

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 104, 505–512. – **STEINHARDT, M., THIELSCHER, H.-H., GRÜNBERG, W.** (2000): Physiologische Variablen bei Mutterkühen und bei deren Kälbern während der Weidehaltung. Landbauforschung Völkenrode Heft 1/2, S. 54–75. – **STEINHARDT, M., THIELSCHER, H.-H.** (2000a): Transportbelastung bei Milchrindkälbern. Effekte von Aufzuchtbedingungen auf metabolische und hormonelle Variablen. Tierärztl. Umschau 55 (1), 22–28. – **STEINHARDT, M., THIELSCHER, H.-H.** (2000b): Reaktionen von Milchrindkälbern im Alter von 60 Lebenstagen auf Transport mit Straßenfahrzeugen. Effekte durch Haltungsvarianten und Entwicklungsqualität der Kälber auf physiologische Variablen und deren Änderungen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 107 (2), 59–65. – **STEINHARDT, M., THIELSCHER, H.-H.** (2000c): Herzfrequenzkennwerte und Tagesperiodik bei Färsen verschiedener Rassen in Weidehaltung. Einflüsse durch Trächtigkeit und Jahreszeit. Tierärztl. Prax. 29 (G): 322–330. – **STEINHARDT, M.** (2001): Reaktionen von Jungrindern der Mutterkuhhaltung auf Transport mit Straßenfahrzeugen. Plasmacortisol, biochemische, hämatologische Variablen, Mineralstoffe und Herzfrequenz. Tierärztl. Umschau 56 (im Druck). – **STEINHARDT, M., THIELSCHER, H.-H.** (2001): Transportbelastung bei Milchrindkälbern. Effekte von Aufzuchtbedingungen auf Säure-Basen-Status, hämatologische Variablen, Blutgasgehalte und Herzschlagfrequenz. Tierärztl. Prax. 1 (G), 8–16. – **TARRANT, P. V.** (1990): Transportation of cattle by road. Appl. Anim. Behav. Sci. 28, 153–170. – **VEISSIER, I., le NEINDRE, P.** (1992): Reactivity of Aubrac heifers wposed to a novel environment alone or in groups of four. Appl. Anim. Behav. Sci. 33, 11–15. – **VERKERK, G. A., MACMILLAN, K. L., McLEAY L. M.** (1994): Adrenal cortex response to adrenocorticotropic hormone in dairy cattle. Dom. Anim. Endocrinol. 11, 115–123. – **WAYNERT, D. F., STOOKEY, J. M., SCHWARTZKOPFGENSWEIN, K. S., WATTS, J. M., WALTZ, C. S.** (1999): The response of beef cattle to noise during handling. Appl. Anim. Behav. Sci. 62, 27–42. – **WILHELM, J. S.** (1996): Untersuchung zur Transportbelastung von Rindern anhand physiologischer Parameter. Vet. med. Diss. Gießen, 1996. – **ZDUNCZYK, S., JANOWSKI, T., RAS, A., ZEBRACKI, A.** (1991): Untersuchungen über den Einfluß von Transport auf den Steroidhormonspiegel und den weiteren Trächtigkeitsverlauf bei hochtragenden Kühen. Tierärztl. Umschau 46, 729–736.

Anschrift des Verfassers:

Dr. habil. M. STEINHARDT, Institut für Tierzucht und Tierverhalten (FAL), D-23847 Westerau.

Untersuchungen zur Stabilität des Progesterons im Kot bei verschiedenen im Zoo gehaltenen Wildtierarten

NEUMANN, G., GOTTSCHALK, J., EULENBERGER, K., GRÜN, E.

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Leipzig
*Zoologischer Garten Leipzig GmbH

NEUMANN, G., GOTTSCHALK, J., EULENBERGER, K., GRÜN, E. (2002): **Untersuchungen zur Stabilität des Progesterons im Kot bei verschiedenen im Zoo gehaltenen Wildtierarten.**

Dtsch. tierärztl. Wschr. 109, 245–249

Zusammenfassung

In methodischen Untersuchungen sollte festgestellt werden, inwiefern äußere Faktoren (Trockenmasse des Kotes, Zeitpunkt des Einfrierens, Dauer der Probenlagerung im gefrorenen Zustand, mehrmaliges Auftauen der Proben) Einfluss auf die Progesteronkonzentration im Kot bei verschiedenen, im Zoo gehaltenen Wildtierarten (Rothschild-Giraffen, Spitzmaulnashörner, Damagazellen, Schneeziegen) haben. Innerhalb einer Tierart zeigten sich dabei nur geringfügige Schwankungen der Trockenmasse des Kotes, so dass sich auch ohne vorherige Trocknung der Proben gut vergleichbare Progesteronwerte in verschiedenen Kotproben der gleichen Tierart ermitteln lassen. Nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung der Proben bei Raumtemperatur waren die Progesteronwerte im Kot aller drei Tierarten im Vergleich zum sofortigen Einfrieren der Proben erhöht, bei Giraffen und Nashörnern signifikant. Bei Nashörnern und Gazellen wurden nach längerer Lagerzeit (1 und 3 Monate) im gefrorenen Zustand (-20 °C) keine signifikanten Veränderungen der Progesteronkonzentration im Kot festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Giraffen in Proben mit hohen Ausgangskonzentrationen unter ansonsten gleichen Bedingungen eine signifikante Erniedrigung des Progesterongehaltes. Im Vergleich zu einmaligem führte mehrmaliges Auftauen der Proben unabhängig von der Tierart zum Absinken der Progesteronkonzentration des Kotes (signifikant bei Nashörnern und Gazellen).

