Spermatogenese. Dies zu einem Zeitpunkt mit deutlich tieferen LH-Konzentrationen als während des präpubertären Gonadotropinanstiegs.

3.4 Fragestellung

Ergebnisse aus einem Pilotprojekt (Theubet et al., 2010) mit 12 Tieren haben gezeigt, dass bei pubertären Kälbern im Alter zwischen 6 und 8 Monaten eine 2-malige Impfung mit Bopriva[®] im Abstand von 4 Wochen Hodenwachstum und Testosteronsekretion während mindestens 10 Wochen zu hemmen vermag. Aufgrund der individuellen Wirkungsdauer und der reversiblen Hemmung der Hodenfunktion eignet sich die pubertäre Impfung als zuverlässige Alternative zur Kastration nur in bedingtem Masse. Gestützt auf die Vermutung, dass beim Stierkalb der präpubertäre Gonadotropinanstieg für die Hodenentwicklung eine wichtige Voraussetzung ist (Chandolia et al., 1997a; Chandolia et al., 1997b; Bagu et al., 2006; Madgwick et al., 2008; Rawlings et al., 2008), sollen in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer präpubertären Immunisierung gegen GnRH auf die Hodenfunktion näher abgeklärt werden. Dabei stehen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

- Inwieweit lässt sich durch eine zweimalige Immunisierung gegen GnRH im Alter von 3 und 6 Wochen der präpubertäre Gonadotropinanstieg hemmen?
- Inwieweit lässt sich durch eine präpubertäre Immunisierung gegen GnRH das Hodenwachstum und der Eintritt in die Pubertät beeinflussen?

4 Tiere, Material und Methoden

4.1 Tiere, Fütterung und Haltung

Für die Untersuchungen wurden 12 männliche Holstein Friesian Kälber in der ersten Lebenswoche aus 9 verschiedenen Betrieben zugekauft. Alle 12 Stierkälber waren innerhalb einer Woche geboren worden. Während der ersten 8 Lebensmonate (1. Phase) wurden die Tiere am Alten Strickhof der Universität Zürich in einem Laufstall auf Tiefstreu mit befestigtem Auslauf oder aber auf der Weide gehalten. Die Fütterung bestand in den ersten 14 Lebenswochen aus Pulvermilch (UFA 200 PreVitin[®], UFA AG, Herzogenbuchsee), welche den Kälbern über 4 Saugstellen an zwei ad-libitum-Fütterungsautomaten (Milkomat[®], Agro-Schlittler AG, Winznau-Olten) zur Verfügung gestellt wurde. Zusätzlich standen Heu, Stroh, Wasser und Salzlecksteine zur freien Verfügung. Ab der 12. Lebenswoche erhielten die Stierkälber zusätzlich Weidegang und Ganzpflanzen-Maiswürfel mit Apfeltrester (LANDI AG, Regensdorf).

Ab dem 8. Lebensmonat wurden die Tiere bis zur Schlachtung im 15. Lebensmonat (2. Phase) an der Landwirtschaftlichen Schule Strickhof in Lindau in einem Gruppenlaufstall mit befestigtem Auslauf und Tiefstreu-Liegebereich gehalten. In dieser Phase bestand die Fütterung aus einer mastüblichen Totalmischung (TMR) aus Mais- und Grassilage, Weizen, Maiskleber, Melasse, Fett und Calcium. Zudem wurde den Stierkälbern Mineralsalz in Form von Lecksteinen angeboten und Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

4.2 Krankheiten und Behandlungen

Im Zuge der schweizweiten Sanierung der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) wurden alle 12 Stierkälber negativ auf BVD-Virus getestet. Aufgetretene Jungtierkrankheiten wie Pneumonie, Diarrhoe, Omphalitis, Hernia umbilicalis, Trichophytie sowie Trichodektose (Haarlingsbefall) wurden fachgerecht therapiert und es traten keine Tierverluste auf. Im Alter von 10 Wochen wurden alle 12 Stierkälber mittels Gasbrennkolben bzw. Enthornungszange enthornt. Vor und während des Weidegangs erfolgte eine zweimalige Behandlung mit einem langwirkenden Insektizid (Butox[®], Veterinaria AG, Pfäffikon).

4.3 Versuchsanordnung

Der gesamte Versuch dauerte vom 12. März 2009 (Ankunft der Kälber am Alten Strickhof) bis zum 25. Juni 2010 (Schlachtung der Tiere). Die Stierkälber wurden am Tag der Ankunft zufällig in eine Versuchs- (Kälber A-F) und Kontrollgruppe (Kälber G-L) eingeteilt. In der 3. und 6. Lebenswoche (Versuchswochen 0 und 3) wurde den Stierkälbern der Versuchsgruppe je 1 ml Bopriva[®] (400 µg GnRH-Konjugat, Pfizer Animal Health, Australien) und den Kontrolltieren die gleiche Menge physiologische NaCl-Lösung an der rechten Halsseite s.c. verabreicht. Nach beiden Impfungen wurden die Nebenwirkungen täglich während einer Woche anhand von Allgemeinzustand, Körpertemperatur sowie Schwellung und Schmerz an der Injektionsstelle beurteilt. Anschliessend erfolgte eine wöchentliche Beurteilung bis zum vollständigen Abklingen der Impfreaktionen (Lebenswoche 10 bzw. Versuchswoche 7).

Zur Überprüfung der Wirkung von Bopriva[®] wurden die Stierkälber ab der ersten Impfung in einer 1. Phase während 8 Monaten wöchentlich und in einer 2. Phase während 7 Monaten alle 2 Wochen folgendermassen untersucht:

- Blutentnahme aus der Vena jugularis externa dextra (1. Phase) bzw. Vena coccygealis ventralis (2. Phase) mittels Vacutainer-System (Vacuette[®], Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) unter Verwendung von Serumröhrchen (9 ml Z Serum Clot Activator[®], Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich). Die Blutproben wurden zur Gerinnung 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, anschliessend zentrifugiert (4000 x g, 10 min), das Serum abpipettiert und bis zur Analyse bei -18°C gelagert.
- Messung des Skrotalumfanges mittels Messband (ReliaBull[®], Lane Manufacturing Inc., Denver, USA) ab der 8. Versuchswoche.
- Bestimmung des Körpergewichts mittels mechanischer (1. Phase) bzw. elektronischer Waage (2. Phase).

Ausserdem wurde in der 1. Phase (8 Monate) das Sexualverhalten anhand von Aufsprungversuchen in der Gruppe dokumentiert. Dazu wurden die Tiere in der Gruppe täglich während 30 Minuten beobachtet. Im Alter von 15 Monaten erfolgte die Schlachtung der Tiere am Schlachthof Zürich. Der Skrotalinhalt wurde unmittelbar nach der Tötung der Tiere entnommen und das Gewicht der Hoden sowie die Qualität des Nebenhodenspermas im

Andrologischen Labor der Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich, bestimmt.

4.4 Bestimmung der Antikörper gegen GnRH

Die Messung der Antikörpertiter gegen GnRH wurde mittels Enzymimmunoassay (DELFI^A, Perkin Elmer Pty Ltd, Glen Waverley, Australien) vorgenommen. Dazu wurden Streptavidin-beschichtete Mikroplatten 384 Well (Perkin Elmer Pty Ltd, Glen Waverley, Australien) mit 1 µg/ml biotinisierendem GnRH-Peptid in Puffer (50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20, 20µM EDTA, 0.2% Ovalbumin) während einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden die Platten gewaschen und mit verschiedenen Probenverdünnungen erneut während einer Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nicht gebundenes GnRH und freie Antikörper wurden durch Waschen entfernt und die Menge der gebundenen Antikörper nach 1-stündiger Inkubation mit Europium-markiertem Protein G (Perkin Elmer Pty Ltd, Glen Waverley, Australien) bestimmt. Der Überschuss von Europium-markiertem Protein G wurde gewaschen und DELFIA Enhancement Solution dazugegeben. Nach 10 Minuten erfolgte die Anregung mit Licht von 340 nm Wellenlänge, und die Emission bei 615 nm wurde gemessen. Aufeinanderfolgende Standardverdünnungen bis zu einem Titer von 1/409'600 dienten als Referenzproben. Serum von einem nicht geimpften Rind diente als negative Kontrolle.

4.5 Bestimmung der LH-Konzentration

Die Bestimmung von luteinisierendem Hormon (LH) erfolgte mittels Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) (LH-DETECT[®], ReproPharm, Nouzilly, Frankreich) mit einer Sensitivität von 0.01 ng LH pro ml Serum. Die Intra- und Interassay Variationskoeffizienten betragen 5.9% bzw. 8.4%.

4.6 Bestimmung der Testosteronkonzentration

Die Testosteronbestimmung erfolgte mittels Immunoassay (TESTO-EASIA KAP1707, BioSource Europe SA, Nivelles, Belgien) mit einer Sensitivität von 0.05 ng Testosteron pro ml Serum. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers betrug 100% für Testosteron, 0.61%

für 5- α -Dihydrotestosteron, 0.76% für Androstendion, 0.023% für Östrogene und 0.035% für Progesteron. Die Intra- und Interassay Variationskoeffizienten betragen 6.3% bzw. 8.3%.

