

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

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

**Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva<sup>®</sup>)  
beim männlichen pubertären Kalb**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Grégoire Theubet**

Tierarzt

von Fahy/JU

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. F. Janett, Referent

PD Dr. N. Borel, Korreferentin

Zürich 2010



# **Wirkung einer Impfung gegen GnRH (Bopriva®) beim männlichen pubertären Kalb**

G. Theubet<sup>1</sup>, R. Thun<sup>1</sup>, M. Hilbe<sup>2</sup>, F. Janett<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Fortpflanzungsmedizin und <sup>2</sup>Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich

## **Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Auswirkungen einer neuen, speziell für das Rind entwickelten anti-GnRH-Vakzine (Bopriva®, Pfizer Animal Health, Australien), zu prüfen. Insgesamt standen 12 peripubertäre Stierkälber im Alter zwischen 6 und 8 Monaten zur Verfügung, 2 Tiere dienten als Kontrolle. Die Kälber wurden zweimal im Abstand von 4 Wochen mit 1 ml Bopriva® (400µg GnRH-Protein-Konjugat) subkutan am Hals geimpft und während insgesamt 36 Wochen beobachtet. In wöchentlichen Abständen wurden der Skrotalumfang aller Kälber gemessen sowie Blutproben zur Bestimmung von Testosteron und GnRH-Antikörper gewonnen. Drei Monate nach der 2. Injektion (Booster) wurden 5 Kälber geschlachtet und die Hoden histologisch untersucht. Die GnRH-Antikörpertiter stiegen nach der 2. Impfung rasch an und erreichten 3 Wochen später maximale Werte. Die Testosteronkonzentrationen fielen eine Woche nach der Boosterinjektion auf Werte unterhalb 0.5 ng/ml Serum ab und blieben während mindestens 10 Wochen auf diesem tiefen Niveau. Der erneute Testosteronanstieg erfolgte individuell innerhalb von 11-23 Wochen nach der Boosterinjektion. Die Hodenhistologie zeigte bei den geimpften Tieren eine unvollständige Spermatogenese mit fehlender oder stark reduzierter Bildung von Spermatiden sowie eine deutliche Abnahme der Samenkanälchen-Durchmesser. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass bei peripubertären Kälbern eine 2-malige Impfung mit der neuen bovinen anti-GnRH-Vakzine im Abstand von 4 Wochen das Hodenwachstum und die Testosteronsekretion während mindestens 10 Wochen zu hemmen vermag.

Schlüsselwörter: Kalb, Kastration, GnRH-Vakzine, Testosteron, Pubertät

## **Effect of vaccination against GnRH (Bopriva®) in the male pubertal calf**

The objective of this experiment was to investigate the effectiveness of a newly developed bovine anti-GnRH vaccine (Bopriva®, Pfizer Animal Health, Australia). A total of 12 peripubertal bull calves aged between 6 and 8 months were used, 2 randomly selected animals served as controls. Animals were vaccinated twice at an interval of 4 weeks with 1 ml of Bopriva® (400 µg GnRH-protein-conjugate) subcutaneously in the neck and observed for a total of 36 weeks. Scrotal circumference was measured every week and blood samples were also taken weekly for the determination of testosterone and GnRH antibodies. Three months after the second injection (booster), 5 animals were slaughtered and their testes histologically examined. GnRH antibody titers rapidly began to rise after the second vaccination and reached peak values 3 weeks later. Testosterone concentrations decreased to values below 0.5 ng/ml serum 1 week after the booster and remained at this low level for at least 10 weeks. The following increase of testosterone occurred individually within 11 and 23 weeks after the booster injection. Histological examination of testes in vaccinated animals showed an incomplete spermatogenesis with impaired or no production of spermatids and a reduced diameter of seminiferous tubules. From our results we conclude that in the peripubertal bull two injections with the new bovine anti-GnRH vaccine 4 weeks apart is effective in suppressing testicular growth and testosterone secretion during at least 10 weeks after the booster injection.

Keywords: calf, castration, GnRH-vaccine, testosterone, puberty

## **Effet d'une vaccination contre la GnRH (Bopriva®) chez le veau mâle peri-pubère**

L'objectif de cette expérience était de démontrer l'efficacité d'un nouveau vaccin anti-GnRH Bopriva® (Pfizer Animal Health, Australia) élaboré spécifiquement pour le bovin. Au total, 12 veaux mâles âgés de 6 à 8 mois ont été inclus dans l'expérience. Deux animaux ont été choisis comme contrôles. Les animaux ont été vaccinés avec 1 ml du vaccin (400 mg conjugué GnRH-protéine) deux fois dans un intervalle de 4 semaines par voie sous-cutanée dans le cou

et ont été observés pendant 36 semaines. La circonférence scrotale a été mesurée et les échantillons sanguins utiles à la détermination de concentration de la testostérone ainsi que du titre de l'anticorps anti-GnRH ont été collectés chaque semaine. Trois mois après la deuxième injection, 5 veaux vaccinés ont été abattus et une analyse histologique des testicules a été entreprise. Les titres d'anticorps anti-GnRH ont augmenté rapidement suite à la deuxième injection, les valeurs maximales ayant été atteintes 3 semaines plus tard. Les concentrations de la testostérone ont diminué une semaine après l'injection de rappel atteignant des valeurs en dessous de 0.5 ng/ml de sérum et sont restées en dessous de ce niveau pendant au moins 10 semaines. Une nouvelle augmentation de la concentration de la testostérone est observée individuellement entre les semaines 11 et 23 après l'injection de rappel. Les analyses histologiques des testicules ont montré une spermatogénèse incomplète avec une absence ou un fort manque de formation de spermatides, ainsi qu'une réduction du diamètre des tubules séminifères chez les animaux vaccinés. Nos résultats prouvent que le vaccin anti-GnRH Bopriva<sup>®</sup> inhibe la sécrétion de la testostérone ainsi que la croissance des testicules pendant au moins 10 semaines après une première injection et une injection de rappel 4 semaines plus tard chez le veau péri-pubère.

## Einleitung

Die Kastration von Stierkälbern ist eine seit vielen Jahrhunderten durchgeführte Methode zur Funktionsausschaltung der Hoden. Beim Rind wird dieser Eingriff in erster Linie zur besseren Handhabung der männlichen Tiere durchgeführt. In der Schweiz werden Stierkälber vor allem in Mutterkuhbetrieben kastriert (Boesch et al., 2006). Seit der Gründung der Schweizerischen Vereinigung für Ammen- und Mutterkuhhaltung (SVAMH, heute Mutterkuh Schweiz) im Jahre 1977, hat diese tierfreundliche Haltungsform stetig zugenommen und stellt heute eine anerkannte Produktionsform von Fleisch (Natura Beef) dar. Mutterkuh Schweiz zählt heute über 4800 Mitglieder, die zusammen 78'000 Mutterkühe und damit 12% des schweizerischen Rindviehbestandes halten. Bei relativ kleinen Herden (mehr als 90% der Mutterkuhherden zählen maximal 30 Muttertiere) ist eine Trennung der Herde nach Geschlecht der Kälber unwirtschaftlich. Stierkälber werden daher häufig schon in der ersten Lebenswoche kastriert, um Unruhe und unerwünschte Trächtigkeiten bei Anwesenheit brünstiger Tiere zu vermeiden (Steiner, 2008). Zusätzlich sollen kastrierte Tiere auch eine bessere Fleischqualität zeigen, da Ochsen eine stärkere Marmorierung als Stiere aufweisen (Seideman et al., 1989).