Schlüsselwörter: Progesteron, Stabilität, Fäzes, Wildtiere, methodische Untersuchungen

NEUMANN, G., GOTTSCHALK, J., EULENBERGER, K., GRÜN, E. (2002): **Studies on the stability of progesterone in faeces of several wild animal species kept in a zoological garden.**

Dtsch. tierärztl. Wschr. 109, 245–249

Summary

Methodical investigations were carried out to monitor especially in what respect external factors (dry mass of faeces, time point of freezing, duration of storage of the frozen samples, multiple defrosting of the samples) influence the progesterone concentration of the faeces of several wild animal species (Baringo giraffe, Black rhinoceros, Dama gazelle, Mountain goat) living in a zoological garden. With reference to one animal species the dry mass of the faeces showed only small variations. Therefore, it is possible to estimate comparable progesterone levels in several faecal samples of the same animal species without drying the samples. In all cases the progesterone concentration was increased after 24 and 48 hour storage of the faecal samples at room temperature compared with samples frozen directly (significant differences for giraffes and rhinoceroses). Samples of rhinoceroses and gazelles showed no significant changes of their progesterone concentration after a long time of storage (one and three months) in the freezing state (-20 °C). On the other hand, in faeces of giraffes with high progesterone levels a significant decrease of the initial level was pointed out. In comparison of single and multiple defrosting of the faecal samples, the latter caused a decrease of the progesterone concentration of the faeces of all animal species investigated (significant differences for rhinoceroses and gazelles).

Key words: Progesterone, stability, faeces, Wild animals, methodical investigations

Sexualsteroiden, die einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen, werden vor der fäkalen Ausscheidung nach Konjugation in der Leber über die Galle in den Darm überführt und dort durch einen mikrobiellen enzymatischen Abbau teilweise oder vollständig hydrolysiert. Sie werden zum größten Teil über die Faeces ausge-

schieden, können jedoch auch zum Teil rückresorbiert werden (HOFFMANN u. EVERS, 1986).

In verschiedenen Untersuchungen wurde eine zunehmende Kontaminierung der Umwelt mit natürlichen und künstlichen Steroiden festgestellt, die vor allem bei Menschen und anderen Säugetieren zu

Fortpflanzungsstörungen führen können (JENSEN et al., 1995; TURAN, 1995). Derartige Umweltkontaminationen sind bei Stall- oder Weidehaltung landwirtschaftlicher Nutztiere durch die in deren Kot bzw. Harn ausgeschiedenen Steroide bedingt (MÖSTL et al., 1997). Daraus ergab sich die Notwendigkeit zu untersuchen, welchen äußeren Einflüssen der Steroidgehalt in den Exkrementen unterliegt. So wurde in Verlaufsuntersuchungen zur Stabilität von Sexualsteroiden im Kot von tragenden und nicht tragenden Kühen festgestellt, dass nach 12-wöchiger Lagerung der Proben bei 20–23 °C nur noch 8 % der Progesteronausgangswerte vorhanden waren (SCHLENKER et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Abnahme der Progesteronkonzentration bei 5 °C wesentlich langsamer verläuft als bei 30 °C (SCHLENKER et al., 1999).

Da bei Wildtieren nichtinvasive und stressfreie Diagnoseverfahren im Vordergrund stehen müssen, wurden bei ihnen in zunehmendem Maße zur Zyklus- und Trächtigkeitsdiagnostik ebenfalls Sexualsteroidnachweise im Kot etabliert (u. a. KIRKPATRICK et al., 1993; SCHWARZENBERGER et al., 1993; HEISTERMANN et al., 1998).

Die in Kotanalysen ermittelten Steroidkonzentrationen sind u. a. mit folgenden Einflussfaktoren in engem Zusammenhang zu sehen (GLATZEL, 1999): Art und Weise der Probengewinnung, Feuchtigkeitsgehalt der untersuchten Kotproben, Stabilität der Steroide hinsichtlich Lagerungsdauer und -temperatur.

Durch die bisherigen Untersuchungen wird deutlich, dass für zuverlässige Aussagen über die Steroidkonzentration im Kot das präanalytische Probenmanagement von immenser Bedeutung ist. In den vorliegenden Untersuchungen wurde daher die Stabilität des Progesterons im Kot bei verschiedenen Wildtieren des Leipziger Zoos unter dem Einfluss externer Faktoren geprüft.

Material und Methoden

Es sollte festgestellt werden, ob und in welchem Ausmaß äußere Faktoren Einfluss auf den Progesterongehalt in vorliegenden Kotproben haben. Die untersuchten Einflussfaktoren waren hierbei:

1. Trockenmasse des Kotes: Von jeder zuvor tiefgefroren gelagerten Probe wurde 1 g Kot eingewogen und zum Trocknen im Wärmeschrank bei 37 °C gelagert. Nach 3 Tagen erfolgte die Kontrollwägung.
2. Veränderung des Einfrierzeitpunktes (sofortiges Einfrieren, Einfrieren nach 24- bzw. 48-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur): Die Proben wurden direkt nach dem Abkoten in 3 Teile geteilt, von denen der erste sofort, der zweite nach 24 Stunden und der dritte nach 48 Stunden eingefroren wurde. Die Lagerung bis zum Einfrieren geschah bei Zimmertemperatur. Nach

ca. 1 Woche erfolgte die Bestimmung der Progesteronkonzentrationen.