4.7 Bestimmung von Hodengewicht und Samenqualität

Nach der Schlachtung der Stiere wurden die Nebenhoden von den Hoden freipräpariert und das Hodengewicht mit einer elektronischen Laborwaage bestimmt. Zur Samengewinnung wurden jeweils beide Nebenhodenschwänze retrograd mit 10 ml AndroMed[®] (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gespült und im gewonnenen Samen die Parameter Gesamtspermienzahl, Spermienmotilität und -morphologie erhoben. Die Bestimmung von Gesamtspermienzahl und Motilität erfolgte mittels Computer-assistierter Spermienanalyse (CASA, Hamilton Thorne IVOS, Version 12, Beverly, MA, USA). Für die Messungen fanden die Analyse-Einstellungen für Stiersperma gemäss Vorgabe des Geräteherstellers Anwendung (Tab. 1) und es wurden standardisierte Messkammern (Standard Count Analysis Chambers SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) verwendet. Vor der Untersuchung wurde der Samen jeweils während 10 Minuten im Wärmebad bei 37°C inkubiert.

Für die Beurteilung der Spermienmorphologie wurden 1-2 Tropfen Samen in ein Röhrchen mit 2 ml Phosphat-gepufferter Formalinlösung (Hancock, 1957) gegeben. Der fixierte Samen wurde auf einen Objektträger pipettiert und anschliessend zum Trocknen senkrecht auf ein Löschblatt gestellt. Die abgetrockneten Ausstriche wurden während 5 Minuten unter fliessendem Wasser gewaschen und anschliessend an der Luft getrocknet. Zur morphologischen Beurteilung wurden die so erhaltenen Ausstriche mit einem kleinen Tropfen Wasser versehen, ein Deckglas darübergelegt und mindestens 200 Spermien bei 1000facher Vergrösserung und Ölimmersion ausgezählt und die abweichenden Formen als Haupt- (abnormale Köpfe, Akrosomdefekte, Kernvakuolen, lose abnormale Köpfe, Mittelstückdefekte, Proximaltropfen) und Nebendefekte (losgelöste Kopfkappen, lose normale Köpfe, Distaltropfen, Schlingenbildungen) protokolliert.

Tabelle 1: Analyse-Einstellungen CASA für Stiersamen.

| Parameter | Einstellung |
|-------------------------------|----------------------|
| Frames aquired | 30 |
| Frame rate | 60 Hz |
| Minimum contrast | 80 |
| Minimum cell size | 5 pix |
| Minimum static contrast | 15 |
| Straightness (STR), threshold | 70 % |
| VAP cutoff | 30.0 $\mu\text{m/s}$ |
| Prog. min. VAP | 50.0 $\mu\text{m/s}$ |
| VSL cutoff | 15.0 $\mu\text{m/s}$ |
| Cell size | 5 pix |
| Cell intensity | 70 |
| Static head size | 0.1 to 3.4 |
| Static head intensity | 0.3 to 1.7 |
| Static elongation | 8 to 97 |
| Slow cells motile | NO |
| Magnification | 1.89 |
| Video frequency | 60 |
| Bright field | NO |
| LED illumination intensity | 2330 |
| IDENT Illumination intensity | 3500 |
| Temperature, set | 37.5 °C |
| Chamber depth | 20 μm |
| Chamber position | 4.0 mm |
| Chamber position B | 19.0 mm |
| Chamber position C | 0 mm |
| Chamber position D | 0 mm |
| Chamber type | Leja |
| Field selection mode | AUTO |
| IDENT fluorescent option | OFF |
| Integrating time | 1 frame |

4.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institut, Dübendorf). Der Einfluss der Gruppeneinteilung, des Zeitpunktes der Blutentnahme bzw. Untersuchung und der Behandlung (Interaktion von Gruppe und Zeitpunkt) auf die verschiedenen Parameter wurde mit einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen geprüft. Einfache Mittelwertvergleiche erfolgten mit dem ungepaarten *t*-Test und multiple Mittelwertvergleiche wurden nach Bonferroni Korrektur vorgenommen. Die Signifikanzschwelle wurde auf 0.05 festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Verträglichkeit der Impfung

Alle Kälber der Versuchsgruppe zeigten nach beiden Impfungen bei unauffälligem Allgemeinzustand einen temporären, individuell unterschiedlich starken Anstieg der Körpertemperatur bis maximal 40.7°C. Die durchschnittliche Körpertemperatur der Kälber mit und ohne Bopriva[®] während 7 Tagen nach der ersten und der zweiten Injektion ist in Abbildung 2 dargestellt. Nach Erst- und Zweitimpfung stieg die Temperatur in der Versuchsgruppe von anfänglich 38.5±0.4°C bzw. 38.9±0.1°C in 1-2 Tagen auf Maximalwerte von 39.8±0.2°C bzw. 40.3±0.2°C, nahm anschliessend kontinuierlich ab und erreichte 3 Tage später wieder physiologische Werte. Bei den Kontrolltieren schwankte die mittlere Körpertemperatur nach Erst- und Zweitimpfung zwischen 38.7±0.2°C und 39.2±0.2°C bzw. zwischen 38.8±0.2°C und 39.2±0.2°C. Signifikante ($P<0.05$) Gruppenunterschiede waren am 2. Tag nach der 1. Impfung (Tag 2) sowie am Tag der 2. Impfung (Tag 21) und ein Tag später (Tag 22) vorhanden.

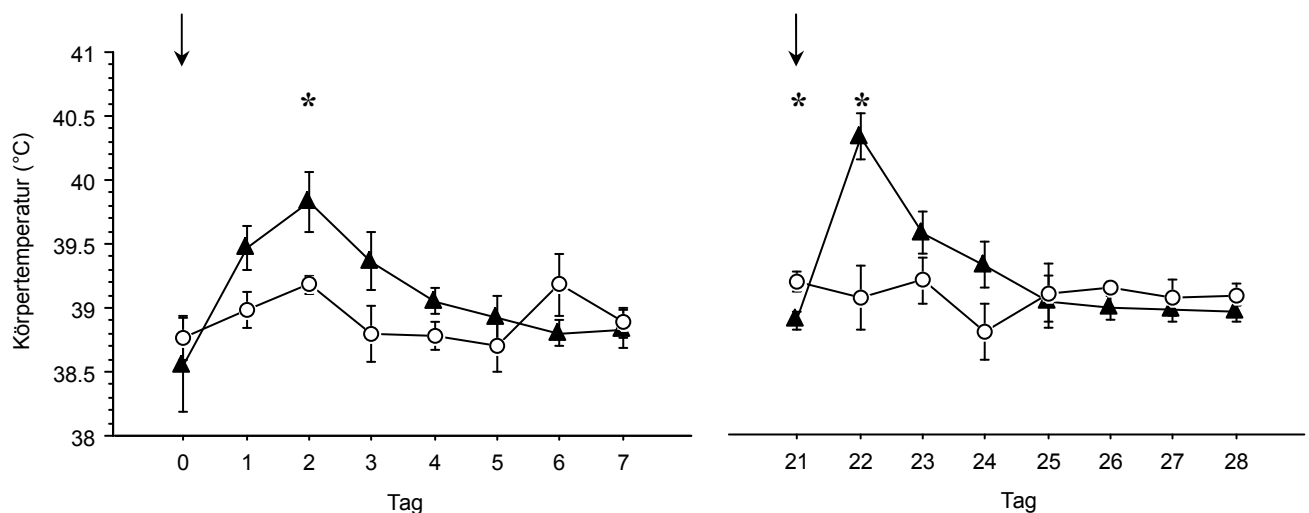


Abbildung 2: Körpertemperatur ($m\pm SEM$) nach der 1. (links) und 2. (rechts) Impfung bei Stierkälbern mit (▲, $n=6$) und ohne (○, $n=6$) Bopriva[®]. Pfeile stellen die Injektionen dar.

*Signifikanter Gruppenunterschied ($P<0.05$).

Alle geimpften Kälber entwickelten sowohl nach der 1. wie auch nach der 2. Impfung im Bereich der Injektionsstellen leichtgradige nicht schmerzhaftige Schwellungen, welche sich innerhalb von 2-4 Wochen spontan zurückbildeten. Die Kontrolltiere entwickelten keine Reaktionen an den Injektionsstellen.

5.2 Einfluss der Impfung auf die untersuchten Parameter

Die Ergebnisse der multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) zum Einfluss der Gruppeneinteilung, des Zeitpunktes der Untersuchung sowie der Interaktion von Gruppe und Zeitpunkt sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Daraus geht hervor, dass der Zeitpunkt der Untersuchung auf alle bestimmten Parameter einen signifikanten Einfluss hatte. Signifikant waren auch der Einfluss der Gruppe auf den anti-GnRH Titer und die Testosteronkonzentration sowie derjenige der Interaktion von Gruppe und Zeitpunkt auf den anti-GnRH Titer, die LH- und Testosteronkonzentration.

Tabelle 2: Einfluss von Gruppeneinteilung, Zeitpunkt der Untersuchung und Interaktion von Gruppe und Zeitpunkt auf die verschiedenen Parameter.

| Parameter | Gruppe | Zeitpunkt | Interaktion |
|--------------------------|---------------|------------------|--------------------|
| | P | P | P |
| Anti-GnRH Titer | 0.0004* | <0.0001* | <0.0001* |
| LH-Konzentration | 0.0825 | <0.0001* | 0.0392* |
| Testosteronkonzentration | 0.0328* | <0.0001* | 0.0007* |
| Skrotalumfang | 0.5638 | <0.0001* | 0.9951 |
| Körpergewicht | 0.3284 | <0.0001* | 0.6584 |

*signifikant (P<0.05)

5.2.1 Anti-GnRH Titer

Der Verlauf des durchschnittlichen Antikörpertiters gegen GnRH im Serum bei Kälbern mit und ohne Bopriva[®] während 30 Wochen nach der Erstimmunisierung ist in Abbildung 3 dargestellt. Bei den geimpften Kälbern stieg der anti-GnRH Titer bereits ab der 2. Woche

nach der 1. Impfung leicht und nach der 2. Impfung innerhalb von 2 Wochen rasch auf Maximalwerte von $499'192 \pm 100'983$ Einheiten an. Anschliessend nahm der Titer kontinuierlich ab und erreichte ab Woche 28 wieder Ausgangswerte. Bei den Kontrolltieren blieben die Titer stets gering. Signifikante ($P < 0.05$) Gruppenunterschiede waren in den Wochen 2-24 und in der Woche 27 vorhanden.