Zur Kastration des Kalbes stehen heute drei Methoden zur Verfügung, der Gummiring, die Burdizzo-Zange und die chirurgische Kastration. Diese Eingriffe dürfen grundsätzlich nur unter Schmerzausschaltung vorgenommen werden (Art. 64 Tierschutzverordnung), wobei alle Vor- und Nachteile aufweisen. Bei der Kastration mittels Gummiring wird die Durchblutung des Hodensacks mit Inhalt (Hoden und Nebenhoden) unterbunden, was zu Ischämie und allmählicher Nekrose der erwähnten Strukturen führt. Die Nervenversorgung geht bei dieser Methode nur langsam verloren und es konnte gezeigt werden (Thüer et al., 2007), dass die Kälber noch bis zu 4 Wochen nach Applikation des Gummiringes Schmerzen empfinden. Vorteile dieser Kastrationsmethode sind die niedrigen Kosten und die einfache technische Durchführung. Bei der Kastration mittels Burdizzo-Zange wird jeder Samenstrang einzeln zweimal während einer Minute oder der Hodensackhals auf seiner ganzen Breite (sog. Quetsch-Kastration) mit einer Burdizzo-Zange während zwei Minuten gequetscht (Thüer et al., 2007). Das Quetschen führt ebenfalls zu Ischämie und Nekrose von Hodensack, Hoden und Nebenhoden. Histologische Untersuchungen der Hoden haben gezeigt (Stoffel et al., 2009), dass bei Anwendung der Burdizzo-Zange trotz starker Gewebsatrophie noch funktionelles Hodengewebe vorhanden war und somit unerwünschtes Sexualverhalten und eine spätere Fruchtbarkeit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können. Wie bei der Kastration mittels Gummiring stehen auch hier die niedrigen Kosten und die einfache

Durchführung als Vorteile im Vordergrund. Bei der chirurgischen Kastration werden nach Durchtrennen der Skrotalhaut und Eröffnen des Processus vaginalis beide Hoden entfernt (Gonadektomie). Die Gonadektomie wird eher selten und ausschliesslich durch den Tierarzt durchgeführt. Nachteile dieser Methode sind die hohen Kosten und ein erhöhtes Komplikationsrisiko.

Als vielversprechende, tierschonende und praktikable Alternative zu den oben erwähnten Kastrationsmethoden gelten immunologische Verfahren, deren Strategie darin besteht, die Hodenfunktion durch Immunisierung gegen verschiedene Reproduktionshormone wie GnRH, LH, FSH oder Testosteron zu unterdrücken (D'Occhio, 1993). Da GnRH in der hypothalamisch-hypophysären-gonadalen Regulation eine zentrale Stellung einnimmt, wurden erste Impfversuche gegen GnRH bei verschiedenen Tierarten, wie Kaninchen (Arimura et al., 1973), Rind (Robertson et al., 1979), Schaf (Lincoln und Frazer, 1979), Schwein (Falvo et al., 1986) und Pferd (Schanbacher und Pratt, 1985) bereits vor mehr als 30 Jahren durchgeführt. Das Prinzip der Immunokastration beruht auf einer aktiven Immunisierung gegen körpereigenes GnRH, in deren Folge das endogene GnRH an die gebildeten Antikörper gebunden wird. Dieser Zustand führt zur Hemmung der LH- und FSH-Sekretion und dadurch zur Ausschaltung der Hodenfunktion. Zur Erhöhung der immunogenen Eigenschaft muss das kleine aus 10 Aminosäuren bestehende GnRH-Molekül (Hapten) vorgängig an ein grosses artfremdes Trägerprotein gekoppelt werden. Gestützt auf frühere Ergebnisse mit verschiedenen GnRH-Protein-Konjugaten (Thompson, 2000) konnte die Wirksamkeit von GnRH-Vakzinen in den letzten Jahren gesteigert werden, wobei es vor allem darum ging, die immunogenen Eigenschaften (Struktur von Trägerprotein, GnRH und Adjuvans) des Impfstoffs zu optimieren und gleichzeitig die Nebenwirkungen zu minimieren (Beekman et al., 1999).

Tierartspezifische Vakzinen sind seit 1998 für das Schwein (Improvac<sup>®</sup>, Pfizer Animal Health) und seit 2006 für das Pferd (Equity<sup>®</sup>, Pfizer Animal Health) auf dem Markt erhältlich. In der Schweiz wurde Improvac für den Gebrauch beim Schwein Anfang 2007 registriert. Über die Anwendung, Wirksamkeit und Zuverlässigkeit der beiden Vakzinen haben wir in den letzten Jahren verschiedene Untersuchungen beim Schwein (Jaros et al., 2005; Fuchs et al. 2009), Schaf (Janett et al., 2003, 2009) und Pferd (Imboden et al., 2006; Janett et al., 2009) durchgeführt. Analog zu Improvac<sup>®</sup> wurde erst kürzlich auch eine speziell für das Rind konzipierte GnRH-Vakzine (Bopriva<sup>®</sup>, Pfizer Animal Health, Australia) entwickelt, die in

Australien, Argentinien, Uruguay, Kanada und Kolumbien bereits auf dem Markt erhältlich ist.

Aufgrund der beschriebenen Nachteile der drei eingangs genannten Kastrationsmethoden (Gummiring: Schmerzhaftigkeit; Burdizzo: Schmerzhaftigkeit, Zuverlässigkeit; Chirurgie: Aufwand, Kosten, Komplikationen) sowie aufgrund der Tatsache, dass Untersuchungen mit der neuen bovinen Vakzine bei pubertären Kälbern fehlen, bestand das Ziel der vorliegenden Studie darin, Verträglichkeit und Wirksamkeit von Bopriva® näher abzuklären. Insbesondere interessierte uns der Verlauf der GnRH-Antikörpertiter im Blut nach der Impfung sowie die Auswirkungen auf die Testosteronsekretion, den Skrotalumfang und die Spermatogenese.

## **Tiere, Material und Methoden**

### **Tiere**

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 12 peripubertäre Kälber im Alter zwischen 6 und 8 Monaten zur Verfügung. Acht Tiere gehörten Milchrassen (Braunvieh, Fleckvieh, Holstein Friesian) und 4 Tiere Fleischrassen (Charolais, Simmental x Charolais) an. Die Kälber wurden angebunden gehalten und hatten regelmässigen Auslauf. Zusätzlich zur Grasfütterung erhielten alle Kälber auch Heu und Maispellets.

### **Versuchsanordnung**

Die Untersuchungen dauerten 36 Wochen von September 2007 bis Mai 2008. In den Wochen 0 und 4 wurden 10 Kälber mit je 1 ml Bopriva® (400µg GnRH-Konjugat, Pfizer Animal Health, Australia) seitlich am Hals s.c. geimpft. Die beiden Kontrolltiere erhielten jeweils die gleiche Menge physiologischer NaCl. Zur Überprüfung der Verträglichkeit der Impfung wurde bei allen Kälbern während einer Woche nach der Impfung das Allgemeinbefinden registriert, die Körpertemperatur gemessen sowie die lokale Impfreaktion (Schwellung, Schmerz und Wärme) beurteilt. Bei allen Tieren erfolgten wöchentliche Blutentnahmen aus der Vena jugularis und gleichzeitig Messungen des Skrotalumfanges mittels Messband (Reliabull®, Lene Manufacturing, Denver, CO, USA). Die Blutproben wurden zur Gerinnung 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, anschliessend zentrifugiert (4000 x g, 10 Min.) und bis zur Analyse bei -18°C gelagert. In der Woche 17 wurden 5 geimpfte Kälber vorzeitig geschlachtet und die Hoden histologisch untersucht. Die Schlachtung der beiden Kontrolltiere erfolgte etwas später (Woche 27). Von den 5 verbleibenden geimpften



Jungstieren wurden gegen Ende des Versuches (Wochen 32-36) mittels künstlicher Scheide Ejakulate gewonnen und die Samenqualität untersucht.