3. Unterschiedliche Lagerungsdauer der Proben im gefrorenen Zustand (1 Woche, 1 Monat, 3 Monate): Nach der Sammlung wurden die Proben in 3 Teile geteilt und bei –20 °C gelagert, bis nach 1 Woche, 1 Monat und 3 Monaten die Hormonbestimmung erfolgte.
4. Einmaliges bzw. dreimaliges Gefrieren und Auftauen: Die eingefrorenen Proben wurden zur Hormonbestimmung aufgetaut, danach noch jeweils zweimal eingefroren bzw. aufgetaut bevor die zweite Hormonmessung erfolgte.

Da sich die Kotbeschaffenheit verschiedener Tierarten z. B. aufgrund unterschiedlicher Ernährungsweisen zum Teil stark unterscheidet, wurden 4 Tierarten, nämlich Rothschild-Giraffe (*Giraffa camelopardalis rothschildi*), Spitzmaulnashorn (*Diceros bicornis michaeli*), Damagazelle (*Gazella dama ruficollis*) und Schneesiege (*Oreamnos americanus*) in die Untersuchungen einbezogen. Innerhalb jeder Tierart standen jeweils 2 bis 3 Tiere zur Verfügung, wobei pro Parameter die Werte von 3 Tierarten herangezogen wurden.

Die Bestimmung des Progesterons im Kot erfolgte nach einer modifizierten Methode (MÖSTL, 1992; FRANK, 1997 und GOTTSCHALK, 1999) in drei Phasen (Einwiegen, Extrahieren, Radioimmunoassay):

Nach dem Auftauen und gründlichem Durchmischen der Proben wurden jeweils 0,5 g (zur Doppelbestimmung jeweils zweifach) mit 0,5 g Aluminiumoxid vermischt und zur Extraktion des Progesterons mit 0,7 ml Aqua bidest. und 4,8 ml Methanol p. a. versetzt, 30 min bei Zimmertemperatur horizontal geschüttelt und 15 min bei 1500 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 500 µl abpipettiert und mit 500 µl Aqua bidest. versetzt (= Extrakt).

100 µl dieses Extraktes wurden mit 400 µl Assaypuffer verdünnt und davon 100 µl im Radioimmunoassay eingesetzt. Anschließend wurden 100 µl verdünnte Tracerlösung ([1,2,6,7-³H]-Progesteron, Fa. Amersham) zugegeben. Abschließend erfolgte die Zugabe eines hormonspezifischen Antikörpers (Anti-Progesteron-3-Carboxylmethylloxim-BSA vom Kaninchen). Zur Erstellung der Eichreihe diente unmarkiertes Progesteron (Fa. Merck). Der Ansatz wurde 40 min bei 37 °C und 40 min bei 0 °C inkubiert. Die anschließende Trennung von freiem und antikörpergebundenem Hormon erfolgte durch Zugabe von 1 ml einer Dextran-Aktivkohle-Suspension, die freie Steroide bindet. Nach 10-minütigem Stehen im Eisbad und Zentrifugation (10 min bei 4000 U/min und 4 °C) wurde der Überstand in Messgläschen abgegossen und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint-Mini, Fa. Carl Roth GmbH) versetzt. Die Messung der gebundenen Aktivität erfolgte im Flüssigszintillationszähler 1409 der Fa. Wallac (Finnland), zur Ermittlung der Hormonkon-

zentration in den Proben diente die Auswertesoftware „Multicalc“ (gleiche Firma). Zur Assaykontrolle wurde immer die gleiche Kotprobe mitgeführt. Daraus wurden ein Interassaykoeffizient von 7,1 % (n = 8) und ein Intraassaykoeffizient von 4,3 % (n = 18) ermittelt. Die untere Nachweisgrenze im Assay betrug 4,4 pg. Dies entspricht einem Progesterongehalt von 2 ng/g Kot.

Die statistische Auswertung der Proben erfolgte mit einem nichtparametrischen Test nach Wilcoxon für gepaarte Stichproben. Zur statistischen Bearbeitung von Beobachtungsmaterial geringen Umfangs dienten die Empfehlungen von BIEBLER et al. (1984). Aufgrund des unbekanntenen Verteilungstyps und des geringen Umfangs der erhobenen Stichproben wurden der Median (= mittleres Quartil) und als Streuung der Beobachtungswerte das 1. bis 3. Quartil ermittelt. Mit diesem Verfahren konnten dadurch Probenwerte in einer Gruppe (Tierart) zusammengefasst werden, die nicht normalverteilt sind. Jede Gruppe bestand aus insgesamt 10 Proben von 2 bis 3 Tieren.

Ergebnisse

1. Trockenmasse des Kotes (in % der Frischmasse):

Der höchste Trockenmassegehalt wurde im Kot von Damagazellen ($62 \pm 4,4$; n = 8), der geringste im Kot von Spitzmaulnashörnern ($24 \pm 2,9$; n = 10) festgestellt. Bei den Rothschild-Giraffen lag der Trockenmassegehalt bei $42 \pm 3,7$ (n = 9). Auch bei Proben mit optisch unterschiedlich scheinendem Trocknungsgrad blieben die Werte innerhalb der einzelnen Tierarten relativ gleich.