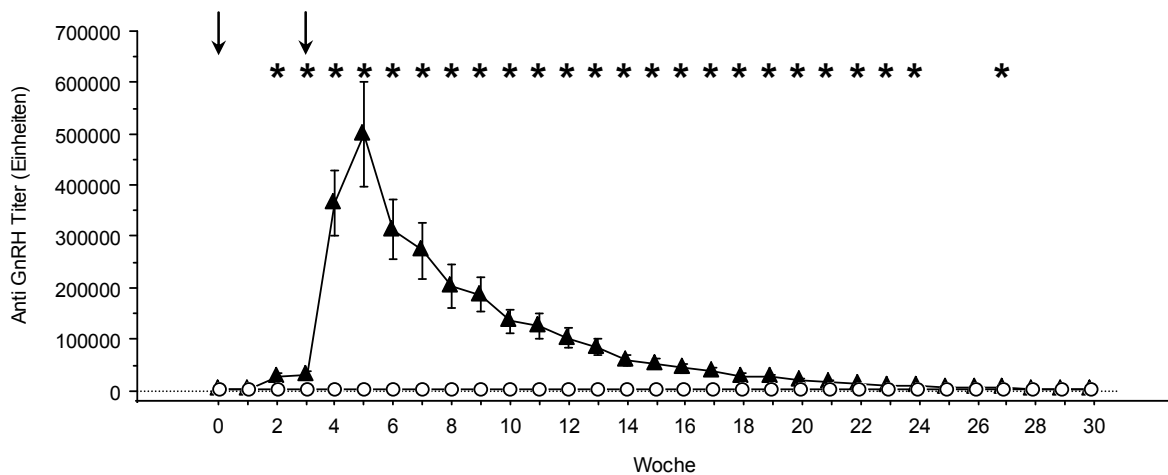


Abbildung 3: Anti-GnRH Titer ($m \pm \text{SEM}$) bei Stierkälbern mit (▲, $n=6$) und ohne (○, $n=6$) Bopriva[®]. Pfeile stellen die Injektionen dar. *Signifikanter Gruppenunterschied ($P < 0.05$).

Die individuellen Verläufe der anti-GnRH Titer bei den geimpften Kälbern sind in Abbildung 4 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die 2. Impfung bei allen Tieren einen starken Titeranstieg hervorgerufen hat und dass Maximalwerte 2 Wochen nach der Boosterinjektion erreicht wurden. Die Höchstwerte schwankten zwischen $868'025$ Einheiten (Kalb F) und $138'273$ Einheiten (Kalb C) und der Abfall auf Ausgangswerte fand individuell in den Wochen 21 (Kalb C), 25 (Kalb A, E), 26 (Kalb D) und 28 (Kalb B, F) statt.

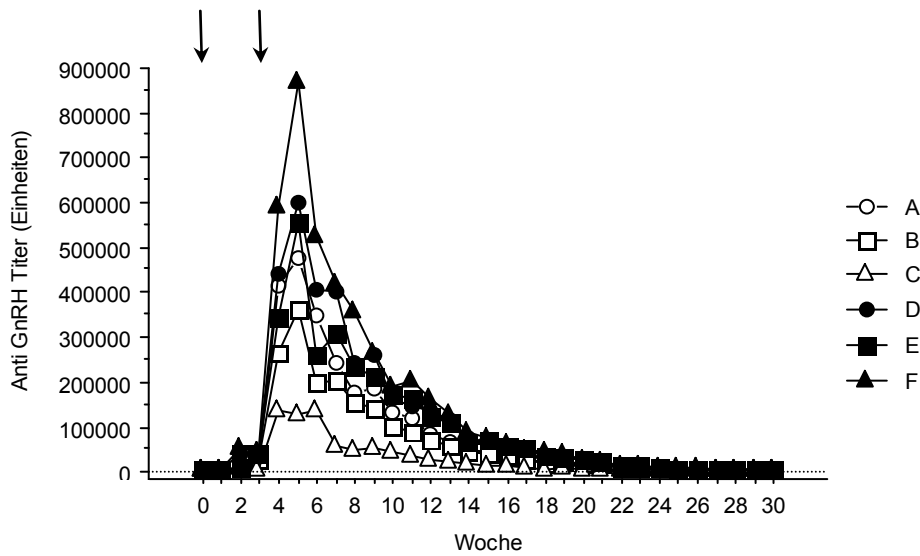


Abbildung 4: Individuelle anti-GnRH Titer bei 6 (A-F) mit Bopriva[®] geimpften Stierkälbern. Pfeile stellen die Injektionen dar.

5.2.2 LH-Konzentration

In Abbildung 5 ist der Verlauf der durchschnittlichen LH-Konzentration im Serum bei Kälbern mit und ohne Bopriva[®] während 30 Wochen nach der Erstimmunisierung dargestellt. Vor der Boosterinjektion in Woche 3 schwankten die mittleren LH-Konzentrationen in Versuchs- und Kontrollgruppe auf tiefem Niveau zwischen 0.14 ± 0.03 ng/ml und 0.24 ± 0.02 ng/ml bzw. zwischen 0.13 ± 0.01 ng/ml und 0.19 ± 0.03 ng/ml Serum. Anschliessend und bis Woche 22 war die Konzentration von LH bei den geimpften Kälbern stets tiefer als bei den Kontrolltieren und schwankte zwischen 0.01 ± 0.00 ng/ml (Woche 12, 13, 14) und 0.42 ± 0.02 ng/ml (Woche 22) bzw. zwischen 0.13 ± 0.03 ng/ml (Woche 15) und 0.57 ± 0.05 ng/ml Serum (Woche 22). Von Woche 23 bis Versuchsende zeigten beide Gruppen einen kontinuierlichen Anstieg der Werte mit Schwankungen zwischen 0.42 ± 0.02 ng/ml und 0.59 ± 0.01 ng/ml (Versuchsgruppe) bzw. zwischen 0.42 ± 0.01 ng/ml und 0.58 ± 0.03 ng/ml Serum (Kontrollgruppe). Signifikante ($P < 0.05$) Gruppenunterschiede waren in den Wochen 10, 12-14 und 22 vorhanden.

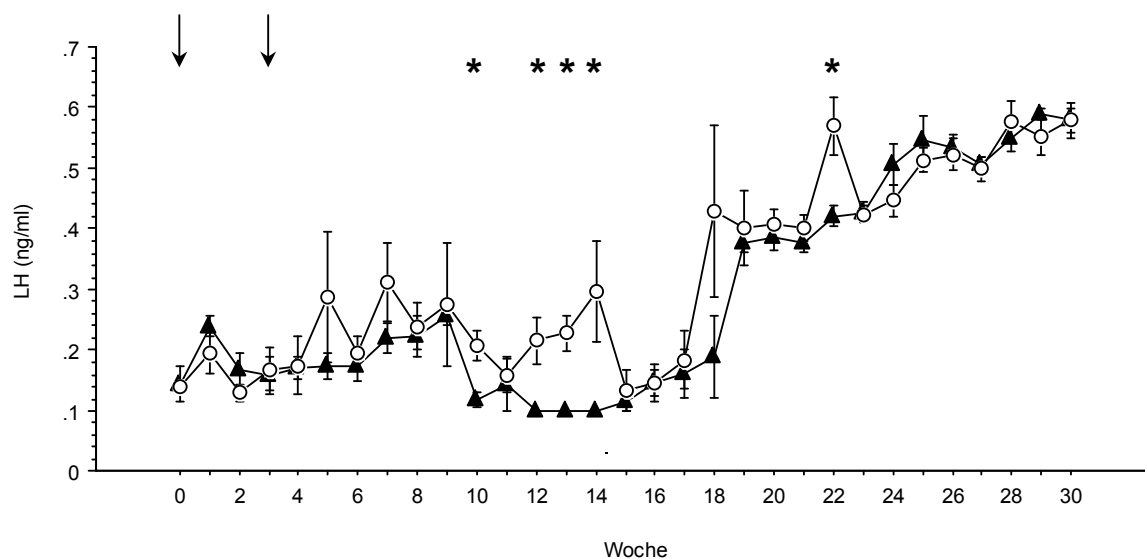


Abbildung 5: Serum LH-Konzentration ($m \pm \text{SEM}$) bei Stierkälbern mit (▲, $n=6$) und ohne (○, $n=6$) Bopriva[®]. Pfeile stellen die Injektionen dar. *Signifikanter Gruppenunterschied ($P < 0.05$).

Die individuellen Verläufe der LH-Konzentration bei den geimpften Kälbern sind in Abbildung 6 dargestellt. Von Woche 0 bis Woche 9 schwankte die Konzentration von LH bei allen 6 Tieren zwischen 0.10 und 0.36 ng/ml Serum. Anschliessend fielen die Konzentrationen auf Werte < 0.1 ng/ml Serum ab und blieben individuell lange während 5 (Kalb E), 6 (Kalb B, C), 8 (Kalb F) und 9 Wochen (Kalb A, D) auf diesem tiefen Niveau. Ein erneuter und anhaltender Anstieg der LH-Konzentration wurde ab den Wochen 15 (Kalb E), 16 (Kalb C), 18 (Kalb B) und 19 (Kalb A, D, F) beobachtet.