### **Antikörperbestimmung**

Die Messung der Antikörpertiter gegen GnRH wurde mittels Enzymimmunoassay (DELFI, 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 biotinisiertem GnRH Peptid in Puffer (50mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20, 20 µM 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 gemessen. Aufeinanderfolgende Standardverdünnungen bis zu einem Titer von 1/409'600 dienten als Referenzproben. Serum von einem nicht geimpften Rind diente als negative Kontrolle.

### **Testosteronbestimmung**

Die Testosteronbestimmung erfolgte mittels Immunoassay (TESTO-EASIA KAP1701, BioSource Europe S.A, Nivelles, Belgium) mit einer Sensitivität von 0.05 ng Testosteron pro ml Serum. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers war 100% für Testosteron, 0.61% für 5- $\alpha$ -Dihydrotestosteron, 0.76% für Androstenedion, 0.023% für Östrogene und 0.035% für Progesteron. Die Intra- sowie Interassay Variationskoeffizienten betrugen 6.3% bzw. 8.3%.

### **Histologie und Beurteilung der Spermatogeneseaktivität**

Nach Schlachtung der 5 geimpften Kälber wurde jeweils Gewebe von beiden Hoden freipräpariert, in Bouin-Lösung während 18 Stunden fixiert und anschliessend sorgfältig gewaschen und in 4 % Formalin aufbewahrt. Das in Paraffin eingebettete Hodengewebe (Mitte und Randgebiet) wurde zur mikroskopischen Beurteilung mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt. Zur sicheren Unterscheidung von Spermatozyten und runden Spermatiden (Abd-Elmaksoud, 2005) wurden die Gewebsschnitte mittels Periodic-Acid-Schiff (PAS) gefärbt. Mit dieser Methode erscheinen die Proteoglykane in den Spermatiden als purpur gefärbte Granula und die Zellkerne werden durch die Gegenfärbung blau gefärbt.

Die Spermatogeneseaktivität wurde aufgrund von Anwesenheit und Verteilung verschiedener Zellentwicklungsstadien in den mit PAS angefärbten Samenkanälchen in 10 Stufen (Tab. 1) eingeteilt (Turkstra, et al., 2005). Dabei kamen je 25 Anschnitte von der Mitte und vom Rand beider Hoden zur Auswertung. Nach dem gleichen Auswahlverfahren wurde bei 100 mit HE gefärbten Samenkanälchen auch der Durchmesser bestimmt. Für die Morphometrie diente eine auf dem Mikroskop (Olympus BX50, Olympus Schweiz, Volketswil) fixierte Kamera (Olympus XC30, Olympus Schweiz, Volketswil) und die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm analySIS docu 5.0 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Olympus Schweiz, Volketswil).

Tabelle 1: Kriterien zur Beurteilung der Spermatogeneseaktivität.

Stufe	Kriterien
10	Vollständige Spermatogenese mit vielen Spermatozoen. Das Keimepithel ist in regelmässiger Dicke organisiert und zeigt ein offenes Lumen, oder Spermatogenesestadium I mit zahlreichen runden Spermatiden
9	Viele Spermatozoen vorhanden aber schlecht organisiertes Keimepithel mit deutlichen Zellhaufen im Lumen oder Obliteration des Lumens
8	Nur wenige Spermatozoen (<5-10) im tubulären Querschnitt vorhanden
7	Keine Spermatozoen aber viele Spermatiden vorhanden
6	Keine Spermatozoen und nur wenige Spermatiden (<5-10) vorhanden
5	Weder Spermatozoen noch Spermatiden, jedoch zahlreiche Spermatozyten vorhanden
4	Nur wenige Spermatozyten (<5) und keine Spermatiden oder Spermatozoen vorhanden
3	Ausschliesslich Spermatogonien vorhanden
2	Keine Keimzellen jedoch Sertolizellen vorhanden
1	Keine Zellen im Tubulusquerschnitt sichtbar

## **Bestimmung der Samenqualität**

Die spermatologische Untersuchung der gegen Versuchsende gewonnen Ejakulate wurden im Andrologielabor, Universität Zürich, durchgeführt. Insbesondere wurden die Parameter Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl und Spermienmotilität bestimmt.

## **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 Testosteronkonzentration und den Antikörpertiter in den ersten 17 Versuchswochen wurde mit einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen geprüft. Mittelwertsvergleiche erfolgten mittels ungepaartem *t*-Test. Die Signifikanzschwelle wurde auf 0.05 festgelegt. Als Beginn der Impfwirkung wurde der Zeitpunkt bezeichnet, ab dem in mindestens drei aufeinanderfolgenden Wochen die Testosteronkonzentration  $<0.5\text{ng/ml}$  Serum war und die Dauer der Impfwirkung wurde als Periode mit anhaltend tiefen Testosteronwerten ( $<0.5\text{ ng/ml}$ ) definiert. Der Impfeffekt wurde als reversibel bezeichnet, wenn erneut Testosteronwerte  $>0.5\text{ ng/ml}$  Serum gemessen wurden.

## **Ergebnisse**

### **Verträglichkeit der Impfung**

Alle geimpften Kälber zeigten 1-3 Tage nach der 1. wie auch nach der 2. Impfung bei unauffälligem Allgemeinzustand einen temporären, individuell unterschiedlichen Anstieg der Körpertemperatur zwischen  $39.0\text{-}41.0^{\circ}\text{C}$ . Bei den beiden Kontrolltieren schwankte die Körpertemperatur im gleichen Zeitraum zwischen  $38.5^{\circ}\text{C}$  und  $39.3^{\circ}\text{C}$ . Nach beiden Impfungen entwickelte sich bei allen Kälbern an der Injektionsstelle eine unterschiedlich grosse zum Teil druckdolente Hautschwellung die sich innerhalb von 2 bis 3 Wochen wieder vollständig zurückbildete.

### **Verlauf von Antikörpertiter und Testosteron**

Aus der multivariaten Varianzanalyse (Tab. 2) geht hervor, dass die Gruppe sowie der Zeitpunkt der Blutgewinnung und die Interaktion von Gruppe und Zeitpunkt einen signifikanten ( $P<0.05$ ) Einfluss auf die Antikörpertiter und die Testosteronwerte im Blut hatte.

Tabelle 2: Einfluss von Gruppe und Zeitpunkt der Blutentnahme sowie Interaktion von Gruppe und Zeitpunkt auf den Antikörpertiter und die Testosteronkonzentration.

Parameter	Gruppe <i>P</i>	Zeitpunkt <i>P</i>	Interaktion <i>P</i>
Testosteron	0.0025*	0.0004*	<0.0001*
Anti-GnRH Titer	0.0065*	<0.0001*	<0.0001*

\*Signifikant ( $P < 0.05$ )

In Abbildung 1 ist der Verlauf der durchschnittlichen GnRH-Antikörpertiter bei allen Kälbern während einer Zeitspanne von 17 Wochen dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass bei den geimpften Kälbern die anti-GnRH Titer innerhalb von 3 Wochen nach der 2. Impfung auf Maximalwerte angestiegen sind, anschliessend kontinuierlich abnahmen und nach 10 Wochen wieder Ausgangswerte erreichten. Bei den Kontrolltieren blieben die Titer stets tief. Signifikante ( $P < 0.05$ ) Gruppenunterschiede waren in den Wochen 6-13 vorhanden.