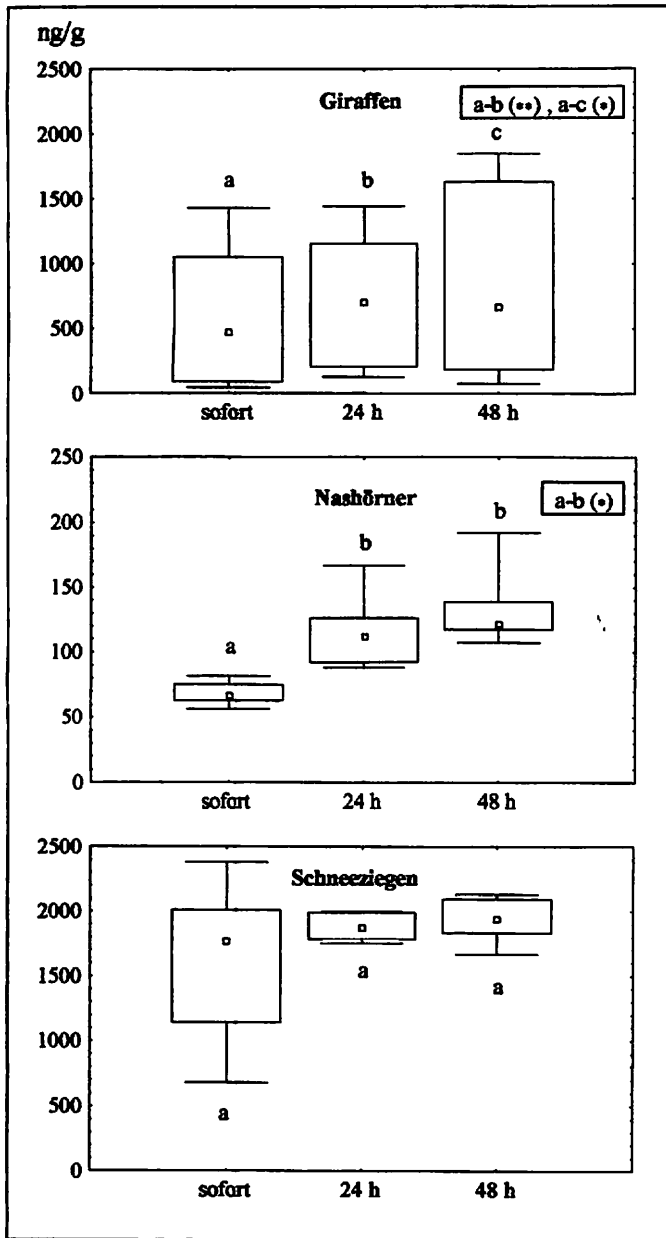
2. Veränderung des Einfrierzeitpunktes: In Abbildung 1 sind die Veränderungen des Hormonniveaus aufgrund von unterschiedlichen Einfrierzeitpunkten durch die Angabe der Mediane innerhalb der Untersuchungszeiträume sowie signifikante Unterschiede zwischen den 3 betrachteten Zeiträumen dargestellt.

In allen Fällen kommt es zu einer Erhöhung der Hormonkonzentrationen durch das Einfrieren der Probe nach 24-stündiger Lagerung, verglichen mit dem sofortigen Einfrieren. Diese Zunahme ist bei den untersuchten Proben signifikant für Giraffen und Nashörner.

Eine weitere Verlängerung der Aufbewahrung auf 48 h bis zum Einfrieren bewirkt dagegen nur noch geringe Veränderungen der Hormonwerte. Dies zeigt sich auch in dem Fehlen an signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Einfrierzeitpunkten bei allen 3 Tierarten.

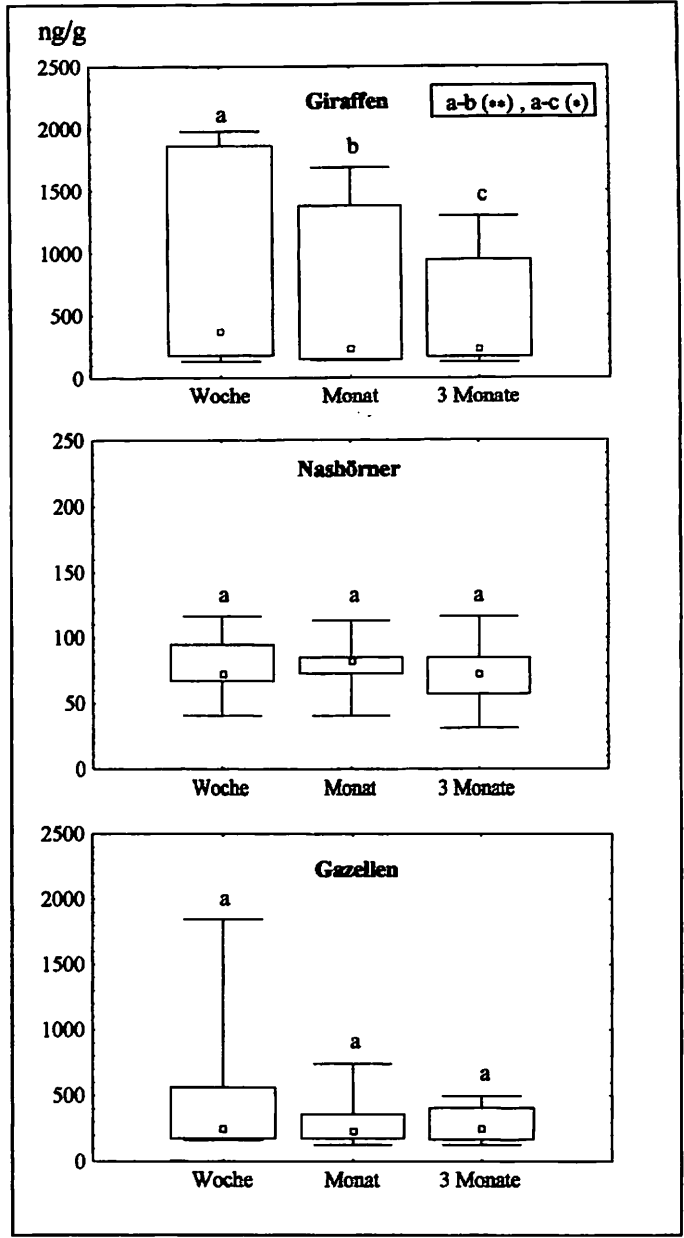
3. Unterschiedliche Lagerungsdauer der Proben im gefrorenen Zustand:

Der Einfluss einer Verlängerung der Lagerzeit bis zur Bestimmung auf die Hormonwerte ist in Abbildung 2 differenziert nach Tierarten ausgewiesen. Innerhalb der Tierarten wurde für jeden Messzeitraum der Median sowie das 1.-3. Quartil bestimmt. Zur Feststellung signifikanter



p ≤ 0,01 (**); p ≤ 0,05 (*)

Abb. 1: Progesteron-Konzentrationen (Median/1.-3. Quartil) in Abhängigkeit vom Einfrierzeitpunkt der Proben (Box-Whisker-Plot, jeweils n = 9).



p ≤ 0,01 (**); p ≤ 0,05 (*)

Abb. 2: Progesteron-Konzentrationen (Median/1.-3. Quartil) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der Proben (Box-Whisker-Plot, jeweils n = 10).

Unterschiede erfolgten Vergleiche zwischen den Progesteronkonzentrationen zu den 3 Untersuchungszeitpunkten. Durch eine verlängerte Lagerzeit kommt es bei den Kotproben der Giraffen zu einer Verringerung der Progesteronkonzentrationen. Zwischen dem 1. und dem 2. sowie zwischen dem 1. und 3. Untersuchungszeitpunkt sind die Unterschiede

signifikant. Im Gegensatz dazu ergeben sich bei den Kotproben der Nashörner und Gazellen keine signifikanten Veränderungen der Hormonwerte. Es war zunächst unklar, weshalb signifikante Veränderungen nur bei Giraffen auftraten. Um eine Erklärung dafür zu finden, wurde die bisherige Gruppe aus 10 Proben in 2 neue Gruppen mit je 5 hohen

bzw. niedrigen Progesteronkonzentrationen unterteilt (siehe Tab. 1). Dabei fiel auf, dass sich eine signifikante Verringerung der Progesteronkonzentration zwischen verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nur bei hohen Ausgangskonzentrationen ergab.

Tab. 1: Vergleich des Einflusses der unterschiedlichen Lagerungsdauer der Kotproben im gefrorenen Zustand auf ihren Progesteron Gehalt bei Rothschild-Giraffen mit verschiedenen Progesteron Ausgangskonzentrationen (Median; 1.-3. Quartil, Signifikanzen).

Progesteron-ausgangskonzentration	statistische Maßzahlen	Zeit 1 (1 Woche)	Zeit 2 (1 Monat)	Zeit 3 (3 Monate)	Signifikanzen zwischen den Zeitenräumen
hoch	n = 5 Median (1.-3. Quartil)	1915 (1737; 1973)	1423 (1351; 1576)	1121 (762; 1296)	1-2 p ≤ 0,01 1-3 p ≤ 0,01 2-3 nicht signifikant
niedrig	n = 5 Median (1.-3. Quartil)	170 (167; 236)	148 (142; 151)	161 (142; 176)	nicht signifikant