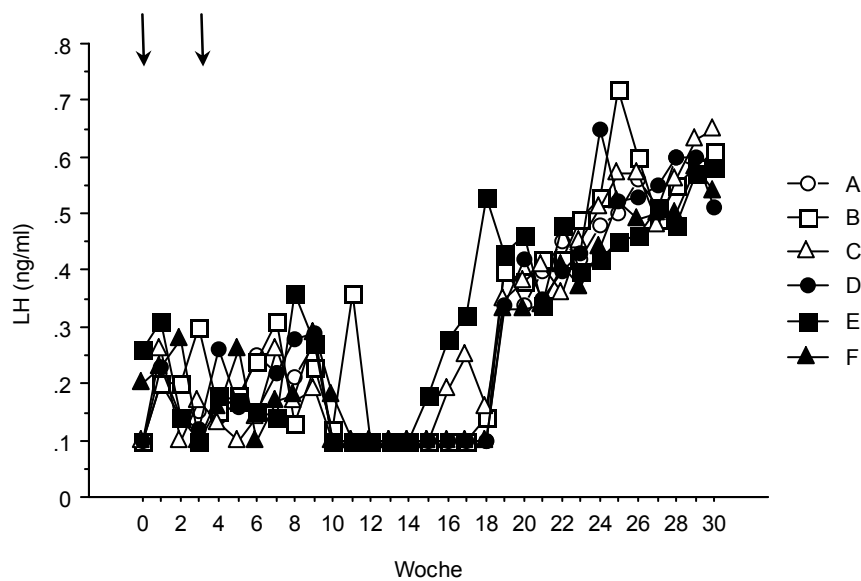


Abbildung 6: Individuelle Serum LH Konzentrationen bei 6 (A-F) mit Bopriva[®] geimpften Stierkälbern. Pfeile stellen die Injektionen dar.

5.2.3 Testosteronkonzentration

In Abbildung 7 ist der Verlauf der durchschnittlichen Testosteronkonzentration im Serum bei Kälbern mit und ohne Bopriva[®] während 30 Wochen nach der Erstimmunisierung dargestellt. Bei den geimpften Tieren betrug die mittleren Testosteronkonzentrationen von Versuchsbeginn bis zur Woche 24 stets weniger als 0.5 ng/ml Serum und stiegen anschliessend kontinuierlich an. Die Werte der Kontrollgruppe waren mit Ausnahme der Wochen 0-2 sowie 4 und 15 stets höher als 0.5 ng/ml Serum. Signifikante ($P < 0.05$) Gruppenunterschiede waren in den Wochen 5-12, 14-17, 21 und 25 feststellbar.

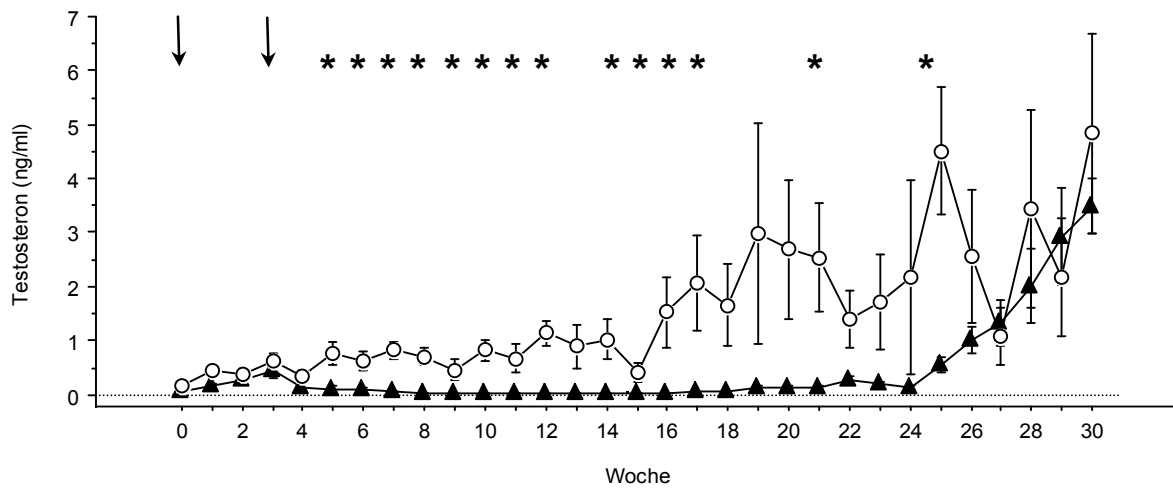


Abbildung 7: Serum Testosteronkonzentration ($m \pm \text{SEM}$) bei Stierkälbern mit (▲, $n=6$) und ohne (○, $n=6$) Bopriva[®]. Pfeile stellen die Injektionen dar. *Signifikanter Gruppenunterschied ($P < 0.05$).

Die individuellen Verläufe der Serum Testosteronkonzentration bei den geimpften Kälbern sind aus Abbildung 8 ersichtlich. Bis zur Boosterinjektion schwankten die Werte zwischen 0.01 ng/ml und 0.83 ng/ml Serum. Anschliessend fielen die Testosteronkonzentrationen auf Werte < 0.5 ng/ml Serum und blieben während mindestens 22 Wochen auf diesem tiefen Niveau. Ein erneuter Anstieg erfolgte individuell in den Wochen 25 (Kalb A, B), 26 (Kalb C, D), 27 (Kalb E) und 28 (Kalb F).

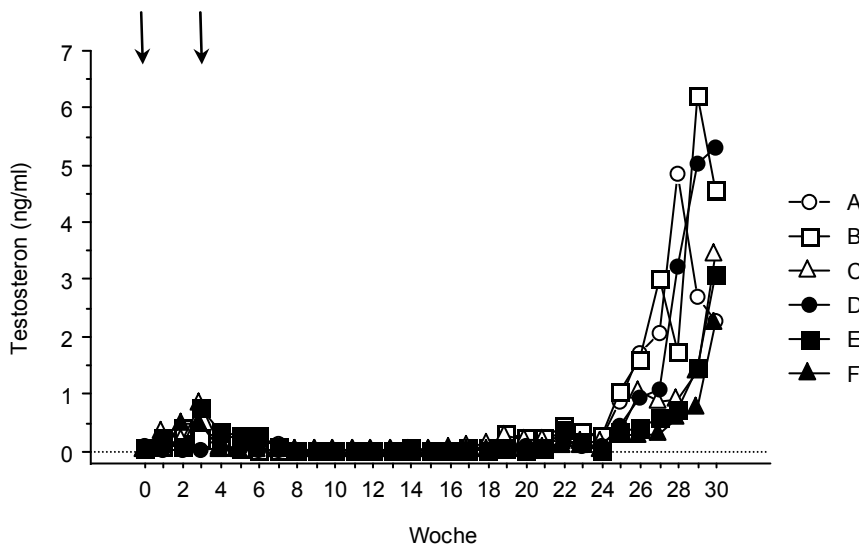


Abbildung 8: Individuelle Serum Testosteronkonzentrationen bei 6 (A-F) mit Bopriva[®] geimpften Stierkälbern. Pfeile stellen die Injektionen dar.

5.2.4 Skrotalumfang und Hodengewicht

In Abbildung 9 ist der Verlauf des durchschnittlichen Skrotalumfangs bei Kälbern mit und ohne Bopriva[®] in den Wochen 8-59 nach der Erstimmunisierung dargestellt. In beiden Gruppen folgte der Verlauf des Skrotalumfangs einer sigmoiden Kurve. Während einer anfänglichen Phase mit langsamem Hodenwachstum bewegte sich der Skrotalumfang in der Versuchs- und Kontrollgruppe in den Wochen 8-21 zwischen 13.8 ± 0.2 cm und 14.8 ± 0.2 cm bzw. zwischen 14.6 ± 0.5 cm und 17.2 ± 0.7 cm. Anschliessend stellte sich eine Phase mit beschleunigtem Hodenwachstum ein und der Skrotalumfang nahm in der Versuchs- und Kontrollgruppe kontinuierlich auf 29.9 ± 1.0 cm bzw. 33.2 ± 1.2 cm in Woche 49 zu. Ab Woche 50 verringerte sich das Wachstum wiederum in beiden Gruppen und in Woche 59 betrug der Skrotalumfang 33.5 ± 0.8 cm bei Stieren mit und 35.8 ± 1.2 cm bei Stieren ohne Bopriva[®]. Am Ende des Versuchs wies mit 30 cm der geimpfte Stier E den geringsten und mit 40 cm Stier H aus der Kontrollgruppe den grössten Skrotalumfang auf (Abb. 10). Die Durchschnittswerte der Versuchsgruppe waren stets geringer als diejenigen der Kontrollgruppe und signifikante ($P < 0.05$) Unterschiede waren in den Wochen 12, 17-18, 20-37, 43 sowie 45 vorhanden.