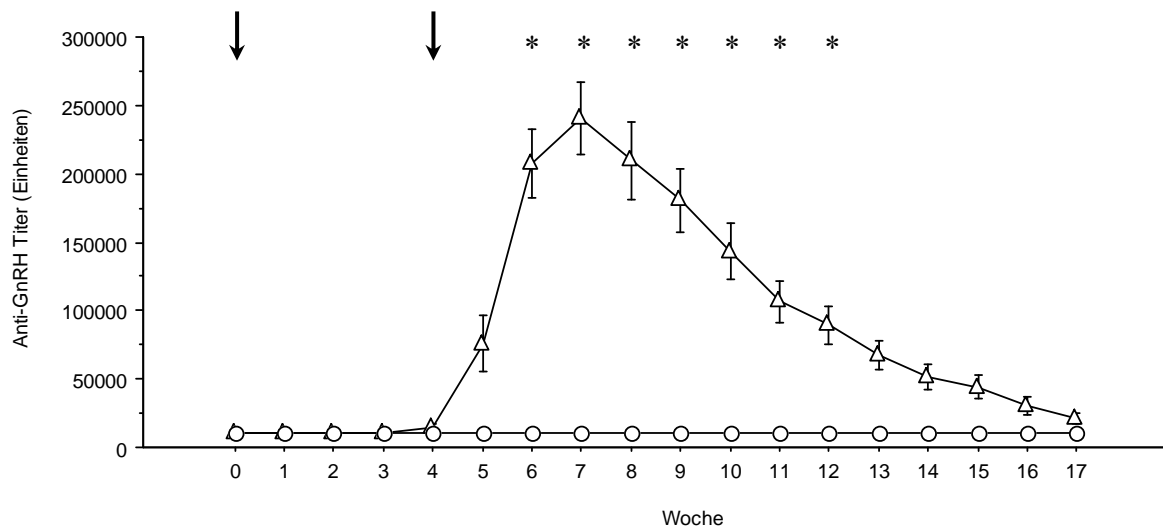


Abbildung 1: Durchschnittlicher ( $m \pm \text{SEM}$ ) anti-GnRH Titer bei Stierkälbern mit ( $\triangle$ ,  $n=10$ ) und ohne ( $\circ$ ,  $n=2$ ) Bopriva<sup>®</sup>. Pfeile stellen die Injektionen dar. \*Signifikanter Gruppenunterschied ( $P < 0.05$ , ungepaarter t-Test).

Der durchschnittliche Testosteronverlauf bei allen Kälbern mit und ohne Bopriva® während der ersten 17 Wochen ist in Abbildung 2 dargestellt. Bei den geimpften Tieren fiel das Testosteron eine Woche nach der 2. Impfung auf Werte  $<0.5$  ng/ml Serum ab und blieb während weiteren 13 Wochen auf diesem tiefen Niveau. Die durchschnittlichen Testosteronkonzentrationen der Kontrolltiere schwankten während der ganzen Zeitspanne von 17 Wochen zwischen  $0.7 \pm 0.03$  ng/ml (Woche 0) und  $14.2 \pm 11.82$  ng/ml (Woche 15) Serum. Signifikante ( $P < 0.05$ ) Gruppenunterschiede waren in den Wochen 5-16 vorhanden.

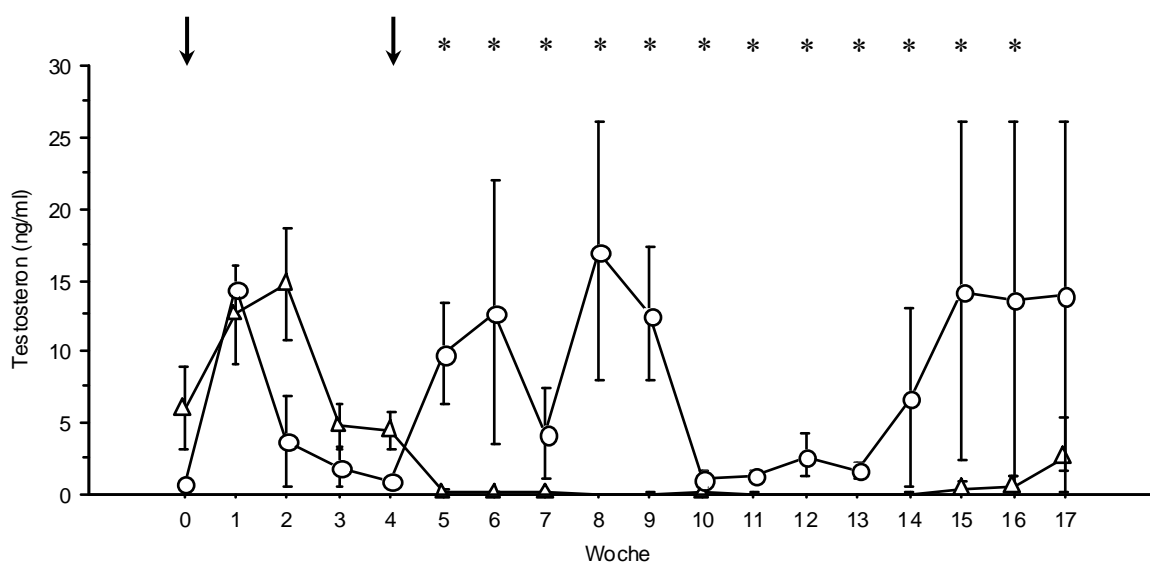


Abbildung 2: Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) Testosteronkonzentrationen im Blut bei Stierkälbern mit ( $\Delta$ ,  $n=10$ ) und ohne ( $\circ$ ,  $n=2$ ) Bopriva®. Pfeile stellen die Injektionen dar. \*Signifikanter Gruppenunterschied ( $P < 0.05$ , ungepaarter t-Test).

Die individuellen Testosteronverläufe der geimpften Kälber zeigen, dass die einzelnen Werte zwischen der 1. und der 2. Impfung zwischen 0.1 ng/ml und 26.0 ng/ml Serum schwankten und erst eine Woche nach der 2. Impfung unterhalb 0.5 ng/ml abfielen (Abb. 3). Ein erneuter Anstieg von Testosteron auf Werte  $>0.5$  ng/ml Serum erfolgte individuell in den Wochen 15, 18, 21, 23, 24 und 27. Die Dauer der Impfwirkung betrug bei diesen Tieren 10, 13, 16, 18, 19 und 22 Wochen.