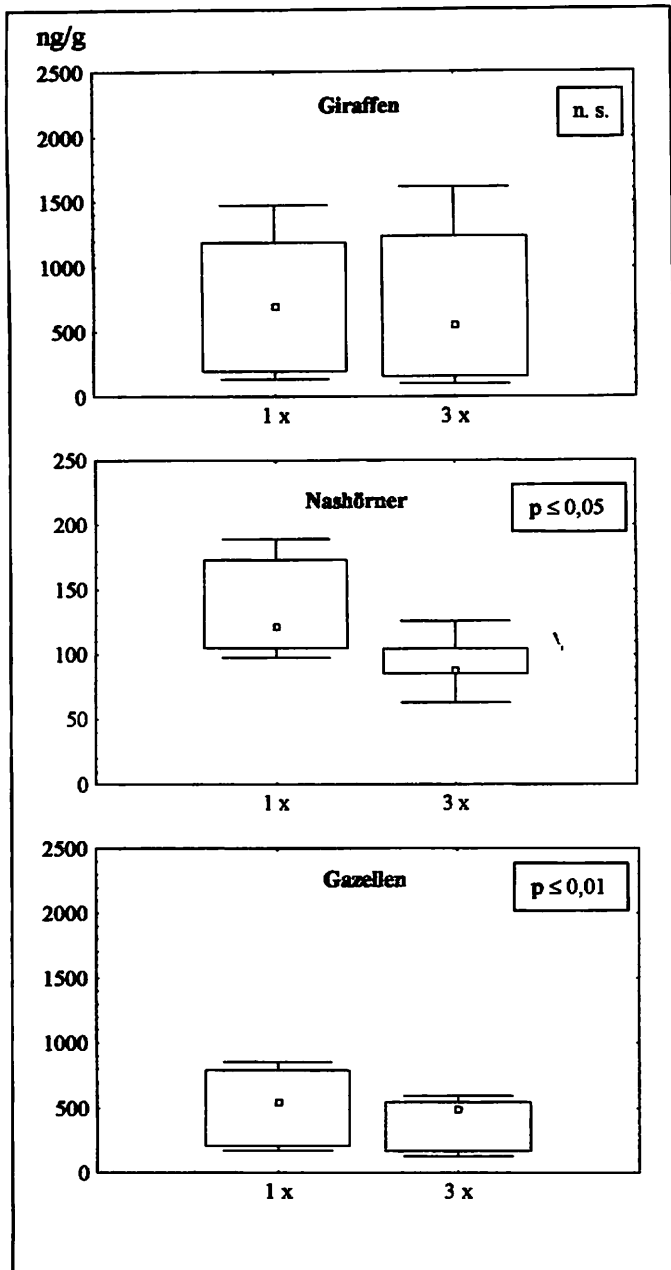


Abb. 3: Veränderung der Progesteron-Konzentrationen (Median/1.-3. Quartil) bei mehrmaligem Auftauen (Box-Whisker-Plot, jeweils n = 10).

4. Einmaliges bzw. dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Probe:

Durch mehrmaliges (hier dreimaliges) Auftauen kommt es unabhängig von der Tierart zu einem Absinken der Hormonkonzentrationen. Wie Abbildung 3 zeigt, ist der Unterschied sowohl für die Nashörner als auch für die Gazellen signifikant.

Diskussion

Bei den durchgeführten Untersuchungen sollten verschiedene Faktoren geprüft werden, die Einfluss auf die Progesteronwerte haben können, insbesondere der Wassergehalt des Probenmaterials, die Probengewinnung sowie das Einfrier- und Lagerungsmanagement.

Zur Erzielung aussagefähiger Ergebnisse ist die Homogenität des Probenmaterials ein entscheidender Faktor. Aufgrund einer gründlichen Zerkleinerung und Durchmischung der Proben, die vor jeder Bestim-

mung vorgenommen wurde, ist davon auszugehen, dass nahezu homogenes Probenmaterial zur Extraktion eingesetzt wurde. Für Vergleiche einzelner Kotproben untereinander ist eine genaue Kenntnis des Feuchtigkeitsgehaltes der Fäzes von großer Bedeutung, da die verschiedenen Steroidmetaboliten unterschiedliche Löslichkeitseigenschaften besitzen. Über den Wassergehalt von Kotproben der in der vorliegenden Studie einbezogenen Tierarten lagen allerdings keine Literaturberichte vor, so dass zunächst eine Trockenmassebestimmung erfolgte. Dazu wurden alle Proben der gleichen Prozedur unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich der Wassergehalt der Proben zwischen verschiedenen Tierarten stark unterscheidet, während er innerhalb einer Tierart jedoch nur geringen Schwankungen unterworfen ist. Unter diesen Voraussetzungen kann ein zusätzlicher Arbeitsschritt,

nämlich die Bestimmung der Trockenmasse mit anschließendem Bezug der Progesteronkonzentration auf diesen Wert, unterbleiben, da die Variabilität in der Trockenmasse in ähnlicher Größenordnung liegt wie die der angewandten Bestimmungsmethode (für die Ermittlung des Interassay-Koeffizienten wurde immer die gleiche Kotprobe mitgeführt, d. h. der Progesterongehalt dieser Probe in jedem Ansatz ermittelt). Der mögliche Verzicht auf die Ermittlung der Trockenmasse gilt somit nur bei Vergleichen innerhalb einer Tierart bzw. demselben Tier und muss bei weiteren Untersuchungen wieder erneut geprüft werden.

Obwohl Hormonstudien vielfach verwendet werden, um den Gesundheits- bzw. Reproduktionsstatus von Tieren zu untersuchen, liegen über die Stabilität von Hormonen in biologischen Materialien kaum Ergebnisse vor. Lediglich Vollblut- bzw.