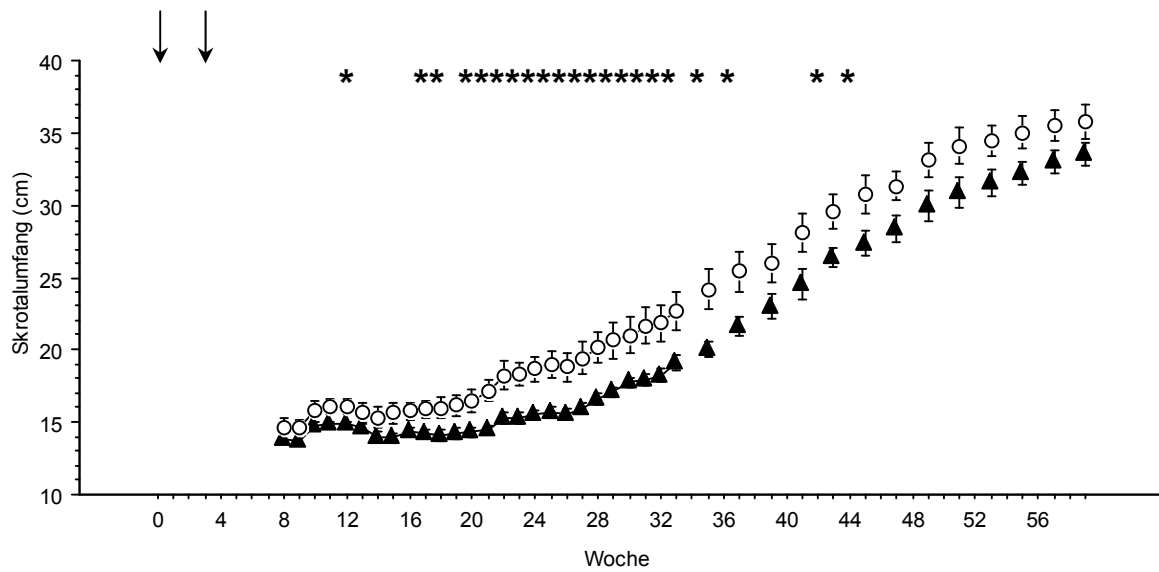


Abbildung 9: Skrotalumfang ($m \pm \text{SEM}$) bei Stierkälbern mit (▲, $n=6$) und ohne (○, $n=6$) Bopriva[®]. Pfeile stellen die Injektionen dar. *Signifikanter Gruppenunterschied ($P < 0.05$).



Abbildung 10: Skrotum eines Stieres mit (links) und ohne Bopriva[®] (rechts) am Ende des Versuchs (Woche 59).

In Abbildung 11 ist das Gewicht beider Hoden zum Zeitpunkt der Schlachtung (Woche 65) im Alter von 15 Monaten dargestellt. In der Versuchs- und Kontrollgruppe schwankte das Hodengewicht zwischen 481 und 634 g bzw. zwischen 508 und 831 g. Die Medianwerte betragen 573 g bei Kälbern mit und 666 g bei Kälbern ohne Bopriva[®], wobei der Unterschied nicht signifikant ($P=0.0765$) war.

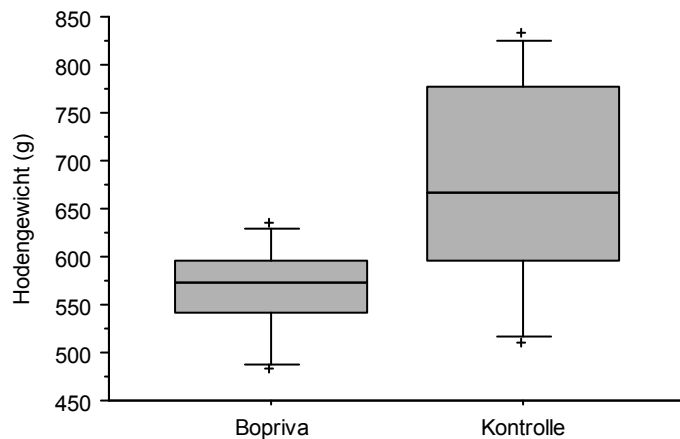


Abbildung 11: Hodengewicht zum Zeitpunkt der Schlachtung (Woche 65) bei Stieren mit und ohne Bopriva[®].

5.2.5 Verhalten und Libido

In der Versuchsgruppe konnten die ersten Aufsprungversuche in der Woche 10 (Lebenswoche 13) beobachtet werden, während dies in der Kontrollgruppe bereits vier Wochen früher der Fall war. Insgesamt wurden in der Versuchsgruppe 21 Aufsprungversuche festgestellt, wobei diese hauptsächlich durch die Kälber B und C mit 10 bzw. 9 Aufsprüngen erfolgten. Im gleichen Zeitraum wurden in der Kontrollgruppe insgesamt 63 Aufsprungversuche protokolliert, 25 bzw. 23 davon jeweils durch die Kälber H und I.

5.2.6 Samenqualität

Bei allen Stieren wurde nach der Schlachtung in Woche 65 Samen aus den Nebenhoden gewonnen und dessen Qualität bestimmt. Die Medianwerte (Schwankungen) der Gesamtspermienzahl (Abb. 12), der Spermienmotilität (Abb. 13), des Anteils an normalen Spermien (Abb. 14) sowie der Spermien mit Hauptdefekten (Abb. 15) bei den Tieren mit und

ohne Bopriva[®] betragen 4'679 Millionen (3'748-7'676 Millionen) bzw. 5'834 Millionen (2'655-9'240 Millionen), 43% (26-68%) bzw. 54% (12-77%), 5% (1-7%) bzw. 3% (1-5%) sowie 29% (16-72%) bzw. 55% (12-93%). Bei keinem der untersuchten Samenqualitätsparameter konnte ein signifikanter Gruppenunterschied ($P < 0.05$) festgestellt werden.

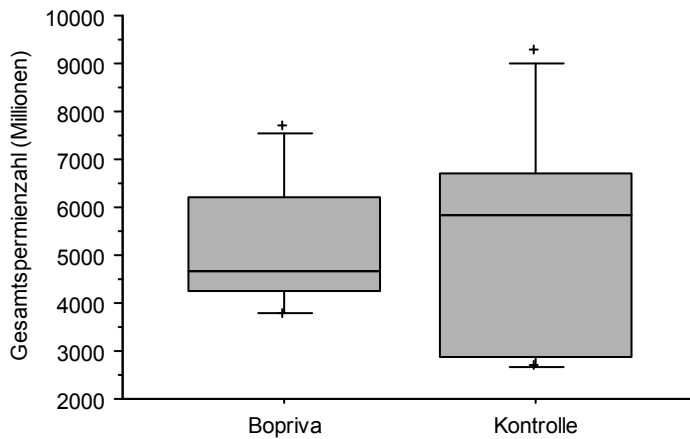


Abbildung 12: Boxplot der Gesamtspermienzahl bei Stieren mit und ohne Bopriva[®].

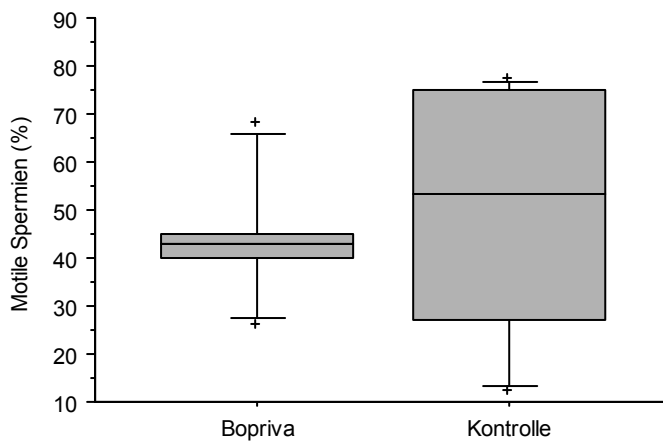


Abbildung 13: Boxplot der Spermienmotilität bei Stieren mit und ohne Bopriva[®].

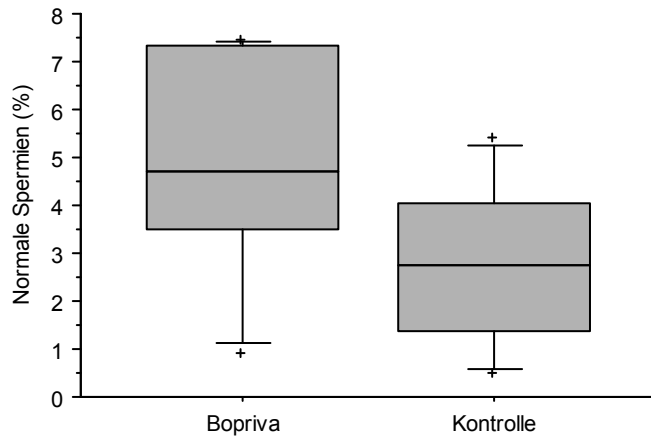


Abbildung 14: Boxplot des Anteils an normalen Spermien bei Stieren mit und ohne Bopriva®.



Abbildung 15: Boxplot des Anteils an Spermien mit Hauptdefekten bei Stieren mit und ohne Bopriva®.

5.2.7 Körpergewicht

In Abbildung 16 ist der Verlauf des durchschnittlichen Körpergewichtes bei Kälbern mit und ohne Bopriva® während 59 Wochen nach der Erstimmunisierung dargestellt. Die Gewichtsentwicklung war bei beiden Gruppen ähnlich, wobei das Körpergewicht in der Versuchs- und Kontrollgruppe von 50.8 ± 1.4 bzw. 47.2 ± 3.4 kg in Woche 0 auf 535.2 ± 18.3 bzw. 507.3 ± 27.8 kg in Woche 59 konstant zunahm. Bei der Schlachtung im Alter von 15 Monaten (Woche 65) betrug das Körpergewicht 591 ± 21 kg (490-627 kg) bei Kälbern mit und 562 ± 27 kg (442-631 kg) bei Kälbern ohne Bopriva®. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt war ein signifikanter ($P < 0.05$) Gruppenunterschied vorhanden.