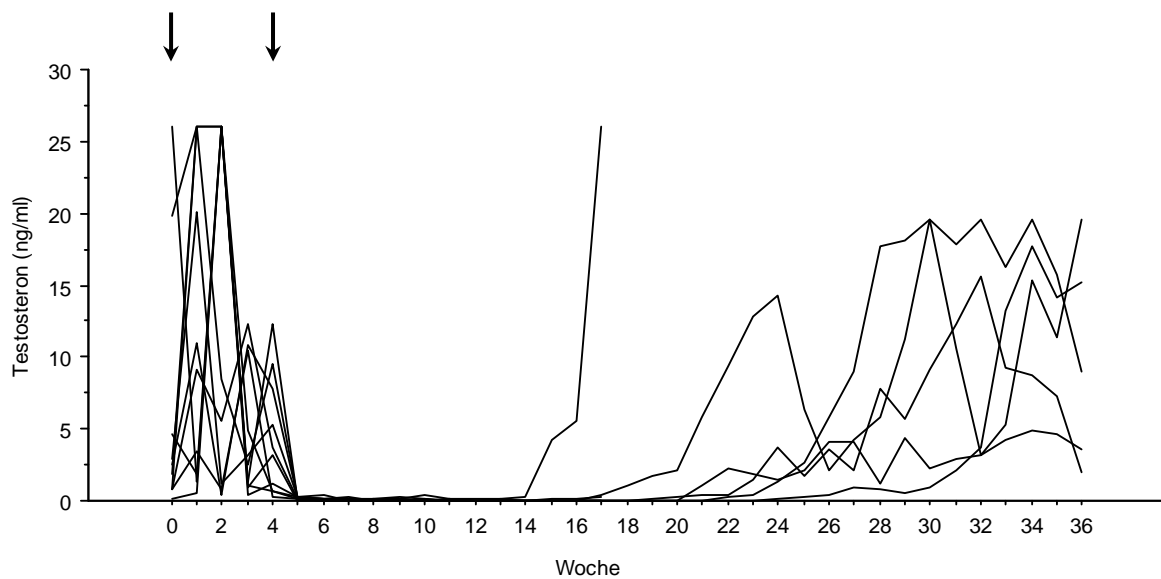


Abbildung 3: Individueller Testosteronverlauf bei 10 mit Bopriva<sup>®</sup> geimpften (↓) Stierkälbern (ab Woche 17, n=5).

### Veränderung des Skrotalumfanges

Der Verlauf des Skrotalumfanges bei geimpften und nicht geimpften Kälbern ist in Abbildung 4 dargestellt. Zu Beginn des Versuches bewegte sich der Skrotalumfang aller Kälber zwischen 22.5 und 31.0 cm und nahm anschliessend bis zur 5. Woche auf 24.5-33.0 cm zu. Bei geimpften Tieren kam es dann während rund 3 Monaten zu einer kontinuierlichen Abnahme des Skrotalumfanges um 2-5 cm (Wochen 17-20). Anschliessend nahm der Skrotalumfang wieder zu und erreichte am Ende des Versuches Werte von 27.5-30.0 cm (n=5). Die beiden Kontrolltiere zeigten eine lineare Zunahme des Skrotalumfanges von anfänglich 22 cm auf 26.0 und 31.5 cm zum Zeitpunkt der Schlachtung (Woche 27).

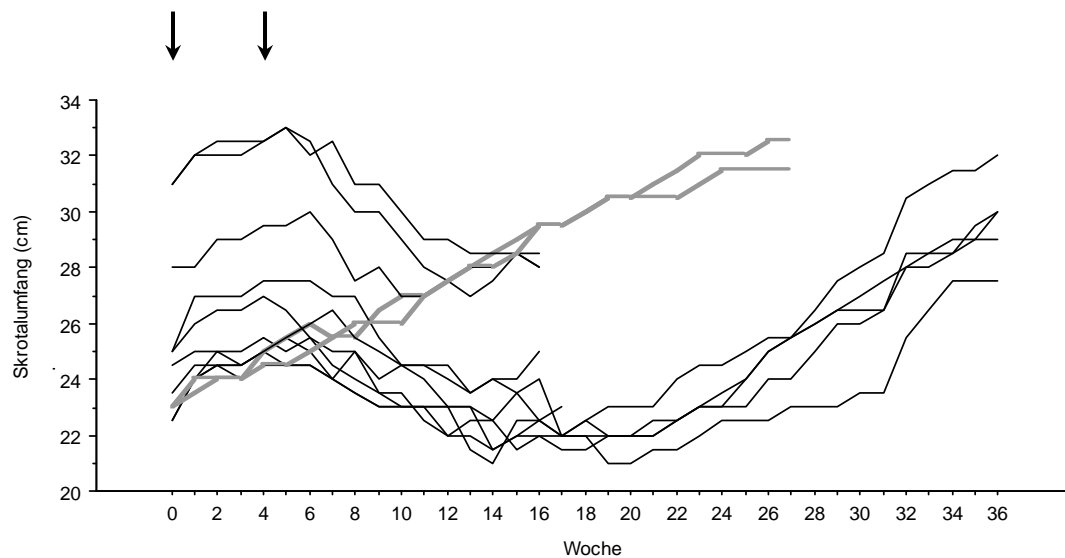


Abbildung 4: Skrotalumfang bei Stierkälbern mit (—, bis Woche 17 n=10, ab Woche 17 n=5) und ohne (---, bis Woche 27 n=2) Bopriva<sup>®</sup>. Pfeile stellen die Injektionen dar.

### Histologie und Spermatogenese

Die histologische Untersuchung der Hoden, 3 Monate nach der 2. Impfung, zeigte bei allen 5 Stierkälbern eine unvollständige Spermatogenese mit fehlender oder stark reduzierter Bildung von Spermatozoen (Abb. 5, 6). Die Einstufung der Spermatogeneseaktivität (1-10) anhand von 100 Tubulusquerschnitten ergab bei den geimpften Kälbern durchschnittliche Werte zwischen  $3.4 \pm 0.06$  und  $5.5 \pm 0.13$  (Abb. 7). Gleichaltrige Kontrolltiere (n=2) zeigten eine vollständige Spermatogenese mit Spermatozoen im Tubuluslumen (Abb. 8). Die durchschnittliche Spermatogeneseaktivität betrug  $8.12 \pm 0.1$  und  $8.23 \pm 0.13$  (Abb. 7) und war signifikant ( $P < 0.05$ ) höher als bei allen geimpften Tieren.