Serumuntersuchungen wurden in dem Zusammenhang im geringen Maße durchgeführt (u. a. REIMERS et al., 1983; CHOI et al., 1989). Deshalb sind z. B. auch Temperatureinflüsse auf die Stabilität von Steroidhormonen im Kot bis jetzt nur lückenhaft untersucht worden. Eine Konzentrationserhöhung durch Veränderung des Einfrierzeitpunktes wurde bisher nur für Oestrogene beschrieben. In Verlaufsuntersuchungen zur Stabilität von Sexualhormonen im Kot von Kühen bei 20 °C (SCHLENKER et al., 1998) bzw. 5 °C und 30 °C (SCHLENKER et al., 1999) zeigten Progesteron und Oestrogene ein unterschiedliches Verhalten. Zwar fielen die Werte beider Hormone bei fortgeschrittener Lagerung ab, jedoch war dies bei Progesteron sehr viel schneller zu beobachten. Bei den Oestrogenen kam es dagegen sowohl bei 5 °C als auch bei 20 °C zunächst zu einem leichten Anstieg der Konzentrationen, erst danach fielen die Werte bis zum Untersuchungsende stetig ab. Daraus wurde abgeleitet, dass die Temperatur einen direkten Einfluss auf die Haltbarkeit der Steroide hat. Außerdem könnte eine Erhöhung der Temperatur zur Aktivierung mikrobiell-enzymatischer Vorgänge führen. Dies wurde dadurch unterstrichen, dass es bei verschiedenen Untersuchungstemperaturen zu einem unterschiedlichen pH-Wert-Verlauf kommt. Mikrobiell-enzymatische Prozesse könnten laut dieser Autoren auch die anfängliche Oestrogenwerterhöhung erklären. Einen Abfall der Progesteronkonzentrationen im Kot aufgrund verlängerter Lagerzeit bemerkten auch MASUNDA et al. (1999) bei Nkone Kühen (Lagerung bis 48 Stunden bei Raumtemperatur) und GLATZEL (1999) bei Rindern (Lagerung bis 4 Wochen bei 37 °C). Dies zeigte sich in der ersten Studie bei hohen Progesterongehalten stärker als bei niedrigen Ausgangswerten. Die in unseren Untersuchungen beobachtete Erhöhung der Progesteronkonzentrationen (signifikant bei Giraffen und Nashörnern) kann vermutlich damit begründet werden, dass es während der Lagerung bei Raumtemperatur weiter zu einer bakteriellen Freisetzung von freiem Progesteron kommt. Wahrscheinlich ist diese bakterielle Aktivität in den ersten 24 h höher als im Zeitraum bis 48 h, da zwischen diesen beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede mehr auftraten. Offenbar durchlaufen Steroide im Darm einen mikrobiellen Metabolismus, u. a. können vor allem anaerobe intestinale Bakterien metabolisch auf Steroidhormone sowie auf Sterole und Gallensäuren wirken (GROH et al., 1993). Ähnliche Untersuchungen wurden u. a. von WINTER et al. (1984 bzw. 1987) durchgeführt. Somit lässt sich eine Zunahme bestimmter Steroide im Kot durch mikrobiell-enzymatische Prozesse erklären.

Die Untersuchungen von SCHLENKER et al. (1999) zum Progesteronverlauf bei 5 °C und 30 °C Lagerungstemperatur zeigten eine deutlich höhere Stabilität bei 5 °C, so

dass anzunehmen ist, dass bei weiterer Absenkung der Lagerungstemperatur auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Stabilität des Progesterons weiter zunimmt. Bei Hormonuntersuchungen im Kot wird meistens davon ausgegangen, dass sich der Progesterongehalt durch Lagerung der Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht signifikant ändert (z. B. MASUNDA et al., 1999 und SCHLENKER et al., 1998). Dies konnte auch in unserer Studie für Proben mit niedrigem Progesteronniveau (Nashorn- und Gazellenproben) bestätigt werden. Im Gegensatz dazu kam es bei den Kotproben der Giraffen mit hohem Progesterongehalten zu einer signifikanten Verringerung der Konzentrationen. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass eine Verringerung des Progesterongehaltes weniger von der Tierart, sondern von der Progesteronausgangskonzentration abhängig ist. In den Untersuchungen von MASUNDA et al. (1999) für Progesteronkonzentrationen im Kot von Nkone-Kühen wurde festgestellt, dass hohe Ausgangskonzentrationen durch Lagerung bei Raumtemperatur stärker abfallen als niedrige Ausgangswerte. Dies wird mit einer Verschiebung der Anteile an bestimmten Progesteronmetaboliten in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur erklärt. Eine Verringerung der Hormonkonzentration bei Lagerung im gefrorenen Zustand ist evtl. darauf zurückzuführen, dass solche Prozesse in geringerem Maße auch noch bei Temperaturen um $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stattfinden. Da in unseren Untersuchungen der Probenumfang für die Giraffen mit hohem Progesteronniveau zu gering war (zum Zeitpunkt der Untersuchungen war leider kein weiteres trächtiges Tier, d. h. mit hohem Progesteronausgangswerten, innerhalb der untersuchten Tierarten verfügbar), kann eine Verallgemeinerung dieser Aussage noch nicht erfolgen. Dazu müsste in Folgestudien (z. B. bei trächtigen Kühen oder anderen Herbivoren) geprüft werden, ob sich diese Befunde bestätigen lassen.

Der Einfluss von mehrmaligem Auftauen von Blutplasma proben auf deren Progesterongehalt wurde von BAMBERG et al. (1983) untersucht. Dabei ergaben sich sowohl für Progesteron als auch für $17\text{ }\alpha\text{-Hydroxyprogesteron}$ keine signifikanten Veränderungen. Dies steht im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, in denen unabhängig von der Tierart ein Absinken der Hormonwerte (signifikant bei Nashörnern und Gazellen) durch mehrmaliges Auftauen der Kotproben gezeigt werden konnte. Vergleichbare Studien mit Kotproben sind nicht gefunden worden. Diese Konzentrationsabnahme ist evtl. damit zu erklären, dass während des Auftauens osmotische Prozesse zur Zerstörung vorhandener Bakterien beitragen. Dadurch könnten vermutlich intrazelluläre Enzyme freigesetzt werden, die zum Abbau des Progesterons führen. Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, dass die Kühlkette nach dem Einfrieren der Proben nicht mehr unterbrochen werden sollte.

Schließlich ist auch die Probengewinnung entscheidend. Beispielsweise lässt sich der genaue Zeitpunkt des Kotens nicht immer exakt erfassen. Dieser ist aber aufgrund der beschriebenen Veränderungen der Progesteronkonzentration (vor allem in den ersten 24 h) von Bedeutung. Daher sollte z. B. das Sammeln der Proben immer zur gleichen Zeit erfolgen.