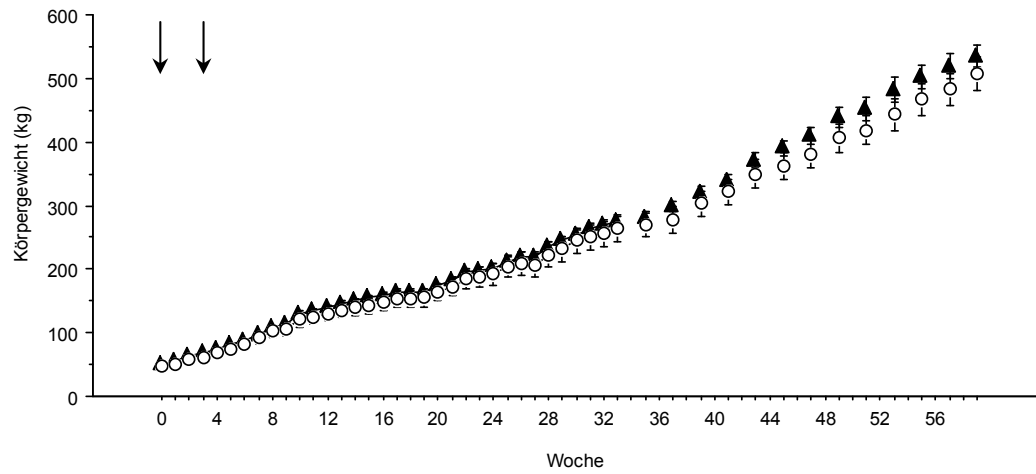


Abbildung 16: Körpergewicht ($m \pm \text{SEM}$) bei Stierkälbern mit (▲, $n=6$) und ohne (○, $n=6$) Bopriva[®]. Pfeile stellen die Injektionen dar.

6 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben gezeigt, dass bei präpubertären Stierkälbern durch eine zweimalige Immunisierung gegen GnRH mit Bopriva[®] im Alter von 3 und 6 Wochen Hodenentwicklung und endokrine Hodenfunktion im Vergleich zu den Kontrolltieren während 22 Wochen zuverlässig gehemmt werden konnten. Allgemeinbefinden und Sauglust sowie die Entwicklung des Körpergewichtes wurden durch die Impfung mit Bopriva[®] nicht beeinträchtigt. Ebenso war die Samenqualität bei Versuchsende zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

Als Folge der Impfung konnte eine temporäre Erhöhung der Körpertemperatur während 1 bis 4 Tagen und eine leichtgradige vorübergehende Schwellung an der Injektionsstelle beobachtet werden. Die geringen Nebenwirkungen von Bopriva[®] sind hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass die Vakzine speziell für das Rind entwickelt wurde und dass das verwendete Adjuvans gut verträglich ist.

Alle Kälber haben bereits nach der 1. Impfung mit einem geringen und nach der 2. Impfung mit einem starken Anstieg des Antikörpertiters gegen GnRH reagiert. Dieses Ergebnis zeigt in Übereinstimmung mit anderen Studien (Chase et al., 2008), dass Kälber bereits im Alter von 3 bis 6 Wochen mit einer zuverlässigen Immunantwort reagieren können. Der durchschnittliche Titeranstieg in unserer Studie war sogar höher und länger anhaltend als in einer früheren Untersuchung mit der gleichen Vakzine bei pubertären Stierkälbern (Theubet et al., 2010). Eine Erklärung dafür könnte in einer effizienteren Antigenpräsentation in den lokalen Lymphknoten liegen, wenn wie in der vorliegenden Studie beide Impfungen an der gleichen Halsseite und nicht wie in der erwähnten Studie (Theubet et al., 2010) an gegenüberliegenden Stellen durchgeführt werden.

Die Konzentration von LH war bei den Kälbern mit Bopriva[®] nach der 2. Impfung während 20 Wochen stets tiefer als bei den Kontrolltieren. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren insbesondere in den Wochen 12-14 vorhanden. Die Kontrolltiere zeigten in dieser Zeit einen kontinuierlichen Anstieg von LH auf Werte um 0.3 ng/ml Serum, welcher im Vergleich zu früheren Arbeiten (Evans et al., 1993; Bagu et al., 2006) mit durchschnittlichen Konzentrationen um 1.6 ng/ml gering ausfiel. Dieser Unterschied in der LH-Konzentration zwischen unserer Studie und den erwähnten Untersuchungen (Evans et al., 1993; Bagu et al., 2006) ist höchst wahrscheinlich auf die Häufigkeit der Blutentnahmen zurückzuführen. Bei letzteren Arbeiten fanden die Blutentnahmen in regelmässigen (10-12

min) Abständen während mehreren Stunden (10-12 Std.) statt, wobei die basalen und durchschnittlichen LH-Konzentrationen sowie diejenigen der Pulsamplituden ausgewertet wurden. Dies erlaubte, das LH-Sekretionsmuster und insbesondere eine Zunahme der Pulsfrequenz, die für die erhöhten präpubertären LH-Werte verantwortlich ist (Evans et al., 1993), genauer zu erfassen als in unserer Studie mit einzelnen wöchentlichen Blutentnahmen. Die anhaltende Hemmung von LH während den Wochen 12-14 bei den Kälbern mit Bopriva[®] zeigt, dass mit unserem Impfschema der präpubertäre LH-Anstieg nachhaltig gehemmt werden konnte. Ab Woche 17 (Lebenswoche 20) stieg die LH-Konzentration bei Kontrolltieren wie auch geimpften Kälbern vorerst rasch und anschliessend langsamer, aber kontinuierlich bis auf Werte von rund 0.6 ng/ml Serum an. In anderen Untersuchungen (Evans et al., 1993; Chandolia et al., 1997a; Aravindakshan et al., 2000; Bagu et al., 2006) war diese Zunahme der LH-Konzentration nach der 20. Lebenswoche nicht zu beobachten. Ein möglicher Grund für diese abweichenden Ergebnisse dürfte in der Verwendung unterschiedlicher Rassen liegen. Unsere Untersuchungen wurden mit Holstein Kälbern, andere hingegen mit Hereford (Evans et al., 1993; Chandolia et al., 1997a) oder Kreuzungen von Hereford und Charolais (Aravindakshan et al., 2000; Bagu et al., 2006) vorgenommen. Ausserdem ist bekannt, dass Fütterung und Gewichtszunahme die Sekretion von LH und den Eintritt in die Pubertät beeinflussen können (Brito et al., 2007a; Brito et al., 2007b; Barth et al., 2008).

Gleichzeitig mit dem starken anti-GnRH Titeranstieg nach der Boosterimpfung kam es zu einer deutlichen Hemmung der Testosteronsekretion. Diese hielt individuell lange, jedoch mindestens 22 Wochen an. Ein erneuter Testosteronanstieg konnte erst beobachtet werden, nachdem die Antikörpertiter wieder Ausgangswerte erreicht hatten. Erstaunlicherweise nahm die Testosteronsekretion erst 6 Wochen nach Anstieg der LH-Konzentrationen zu. Die anhaltend tiefen Testosteronwerte trotz Zunahme der LH-Sekretion lassen vermuten, dass die Impfwirkung nicht alleine auf eine Hemmung von GnRH, sondern auch auf eine verminderte Ansprechbarkeit der Hoden auf Gonadotropine zurückzuführen ist. Es wäre möglich, dass die Impfung zu einer verzögerten Ausbildung von LH-Rezeptoren auf den Leydig'schen Zwischenzellen führt, wie auch bei sogenannten Muchsen (short scrotum bulls), allerdings durch erhöhte Temperaturen verursacht, vermutet wird (Thun et al., 1980).

Die Impfung mit Bopriva[®] führte zu einer deutlichen Verzögerung der Hodenentwicklung. Der für das Erreichen der Pubertät kritische Skrotalumfang von 28 cm (Wolf et al., 1965;

Lunstra et al., 1978) wurde bei den geimpften Stieren im Durchschnitt erst in der Lebenswoche 51 und damit 6 Wochen später als bei den Kontrolltieren erreicht. Bei den Stieren mit Bopriva[®] trat keine vollständige Kompensation des Hodenwachstums auf und am Ende des Versuchs (Lebenswoche 68) war das Hodengewicht der geimpften Kälber tendenziell geringer als bei den Kontrolltieren. Diese Beobachtungen decken sich mit Untersuchungen beim Lamm (Brown et al., 1994; Brown et al., 1995; Clarke et al., 1998; Janett et al., 2003), die gezeigt haben, dass die Impfung gegen GnRH im juvenilen Alter zu einer unvollständigen Entwicklung des Genitaltrakts oder zur irreversiblen Hemmung der Gonadenfunktion führen kann. In unserer Studie wiesen alle geimpften Stiere bei der Schlachtung im Nebenhodensperma mehr als 3 Milliarden Samenzellen auf und die Spermienmotilität bewegte sich zwischen 26 und 68%. Damit wurden die zur Erlangung der Fruchtbarkeit nötigen Minimalanforderungen von mindestens 50 Millionen und mehr als 10% motilen Spermien (Wolf et al., 1965) bei weitem übertroffen. Dies zeigt eindeutig, dass die Wirkung der Impfung gegen GnRH bei präpubertären Stierkälbern in Bezug auf die Fertilität reversibel ist.