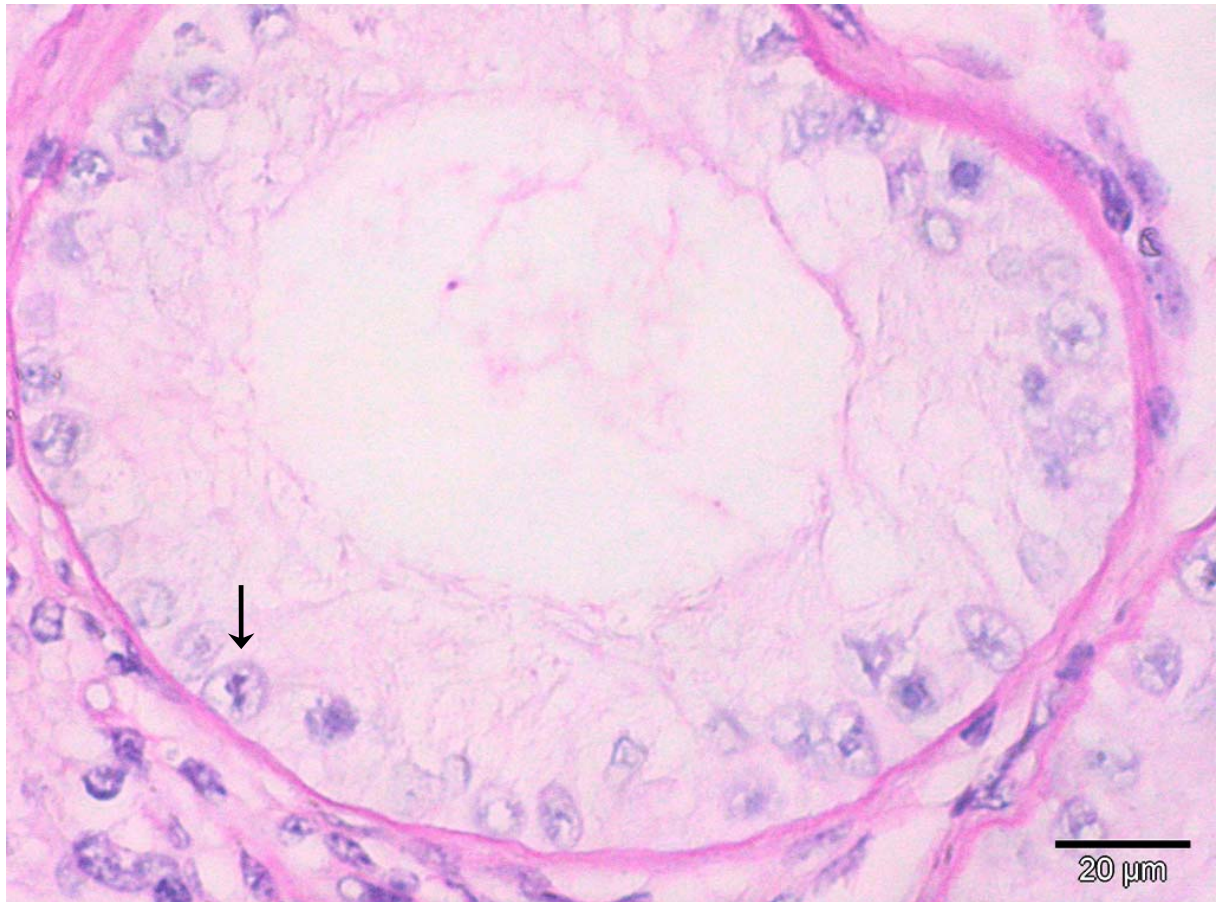


Abbildung 5: Tubulusquerschnitt eines mit Bopriva<sup>®</sup> geimpften Tieres (E) mit Spermatogeneseaktivität Stufe 3. Das Keimepithel besteht lediglich aus Spermatogonien (↓). Spermatozyten, Spermatiden und Spermatozoen fehlen.



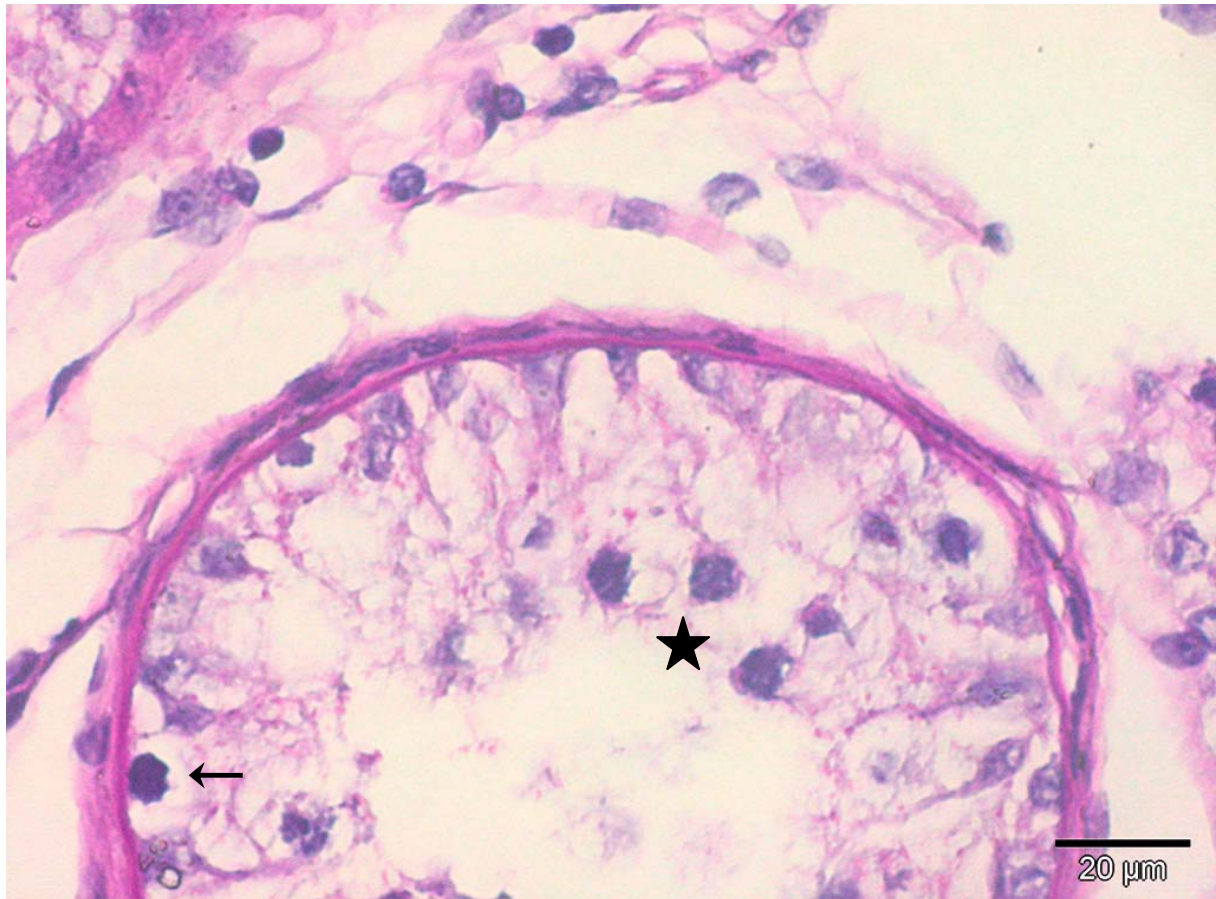


Abbildung 6: Tubulusquerschnitt eines mit Bopriva® geimpften Tieres (I) mit Spermatogeneseaktivität Stufe 5. Das Keimepithel besteht aus Spermatogonien (←) und zahlreichen Spermatozyten (★). Spermatiden und Spermatozoen fehlen.

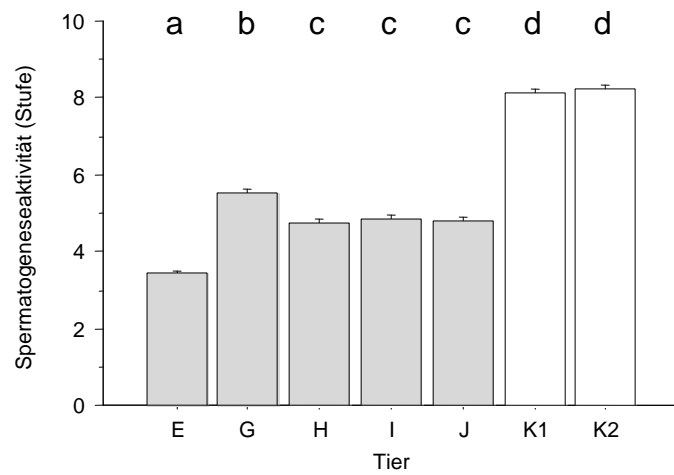


Abbildung 7: Durchschnittliche ( $m \pm \text{SEM}$ ) Spermatogeneseaktivität (1-10) bei 5 mit Bopriva<sup>®</sup> geimpften Stierkälbern (■) und 2 Kontrolltieren (□). Säulen mit unterschiedlichen Indices<sup>a,b,c,d</sup> sind signifikant verschieden ( $P < 0.05$ , ungepaarter t-Test).