Am Ende möchten die Autoren erneut darauf hinweisen, dass es sich bei den erzielten Ergebnissen um vorläufige Aussagen handelt, da der Probenumfang bei den verfügbaren Tieren zum Zeitpunkt der Studie nicht erweitert werden konnte. Deshalb sollten sich Nachfolgeuntersuchungen mit einer größeren Probenanzahl anschließen.

Literatur

BAMBERG, E., CHOI, H. S., MÖSTL, E., WURM, W. (1983): Metabolisierung von Steroidhormonen im Blut von Rindern. 1st Congr. of the Intern. Soc. of Anim. Clin. Biochem., 321-329. – **BIEBLER, K. E., JÄGER, B., BIBBY, J.** (1984): Einige Anregungen zur statistischen Bearbeitung von Beobachtungsmaterial geringen Umfangs. Z. ärztl. Fortbild. 78, 243-247. – **CHOI, H. S., MÖSTL, E., BAMBERG, E.** (1989): Conversion of steroids in bovine blood in vitro. Theriogenology 31(3), 571-581. – **FRANK, S.** (1997): Haltung und Krankheiten des Anoa in zoologischen Gärten unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzung. Diss. Vet. med. Leipzig. – **GLATZEL, P. S.** (1999): Zur Aussagefähigkeit von Steroidhormonen im Kot von Rindern für deren Ovarfunktionen. Tierärztl. Praxis 27 (G), 36-40. – **GOTTSCHALK, J.** (1999): Validierte Methode zur Bestimmung von Progesteron und $17\text{ }\beta\text{-Oestradiol}$. Labormitteilungen an das Institut für Tierarzneimittel Berlin GmbH. – **GROH, H., SCHADE, K., HÖR-HOLD-SCHUBERT, C.** (1993): Steroid metabolism with intestinal microorganisms. J. Basic Microbiol. 33, 59-72. – **HEISTERMANN, M., AGIL, M., BÜTHE, A., HODGES, J. K.** (1998): Metabolism and excretion of oestradiol- 17β and progesterone in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). Anim. Reprod. Sci. 53, 157-172. – **HOFFMANN, B., EVERS, P.** (1986): Anabolic agents with sex hormone-like activities: Problems of residues. In: ANDRE, G., RICO, E. (Hrsg.): Drug Residues in Animals. Academic Press, New York, S. 111-146. – **JENSEN, T. K., TOPPARI, J., KEIDING, N., SKAK-KEBAEK, N. E.** (1995): Do environmental estrogens contribute to the decline in male productive health? Clin. Chem. 41, 1896-1901. – **KIRKPATRICK, J. F., GUNDERMUTH, D. F., FLAGAN, R. L., MC CARTHY, J. C., LASLEY, B. L.** (1993): Remote monitoring of ovulation and pregnancy of yellowstone bison. J. Wildl. Manage. 57(2), 407-412. – **MASUNDA, B., MUTISI, C., HAMUDIKUWANDA, H., AGUMBAAH, J. G. O.** (1999): The concentration of faecal progestins during the oe-

strous cycle in Nkone cows and the effect of duration of storage of faecal samples at room temperature on faecal progestin levels. Trop. Anim. Health Prod. 31, 373-381. – **MÖSTL, E.** (1992): Measuring steroids in faeces of mammals to monitor the reproductive status: success and disappointment. Proceed. of the 1st Intern. Symp. on Faecal Steroid Monitor. in Zoo Animals, Rotterdam, 7-9. – **MÖSTL, E., DOBRETSBERGER, A., PALME, R.** (1997): Östrogenkonzentration im Stallmist trächtiger Rinder. Wien. Tierärztl. Mschr. 84, 140-143. – **REIMERS, T. J., MCCANN, J. P., COWAN, R. G.** (1983): Effects of storage times and temperatures on T3, T4, LH, prolactin, insulin, cortisol and progesterone concentrations in blood samples from cows. J. Anim. Sci. 57(3), 683-691. – **SCHLENKER, G., BIRKELBACH, C., GLATZEL, P. S.** (1999): Verlaufsuntersuchungen zum Temperatureinfluss auf die Stabilität von Sexualsteroiden im Kot von Kühen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 459-464. – **SCHLENKER, G., MÜLLER, W., GLATZEL, P. S.** (1998): Verlaufsuntersuchungen zur Stabilität von Sexualsteroiden im Kot von Kühen über 12 Wochen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 111, 248-252. – **SCHWARZENBERGER, F., FRANCKE, R., GÖLTENBOTH, R.** (1993): Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrous cycle and pregnancy in the Black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). J. Reprod. Fertil. 98, 285-291. – **TURAN, A.** (1995): Exkretion natürlicher und synthetischer Östrogene und ihrer Metabolite: Vorkommen und Verhalten im Wasser. Fachgespräch Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. Umweltbundesamt, Berlin, 65/95, 16-21. – **WINTER, J., BOKKENHEUSER, V. D.** (1987): Bacterial metabolism of natural and synthetic sex hormones undergoing enterohepatic circulation. J. Steroid Biochem. 27, 1145-1149. – **WINTER, J., O'ROURKE-LOCASCIO, S., BOKKENHEUSER, V. D., MOSBACH, E. H., COHEN, B. I.** (1984): Reduction of 17-keto steroids by anaerobic microorganisms isolated from human fecal flora. Biochem. Biophys. Acta 795, 208-211.

Korrespondenzadresse:

Gaby NEUMANN, Veterinär-Physiol.-Chem. Institut, An den Tierkliniken 43, 04103 Leipzig.
vet99kzw@studserv.uni-leipzig.de