Im Hinblick auf die Entwicklung des Körpergewichts war zwischen geimpften und nicht geimpften Tieren kein signifikanter Unterschied feststellbar, was mit früheren Untersuchungen beim Rind (Cook et al., 2000; D'Occhio et al., 2001; Aissat et al., 2002; Neeson und Colson, 2004) und beim Schaf (Brown et al., 1994; Janett et al., 2003) übereinstimmt. Das tendenziell tiefere Körpergewicht der Kontrolltiere in unserer Studie war auf einen Kümmerer zurückzuführen, der bereits zu Beginn des Versuchs deutlich weniger wog als die anderen Kälber.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass beim Stierkalb durch eine zweimalige Impfung mit Bopriva[®] im Alter von 3 und 6 Wochen der präpubertäre Gonadotropinanstieg in den Lebenswochen 15-17 deutlich gehemmt werden konnte. Die Impfung führte zu einer Unterdrückung der Testosteronsekretion während mindestens 22 Wochen und zu einem um mindestens 6 Wochen verzögerten Eintritt in die Pubertät. Um eine länger und sicher anhaltende Hemmung der Fortpflanzung zu erzielen, muss die Impfung im Alter von 6 Monaten oder beim Einsetzen des Hodenwachstums wiederholt werden.

7 Literatur

- Aissat D., Sosa J. M., De Avila D. M., Bertrand K. P., Reeves J. J.: Endocrine, growth, and carcass characteristics of bulls immunized against luteinizing hormone-releasing hormone fusion proteins. *J. Anim. Sci.* 2002, 80: 2209-2213.
- Amann R. P., Walker O. A.: Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. *J. Anim. Sci.* 1983, 57: 433-442.
- Aravindakshan J. P., Honaramooz A., Bartlewski P. M., Beard A. P., Pierson R. A., Rawlings N. C.: Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology* 2000, 54: 339-354.
- Bagu E. T., Cook S., Gratton C. L., Rawlings N. C.: Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. *Reproduction* 2006, 132: 403-411.
- Barth A. D., Brito L. F. C., Kastelic J. P.: The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology* 2008, 70: 485-494.
- Boesch D., Steiner A., Stauffacher M.: Kälberkastration: Eine Befragung von Schweizer Mutterkuhhältern. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2006, 148: 231-244.
- Bonneau M., Dufour R., Chouvet C., Roulet C., Meadus W., Squires E. J.: The effects of immunization against luteinizing hormone-releasing hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs. *J. Anim. Sci.* 1994, 72: 14-20.
- Brito L. F., Barth A. D., Rawlings N. C., Wilde R. E., Crews D. H. Jr., Boisclair Y. R., Ehrhardt R. A., Kastelic J. P.: Effect of feed restriction during calfhood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. *Reproduction* 2007a, 134, 171-181.
- Brito L. F., Barth A. D., Rawlings N. C., Wilde R. E., Crews D. H. Jr., Mir P. S., Kastelic J. P.: Effect of improved nutrition during calfhood on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular development in bulls. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2007b, 33: 460-469.
- Brown B. W., Mattner P. E., Carroll P. A., Holland E. J., Paull D. R., Hoskinson R. M., Rigby R. D. G.: Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in rams. *J. Reprod. Fertil.* 1994, 101: 15-21.

- Brown B. W., Mattner P. E., Carroll P. A., Hoskinson R. M., Rigby R. D. G.: Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on reproductive function and hormones in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 1995, 103: 131-135.
- Caulkett N. A., MacDonald D. G., Janzen E. D., Cribb P. N., Fretz P. B.: Xylazine hydrochloride epidural analgesia: a method of providing sedation and analgesia to facilitate castration of mature bulls. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1993, 15: 1155-1159.
- Chandolia R. K., Evans A. C. O., Rawlings N. C.: Effect of inhibition of increased gonadotrophin secretion before 20 weeks of age in bull calves on testicular development. *J. Reprod. Fertil.* 1997a, 109: 65-71.
- Chandolia R. K., Evans A. C. O., Rawlings N. C.: The involvement of dopaminergic and opioidergic neuronal systems in the control of the early rise in LH secretion in bull calves. *J. Neuroendocrinol.* 1997b, 9: 121-127.
- Chase C. C. L., Hurley D. J., Reber A. J.: Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet. Clin. Food Anim.* 2008, 24: 87-104.
- Clarke I. J., Brown B. W., Tran V. V., Scott C. J., Fry R., Millar R. P., Rao A.: Neonatal immunization against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) results in diminished GnRH secretion in adulthood. *Endocrinology* 1998, 139: 2007-2014.
- Clarke I., Walker J., Hennessy D., Kreeger J., Nappier J., Crane J.: Inherent food safety of a synthetic gonadotropin-releasing factor (GnRF) vaccine for the control of boar taint in entire male pigs. *J. Appl. Res. Vet. Med.* 2008, 6: 7-14.
- Claus R., Lacorn M., Danowski K., Pearce M. C., Bauer A.: Short-term endocrine and metabolic reactions before and after second immunization against GnRH in boars. *Vaccine* 2007, 25: 4689-4696.
- Cook R. B., Popp J. D., Kastelic J. P., Robbins S., Harland R.: The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. *J. Anim. Sci.* 2000, 78: 2778-2783.
- Curtis P. D., Pooler R. L., Richmond M. E., Miller L. A., Mattfeld G. F., Quimby F. W.: Comparative effects of GnRH and porcine zona pellucida (PZP) immunocontraceptive vaccines for controlling reproduction in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Reprod. Suppl.* 2002, 60: 131-141.
- Dalin A. M., Andresen O., Malmgren L.: Immunization against GnRH in mature mares: antibody titres, ovarian function, hormonal levels and oestrous behaviour. *J. Vet. Med.* 2002, 49: 125-131.

- Deaver D. R., Glass J. D., Grieger D. M., Reeves J. J.: Effects of estradiol on secretion of LH, hypothalamic function and testicular development in bull calves. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1988, 5: 307-316.
- D'Occhio M. J., Aspden W. J., Trigg T. E.: Sustained testicular atrophy in bulls actively immunized against GnRH: potential to control carcass characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 2001, 66: 47-58.
- Dunshea F. R., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K. A., Lopaticki S., Nugent E. A., Simons J. A., Walker J., Hennessy D. P.: Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J. Anim. Sci.* 2001, 79: 2524-2535.
- Elhay M., Newbold A., Britton A., Turley P., Dowsett K., Walker J.: Suppression of behavioural and physiological oestrus in the mare by vaccination against GnRH. *Aust. Vet. J.* 2007, 85: 39-45.
- Evans A. C. O., Currie W. D., Rawlings N. C.: Opioidergic regulation of gonadotrophin secretion in the early prepubertal bull calf. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 99: 45-51.
- Evans A. C. O., Davies F. J., Nasser L. F., Bowman P., Rawlings N. C.: Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. *Theriogenology* 1995, 43: 569-578.
- Evans A. C. O., Pierson R. A., Garcia A., McDougall L. M., Hrudka F., Rawlings N. C.: Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology* 1996, 46: 345-357.
- Fayrer-Hosken R.: Controlling animal populations using anti-fertility vaccines. *Reprod. Dom. Anim.* 2008, 43: 179-185.
- Fazili M. R., Bhattacharyya H. K., Buchoo B. A., Kirmani M. A., Darzi M. M., Khan I.: Evaluation of pinhole castration technique in rams. *Small Rum. Res.* 2009, 84: 61-64.
- Ferro V. A., Khan M. A. H., McAdam D., Colston A., Aughey E., Mullen A. B., Waterston M. M., Harvey M. J. A.: Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) - a histological comparison in male animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 101: 73-86.
- Finnerty M., Enright W. J., Roche J. F.: Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls. *J. Reprod. Fertil.* 1998, 114: 85-94.
- Fordyce G., Hodge P. B., Beaman N. J., Laing A. R., Campero C., Shepherd R. K.: An evaluation of calf castration by intra-testicular injection of a lactic acid solution. *Aust. Vet. J.* 1989, 66: 272-276.

- Fuchs T., Thun R., Parvizi N., Nathues H., Koehrmann A., Andrews S., Brock F., Klein G., Sudhaus N., Grosse Beilage E.: Effect of a gonadotropin-releasing factor vaccine on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone concentrations and on the development of testicles and the expression of boar taint in male pigs. *Theriogenology* 2009, 72: 672-680.
- Geary T. W., Grings E. E., MacNeil M. D., De Avila D. M., Reeves J. J.: Use of recombinant gonadotropin-releasing hormone antigens for immunosterilization of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 2006, 84: 343-350.
- Hancock J. L.: The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Microscop. Soc.* 1957, 76: 84-97.
- Hilbe M., Jaros P., Ehrensperger F., Zlinszki K., Janett F., Hässig M., Thun R.: Histomorphological and immunohistochemical findings in testes, bulbourethral glands and brain of immunologically castrated male piglets. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2006, 148: 599-608.
- Hoskinson R. M., Rigby R. D. G., Mattner P. E., Huynh V. L., D'Occhio M. J., Neish A., Trigg T. E., Moss B. A., Lindsey M. J., Coleman G. D.: Vaxstrate: an anti-reproductive vaccine for cattle. *Aust. J. Biotechnol.* 1990, 4: 166-170.
- Imboden I., Janett F., Burger D., Crowe M. A., Hässig M., Thun R.: Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology* 2006, 66: 1866-1875.
- Jago J. G., Bass J. J., Matthews L. R.: Evaluation of a vaccine to control bull behaviour. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.* 1997, 57: 91-95.
- Janett F., Lanker U., Jörg H., Hässig M., Thun R.: Die Kastration männlicher Lämmer mittels Immunisierung gegen GnRH. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2003, 145: 291-299.
- Janett F., Lanker U., Jörg H., Meijerink E., Thun R.: Unterdrückung der Fortpflanzungsaktivität durch aktive Immunisierung gegen GnRH beim adulten weiblichen Schaf. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2009a, 151: 53-59.
- Janett F., Stump R., Burger D., Thun R.: Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (EquityTM) in the adult stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 2009b, 115: 88-102.
- Jaros P., Bürgi E., Stärk K. D. C., Claus R., Hennessy D., Thun R.: Effect of active immunization against GnRH on androstenone concentration, growth performance and carcass quality in intact male pigs. *Liv. Prod. Sci.* 2005, 92: 31-38.