Abbildung 8: Tubulusquerschnitt eines Kontrolltieres mit vollständiger Spermatogeneseaktivität (Stufe 10). Das Keimepithel besteht aus verschiedenen Entwicklungsstadien und im Tubuluslumen sind zahlreiche Spermatozoen erkennbar.

Die mittleren Durchmesser von je 100 Hodentubuli bei geimpften und Kontrolltieren sind in Abbildung 9 dargestellt. Bei geimpften Tieren schwankten die Werte zwischen  $135.3 \pm 1.19 \mu\text{m}$  und  $184.4 \pm 2.2 \mu\text{m}$ . Die mittleren Durchmesser der beiden Kontrolltiere betrugen  $216.6 \pm 2.22 \mu\text{m}$  und  $238.5 \pm 2.88 \mu\text{m}$  und waren signifikant ( $P < 0.05$ ) grösser als bei den geimpften Tieren

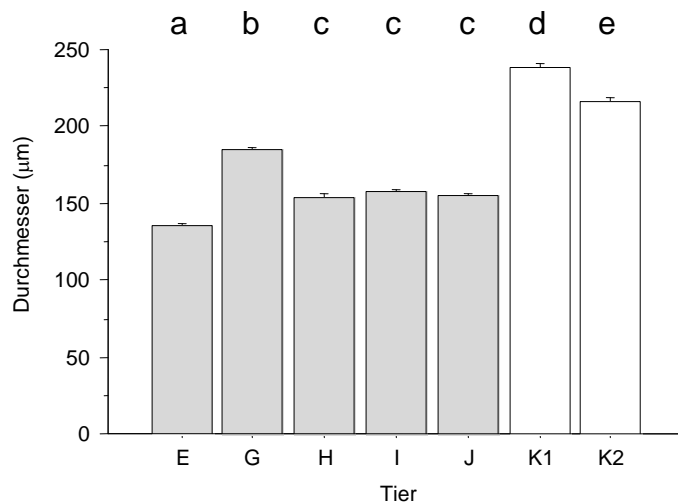


Abbildung 9: Durchschnittlicher ( $m \pm \text{SEM}$ ) Durchmesser der Hodentubuli bei 5 mit Bopriva<sup>®</sup> geimpften Stierkälbern (■) und 2 Kontrolltieren (□). Säulen mit unterschiedlichen Indices<sup>a,b,c,d,e</sup> sind signifikant verschieden ( $P < 0.05$ , ungepaarter t-Test).

### Samenqualität

Die gegen Versuchsende (Wochen 32-36) von 5 geimpften Stieren mittels künstlicher Scheide gewonnenen Ejakulate enthielten zwischen 724 und 3306 Millionen Samenzellen. Die Spermienmotilität schwankte zwischen 59-84%.

## Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigen, dass bei pubertären männlichen Kälbern die Hodenfunktion durch eine zweimalige Impfung gegen GnRH mit Bopriva® im Abstand von 4 Wochen zuverlässig und reversibel gehemmt werden kann. Die Verträglichkeit der Impfung war, abgesehen von einer individuell unterschiedlich stark ausgeprägten Schwellung an der Injektionsstelle und einer vorübergehenden Erhöhung der Körpertemperatur, als gut einzustufen. Bopriva® enthält ein wasserlösliches Adjuvans und ist deshalb deutlich besser verträglich als früher gebrauchte GnRH Vakzinen mit öligen Adjuvantien (Robertson et al., 1979, 1981, 1982; Jeffcoate et al., 1982; Adams und Adams, 1992; Adams et al., 1993, 1996; Finnerty et al., 1994; Jago et al., 1997). Dies zeigt, dass die Zusammensetzung einer Vakzine bezüglich Trägerprotein und Adjuvans für die tierartspezifische Verträglichkeit von grosser Bedeutung ist. So kann die Anwendung der spezifisch für das Schwein konzipierten Vakzine Improvac® bei anderen Tierarten wie zum Beispiel beim Pferd (Imboden et al., 2006) zu teilweise starken Lokalreaktionen mit Störungen des Allgemeinbefindens führen.

Es ist bekannt, dass die Wirksamkeit einer Vakzine in erster Linie von der Höhe des erreichten Antikörpertiters bestimmt wird und dies ist wiederum abhängig von der Zusammensetzung des Antigens, der Antigenmenge, der Anzahl Applikationen sowie von Alter und Rasse des entsprechenden Tieres. In der Regel wird die Immunantwort nach mehrmaligen Impfungen (Boosters) erhöht, was aber beim Nutztier aus wirtschaftlichen und organisatorischen Gründen häufig nicht möglich ist. In unserem Versuch zeigten alle geimpften Kälber nach nur einer Boosterinjektion einen individuell unterschiedlich stark ausgeprägten Anstieg der GnRH-Titer. Bei den 5 Jungstieren, die bis zum Ende im Versuch vorhanden waren, dauerte die Impfwirkung, gemessen an der Testosteronsupprimierung, zwischen 10 und 22 Wochen. Dabei war auffällig, dass das Tier G mit dem niedrigsten Titer auch die kürzeste Impfwirkung zeigte.

Der Eintritt in die Pubertät und die vollständige Reversibilität der Impfung konnte durch die Gewinnung von Ejakulaten mit einer Gesamtpermienzahl von  $> 50$  Millionen und einer Spermienmotilität von  $> 10\%$  (Wolf et al., 1965; Lunstra et al., 1978) eindeutig bewiesen werden. Bezüglich der Reversibilität bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass in Abhängigkeit von Tierart und Zeitpunkt der Impfung Unterschiede vorhanden sein können. So haben frühere Untersuchungen beim Schaf (Brown et al., 1994, 1995; Clarke et al., 1998; Janett et

al., 2003) gezeigt, dass die Impfung im juvenilen Alter bei manchen Tieren zu einer irreversiblen Hemmung der Gonadenfunktion geführt hat.

Mit der Hemmung der Testosteronsekretion kam es bei den geimpften Tieren erwartungsgemäss zu einer Stagnation des Hodenwachstums und der Skrotalweite (Jeffcoate et al., 1982; Finnerty et al., 1994; Adams et al., 1996; Jago et al., 1997; D'Occhio et al., 2001). Mit Abnahme der Antikörpertiter und nach erneutem Ansteigen von Testosteron setzte auch das Hodenwachstum wieder ein und der Skrotalumfange nahm kontinuierlich bis Versuchsende zu. Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit Bopriva® und anderen Studien (Robertson et al., 1979, 1981, 1982; Jeffcoate et al., 1982; Adams und Adams, 1992; Adams et al., 1993, 1996; Finnerty et al., 1994; Jago et al., 1997; Huxsoll et al., 1998; D'Occhio et al., 2001), ist jedoch aufgrund verschiedener Faktoren wie Art und Menge des Antigens, verwendetes Adjuvans, Anzahl Impfungen sowie Rasse und Alter der Tiere kaum möglich.