- Jeffcoate I. A., Lucas J. M. S., Crichton D. B.: Effects of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Theriogenology* 1982, 18: 65-77.
- Kent J. E., Thrusfield M. V., Robertson I. S., Molony V.: Castration of calves: a study of methods used by farmers in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 1996, 138: 384-387.
- Lacroix A., Garnier D. H., Pelletier J., Caraty A., Moulin O.: Temporal fluctuations of plasma LH and testosterone in Charolais bull calves during the first year of life. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 1977, 17: 1013-1019.
- Lacroix A., Pelletier J.: Short-term variations in plasma LH and testosterone in bull calves from birth to 1 year of age. *J. Reprod. Fertil.* 1979, 55: 81-85.
- Lunstra D. D., Ford J. J., Echternkamp S. E.: Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J. Anim. Sci.* 1978, 46: 1054-1062.
- MacDonald R. D., Peters J. L., Deaver D. R.: Effect of naloxone on the secretion of LH in infantile and prepubertal Holstein bull calves. *J. Reprod. Fertil.* 1990, 89: 51-57.
- Madgwick S., Bagu E. T., Duggavathi R., Bartlewski P. M., Barrett D. M. W., Huchkowsky S., Cook S. J., Beard A. P., Rawlings N. C.: Effects of treatment with GnRH from 4 to 8 weeks of age on the attainment of sexual maturity in bull calves. *Anim. Reprod. Sci.* 2008, 104: 177-188.
- McCarthy M. S., Hafs H. D., Convey E. M.: Serum hormone patterns associated with growth and sexual development in bulls. *J. Anim. Sci.* 1979, 49: 1012-1020.
- Miller L. A., Johns B. E., Killian G. J.: Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2000, 44: 266-274.
- Miller L. A., Rhyan J. C., Drew M.: Contraception of bison by GnRH vaccine: a possible means of decreasing transmission of brucellosis in bison. *J. Wildl. Dis.* 2004, 40: 725-730.
- Miyamoto A., Umezu M., Ishii S., Furusawa T., Masaki J., Hasegawa Y., Ohta M.: Serum inhibin, FSH, LH and testosterone levels and testicular inhibin content in beef bulls from birth to puberty. *Anim. Reprod. Sci.* 1989, 20: 165-178.
- Molenaar G. J., Lugard-Kok C., Meloen R. H., Oonk R. B., De Koning J., Wensing C. J.: Lesions in the hypothalamus after active immunisation against GnRH in the pig. *J. Neuroimmunol.* 1993, 48: 1-11.
- Molony V., Kent J. E., Robertson I. S.: Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. *Appl. Anim. Beh. Sci.* 1995, 46: 33-48.

- Neeson D., Colson M.: The effects of immuno-castration on bull behaviour and growth rate. Final Report - 01FT94. Farmer Initiated Technology & Transfer 2004.
- Ponvijay K. S.: Pinhole Castration: a novel minimally invasive technique for in situ spermatic cord ligation. *Vet. Surg.* 2007, 36: 74-79.
- Rawlings N., Fletcher P., Henricks D., Hill J.: Plasma luteinizing hormone (LH) and testosterone levels during sexual maturation in beef bull calves. *Biol. Reprod.* 1978, 19: 1108-1112.
- Rawlings N. C., Evans A. C. O.: Androgen negative feedback during the early rise in LH secretion in bull calves. *J. Endocrinol.* 1995, 145: 243-249.
- Rawlings N., Evans A. C. O., Chandolia R. K., Bagu E. T.: Sexual maturation in the bull. *Reprod. Dom. Anim.* 2008, 43: 295-301.
- Rodriguez R. E., Wise M. E.: Ontogeny of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the bull calf during infantile and pubertal development. *Endocrinology* 1989, 124: 248-256.
- Schanbacher B. D., Pratt B. R.: Response of a cryptorchid stallion to vaccination against luteinising hormone releasing hormone. *Vet. Rec.* 1985, 116: 74-75.
- Secchiari P., Martorana F., Pellegrini S., Luisi M.: Variation of plasma testosterone in developing Friesian bulls. *J. Anim. Sci.* 1976, 42: 405-409.
- Seideman S. C., Cross H. R., Crouse J. D.: Carcass characteristics, sensory properties and mineral content of meat from bulls and steers. *J. Food Qual.* 1989, 11: 497-507.
- Stafford K. J., Mellor D. J., Todd S. E., Bruce R. A., Ward R. N.: Effects of local anaesthesia or local anaesthesia plus a non-steroidal anti-inflammatory drug on the acute cortisol response of calves to five different methods of castration. *Res. Vet. Sci.* 2002, 73: 61-70.
- Steiner A., Stoffel M.: Kastration von männlichen Kälbern - eine Übersicht. *Tierärztl. Prax.* 2008, 36: 25-28.
- Stevens J. D., Sosa J. M., Deavila D. M., Oatley J. M., Bertrand K. P., Gaskins C. T., Reeves J. J.: Luteinizing hormone-releasing hormone fusion protein vaccines block estrous cycle activity in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 2005, 83: 152-159.
- Stoffel M. H., Von Rotz A., Kocher M., Merkli M., Boesch D., Steiner A.: Histological assessment of testicular residues in lambs and calves after Burdizzo castration. *Vet. Rec.* 2009, 164: 523-527.
- Sundby A., Velle W.: Plasma concentration of testosterone in young bulls in relation to age, rate of weight gain and stimulation with human chorionic gonadotrophin. *J. Endocrinol.* 1980, 86: 465-469.

- Theubet G., Thun R., Hilbe M., Janett F.: Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva®) beim männlichen pubertären Kalb. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2010, 152: 459-469.
- Thürer S., Doherr M. G., Wechsler B., Mellema S. C., Nuss K., Kirchhofer M., Steiner A.: Einfluss der Lokalanästhesie auf Kurz- und Langzeitschmerzen verursacht durch drei unblutige Kastrationsmethoden beim Kalb. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2007, 149: 201-211.
- Thun R., Leuch F., Eggenberger E., Zerobin K.: Plasma testosterone concentrations in bulls with intact and shortened scrotums during sexual maturation. *Biol. Reprod.* 1980, 22: 765-771.
- Turkstra J. A., Van Der Meer F. J. U. M., Knaap J., Rottier P. J. M., Teerds K. J., Colenbrander B., Melen R. H.: Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 86: 247-259.
- Ülker H., Kanter M., Gökdal Ö., Aygün T., Karakus F., Sakarya M. E., Deavila D. M., Reeves J. J.: Testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in ram lambs immunized against recombinant LHRH fusion proteins. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 86: 205-219.
- Wolf F. R., Almquist J. O., Hale E. B.: Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J. Anim. Sci.* 1965, 24: 761-765.
- Wrobel K. H.: Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anat. Embryol.* 2000, 202: 209-222.
- Zamaratskaia G., Rydhmer L., Andersson H. K., Chen G., Lowagie S., Andersson K., Lundström K.: Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 2008, 108: 37-48.
- Zulauf M., Gutzwiller A., Steiner A., Hirsbrunner G.: Einfluss eines Schmerzmittels bei der unblutigen Kastration des männlichen Kalbes auf Kraftfutterverzehr, Gewichtszunahme und Serum-Cortisolspiegel. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2003, 145: 283-290.

8 Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, welche mir beim Erstellen dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere:

Herrn PD Dr. F. Janett, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Überlassung des Themas, die grossartige Unterstützung und Betreuung sowie die Übernahme des Referates.

Frau PD Dr. N. Borel, Institut für Veterinärpathologie, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. emerit. Dr. R. Thun, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Universität Zürich, für die fachliche Unterstützung sowie die Hilfe bei der Niederschrift.

Herrn Prof. Dr. U. Bleul, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Hilfestellung in fachlicher und technischer Hinsicht.

Frau Dr. M. Piechotta, Endokrinologisches Labor der Klinik für Rinder, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland, sowie Herrn R. Howard und Frau S. Amatayakul-Chantler, Pfizer Animal Health, Melbourne, Australien, für die Bestimmungen der LH- bzw. Antikörper- und Testosteronkonzentrationen.

Herrn H. Müller, für die tatkräftige und umfangreiche Mithilfe beim Versuch.

Herrn S. Keo, für die Unterstützung bei der Datenerhebung und bei der Laborarbeit.

Frau E. Weidmann, für die Mithilfe bei der Betreuung der Kälber.

Allen Tierpflegern und Mitarbeitern des Betriebsdienstes am Tierspital Zürich und an der landwirtschaftlichen Schule Strickhof Lindau, für die praktische Mithilfe am Projekt.

Meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, für die Unterstützung in der Versuchsphase.

Lebenslauf

Gerig Tobias

Geboren am 11. Dezember 1983

Heimatort: Oberhelfenschwil SG

1990-1996 Primarschule in Amden

1996-1998 Sekundarschule in Weesen

1998-2002 Mittelschule in Sargans, Schwerpunktfach Biologie und Chemie

2002-2003 Militär (Veterinärtruppen)

2003-2008 Studium der Veterinärmedizin, Universität Zürich

2008-2010 Assistent und Doktorand an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Seit 2010 Assistent in der Tierarztpraxis Abgottspon in Schwyz

Zürich, 23.11.2010