Die histologische Untersuchung der Hoden, 3 Monate nach der Boosterinjektion, zeigte bei den geimpften Tieren eine individuell starke Hemmung der Spermatogenese. Bei allen Tieren konnten anlässlich der Beurteilung der Tubulusquerschnitte keine Spermatozoen und kaum Spermatisiden nachgewiesen werden. Verantwortlich für die Hemmung der Spermatogenese ist die niedrige intratestikuläre Testosteronkonzentration, da Testosteron für die Aufrechterhaltung der Spermatogenese essentiell ist (Sinha Hikim und Swerdloff, 1993; McLachlan et al., 1994). Liegt ein Testosteronmangel vor, kommt es im Keimepithel zu einer Loslösung der Spermatisiden von den Sertolizellen und damit zum Sistieren der Spermatogenese (O'Donnel et al., 1996). Die Hemmung der Spermatogenese manifestierte sich auch in einem geringeren Durchmesser der Hodentubuli. Der mittlere Durchmesser der Samenkanälchen war bei den geimpften Stierkälbern signifikant geringer als bei den Kontrolltieren und deutlich kleiner als der in Literatur (Wrobel, 2000) für pubertäre Stiere angegebene Wert von 200 µm

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die zweimalige Applikation der Anti-GnRH Impfung Bopriva® im Abstand von 4 Wochen beim pubertären Kalb eine zuverlässige Hemmung der Hodenfunktion während mindesten 10 Wochen bewirkt. Zur Verhinderung von unerwünschten Trächtigkeiten in Mutterkuhherden, muss die Impfwirkung beim Stierkalb spätestens im Alter von 7 Monaten einsetzen, da zu diesem Zeitpunkt die Spermatogenese noch unvollständig ist und keine Spermatozoen vorhanden sind (Amman, 1983). Stierkälber müssen daher im Alter von 6 und 7 Monaten zum ersten bzw. zum zweiten Mal geimpft und

mit 10 Monaten von der Herde getrennt oder geschlachtet werden. Wird die Impfung zur Unterdrückung des Geschlechtsverhaltens bei jüngeren Kälbern angewendet, müssen diese nach 2-maliger Impfung im Abstand von 4 Wochen alle 3 Monate oder beim Einsetzen des Hodenwachstums nachgeimpft werden.

## Literatur

Abd-Elmaksoud A.: Morphological, glycohistochemical, and immunohistochemical studies on the embryonic and adult bovine testis. Dissertation, Universität München, 2005.

Adams T. E., Adams B. M.: Feedlot performance of steers and bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 1992, 70: 1691–1698.

Adams T. E., Daley C. A., Adams B. M., Sakurai H.: Testis function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone: effect of implants containing progesterone and estradiol benzoate. *J. Anim. Sci.* 1993, 71: 811–817.

Adams T. E., Daley C. A., Adams B. M., Sakurai H.: Testes function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone: effect of age at immunization. *J. Anim. Sci.* 1996, 74: 950–954.

Amman R. P.: Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 1983, 66: 2606-2622.

Arimura A., Sato H., Kumasaka T., Worobec R. B., Debeljuk L., Dunn J., Schally A. V.: Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. *Endocrinology* 1973, 93: 1092-1103.

Beekman N. J. C. M., Schaaper W. M. M., Turkstra J. A., Meloen R. H.: Highly immunogenic and fully synthetic peptide-carrier constructs targeting GnRH. *Vaccine* 1999, 17: 2043-2050.

Boesch D., Steiner A., Stauffacher M.: Kälberkastration: Eine Befragung von Schweizer Mutterkuhhaltern. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2006, 148: 231-244.

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.

Clarke I. J., Brown B. W., Tran V. V., Scott C. J., Fry R., Mittar R. P., Rao A.: Neonatal Immunization against Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Results in Diminished GnRH Secretion in Adulthood. *Endocrinology* 1998, 139: 2007-2014.

D'Occhio, M. J.: Immunological suppression of reproductive functions in male and female mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 1993, 33: 345-372.

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.

Falvo R. E., Chandrashekar V., Arthur, R. D., Kuenstler A. R., Hasson T., Awoniyi C., Schanbacher B. D.: Effect of active immunization against LHRH or LH in boars: reproductive consequences and performance traits. *J. Anim. Sci.* 1986, 63: 986-994.

Finnerty, M., Enright, W. J., Morrison, C. A. and Roche, J. F.: Immunization of bull calves with a GnRH analogue-human serum albumin conjugate: effect of conjugate dose, type of adjuvant and booster interval on immune, endocrine, testicular and growth responses. *J. Reprod. Fertil.* 1994, 101: 333-343.

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.



Huxsoll C. C., Price E. O., Adams T. E.: Testis function, carcass traits, and aggressive behavior of beef bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 1998, 76: 1760-1766.

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 Schaf. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2009, 151: 53-59.

Janett F., Stump R., Burger D., Thun R.: Suppression of testicular function and sexual behaviour by vaccination against GnRH (Equity<sup>TM</sup>) in the adult stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 2009, 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. *Livest. Prod. Sci.* 2005, 92: 31-38.

Jeffcoate I. A., Lucas J. M. S., Crighton D. B.: Effect of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Theriogenology* 1982, 18: 65-77.

Lincoln, G. A., Fraser H. M.: Blockade of episodic secretion of luteinizing hormone in the ram by the administration of antibodies to luteinizing hormone releasing hormone. *Biol. Reprod.* 1979, 21: 1239-1245.

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.

McLachlan R. I., Wreford N. G., Meachem S. J., de Kretser D. M., Robertson D. M.: Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. *Biol. Reprod.* 1994, 51: 945–955.

O'Donnell L., Stanton P. G., Wreford N. G., Robertson D. M., McLachlan R. I.: Inhibition of 5 alpha-reductase activity impairs the testosterone- dependent restoration of spermiogenesis in adult rats. *Endocrinology* 1996, 137. 2703-2710.

Robertson, I. S., Wilson, J. C., Fraser, H. M.: Immunological castration in male cattle. *Vet. Rec.* 1979, 105: 556–557.

Robertson, I. S., Wilson, J. C., Rowland, A. C., Fraser, H. M.: Further studies on immunological castration in male cattle. *Vet. Rec.* 1981, 108: 381–382.

Robertson, I. S., Fraser, H. M., Innes, G. M., Jones, A. S.: Effect of immunological castration on sexual and production characteristics in male cattle. *Vet. Rec.* 1982, 111: 529–531.

Schanbacher B. D., Pratt B. R.: Response of a cryptorchid stallion to vaccination against luteinising hormone releasing hormone. *Vet. Rec.* 1985, 116: 74-75.

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.

Sinha Hikim A. P., Swerdloff R. S.: Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev. Reprod.* 1999, 4: 38–47.

Steiner A. Kastration von männlichen Kälbern – eine Übersicht. *Proc. Vets* 2008: 99-101.

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: 523-528.

Thompson D. L.: Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61: 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.

Turkstra J. A., van der Meer F. J. U. M., Knaap J., Rottier P. J. M., Teerds K. J., Colenbrander B., Meloen R. H.: Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 86: 247-259.

Wolf F.R., Almquist J. O., Hale E. B.: Prepubertal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J. Anim. Sci.* 1965, 24:761.

Wrobel K. H.: Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anat. Embryol.* 2000, 202: 209-22.

## **Dank**

Ganz herzlich möchten wir dem BVET für die finanzielle Unterstützung des Projektes danken.



## Lebenslauf

Theubet Grégoire

Geboren am 08. Februar 1984

Heimatort: Fahy JU

1990–1996	Primarschule Fahy
1996–1999	Sekundarschule Collège Stockmar
1999–2002	Gymnasium Lycée cantonal de Porrentruy
2002–2008	Studium der Veterinärmedizin, Universität Zürich
2008–2010	Doktorand an der Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich
Seit 2009	Assistent in der Tierarztpraxis Sieber et Charbon, Estavayer-le-Lac

Estavayer-le-Lac, 2.3.2010

Grégoire Theubet