

Beurteilung der Follikelzahl mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie bei zyklischen Milchkühen

A. Schweizer^{1,2}, F. Janett¹, H. Bollwein¹

¹Klinik für Reproduktionsmedizin, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, Schweiz;

²Tierarztpraxis Kreuzberg AG, Felsbachriet 6, 9473 Gams

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie (3D-S) bei Milchkühen die Follikelzahl (FZ) zuverlässig bestimmt werden kann. Anhand der FZ wurde geprüft, ob sich tierindividuelle Schwankungen zwischen und innerhalb einzelner Zyklen ergaben. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der 3D-S wurde die FZ auf den Ovarien von 10 Kühen *in vivo* mittels 3D-S und nach der Schlachtung computertomographisch bestimmt. Zur Analyse zyklusbedingter Veränderungen wurden sechs Kühe wiederholt über jeweils zwei Zyklen mittels 3D-S untersucht. Mit der 3D-S konnten Follikel ab einem Durchmesser von 2 mm erfasst werden. Die mittels 3D-Sonographie und Computertomographie ermittelten FZ korrelierten signifikant ($r \geq 0.86$, $p < 0.05$) und unterschieden sich nicht voneinander ($p \geq 0.05$). Die FZ unterlagen vor allem tierindividuellen Unterschieden ($p < 0.0001$) und in geringerem Ausmass Schwankungen innerhalb und zwischen den Zyklen ($p < 0.05$). Die Ergebnisse zeigen, dass die 3D-Sonographie ein zuverlässiges Verfahren ist, um die FZ zu bestimmen. Die FZ unterscheidet sich vor allem zwischen den Kühen und unterliegen weniger zyklusbedingten Schwankungen.

Schlüsselwörter: 3D-Sonographie, Follikel, Rind

Evaluation of three-dimensional sonography for antral follicle count in cycling dairy cows

The objective of the present study was to investigate reliability of transrectal three-dimensional ultrasound (3D-S) for antral follicle count (AFC) in dairy cows. Furthermore individual differences of AFC between cows and the fluctuation of AFC within and between different cycles were evaluated. To test the reliability of 3D-S, AFC was determined on the ovaries of 10 cows *in vivo* and compared with counts obtained after slaughter using computer tomography. To evaluate cyclic follicle dynamics, six cows were repeatedly examined with 3D-S over a period of two cycles. Using 3D-S, follicles with a mean diameter greater than 2 mm could be recorded. AFC determined with 3D-S and computer tomography showed a significant correlation ($r \geq 0.86$, $p < 0.05$) and values were similar ($p \geq 0.05$). AFC differed between individuals ($p < 0.0001$) and a moderate fluctuation within and between two cycles within the same cow was apparent ($p < 0.05$). In conclusion, 3D-S is a suitable method for determination of AFC in cattle. AFC differs between cows and cyclic fluctuations are apparent in a lesser extent.

Keywords: 3D-Sonography, ovarian follicle, cattle

<https://doi.org/10.17236/sat00187>

Eingereicht: 08.10.2018
Angenommen: 02.11.2018

Einleitung

Die Follikelanzahl variiert sehr stark zwischen Kühen²¹. Die Unterschiede beruhen nicht nur auf Faktoren wie Rasse, Alter, Laktationsstadium und Jahreszeit¹⁴, sondern auch auf der Anzahl an Primordialfollikeln zum Zeitpunkt der Geburt^{3,7,12,13}. Ausserdem hat eine restriktive Fütterung der Muttertiere während der Trächtigkeit einen negativen Einfluss auf die FZ der neugeborenen Kälber, was sich negativ auf die spätere Fertilität auswirken kann²¹. Auch Krankheiten des trächtigen

Muttertiers können einen negativen Einfluss auf die Primordialfollikelzahl der Feten haben^{21,14}. Mossa et al.²¹ teilten Kühe in Abhängigkeit von der FZ auf den Ovarien in Gruppen mit geringer (≤ 15), mittlerer (16–24) und hoher FZ (≥ 25) ein. Dabei wiesen Kühe mit geringer FZ im Vergleich zu den anderen Gruppen eine verlängerte Günstzeit und einen höheren Besamungsindex auf. In anderen Studien^{12,26} wurde festgestellt, dass Rinder mit einer geringen FZ nach hormoneller Superstimulation weniger dominante Follikel entwickelten als Tiere mit hoher FZ. Rinder mit geringer FZ wiesen fer-

Diese Arbeit ist mit grossem Dank Herrn Prof. Dr. Rico Thun für seine jahrelange engagierte Tätigkeit als Chefredaktor des Schweizer Archivs für Tierheilkunde gewidmet.

Beurteilung der Follikelzahl mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie bei zyklischen Milchkühen

A. Schweizer, F. Janett, H. Bollwein

ner ein dünneres Endometrium und niedrigere Progesteronkonzentrationen in der ersten Woche nach der Ovulation auf, was mit einem erhöhten Risiko für embryonale Mortalität einher ging^{6,15}.

In der Humanmedizin wird die 3D-Sonographie seit den 1990er Jahren angewendet und ist mittlerweile als diagnostische Methode etabliert^{10,18}. Mittels dieser Technik können das fetale Wachstum¹⁸, fetale Malformationen¹⁹ und Neoplasien^{11,28} erkannt werden. Seit einigen Jahren wird dieses Verfahren auch zur dreidimensionalen Darstellung der Follikel auf den Ovarien der Frau eingesetzt¹. Die mittels 3D-Sonographie bestimmte FZ ist niedriger als diejenige, die mit Hilfe der 2D-Sonographie erhoben wurde. Dies wird auf eine Mehrfachzählung der kleinen Follikel mit einem Durchmesser von bis zu 5 mm bei der 2D-Methode zurückgeführt⁵. Eine spezifische Software für Ovardiagnostik ermöglicht eine automatische Identifikation und Berechnung von Follikeln anhand eines 3D-Bildes. Diese erkennt die mit Flüssigkeit gefüllten anechogenen Follikel im echogenen Ovargewebe und analysiert automatisch deren Anzahl und Volumina. In einer Studie bei der Frau wurde bei 244 Follikeln das reale Aspirationsvolumen mit den nach 3D-Sonographie berechneten Volumina und den aus den Follikeldurchmessern in der 2D-Sonographie und einer Formel geschätzten Volumina verglichen²³. Dabei erwies sich die 3D-Sonographie als genauere Methode als die 2D-Sonographie²³. In der Humanmedizin erleichtert der Einsatz der 3D-Sonographie massgeblich den Arbeitsablauf in der Klinik. So wird für die Beurteilung des Follikelwachstums nach hormoneller Stimulation bei einer 3D-Sonographie weniger Zeit benötigt als mit der Real-Time 2D-Methode²². Die Software der modernen 3D Geräte erlaubt ausserdem eine offline Auswertung der Ultraschallbilder in Abwesenheit der Patienten und kann bei wiederholten Untersuchungen zur Qualitätskontrolle angewandt werden¹.

In der vorliegenden Studie soll getestet werden, ob beim Rind die transrektale 3D-Sonographie ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der FZ ist und ob diese Methode Vorteile gegenüber der konventionellen 2D-Sonographie hat. Zudem soll überprüft werden, ob individuelle oder zyklusbedingte Unterschiede in der FZ vorkommen.

Material und Methoden

Tiere

Am Schlachthof Zürich wurden die Ovarien von zehn Schweizer Braunvieh Kühen vor und nach der Schlachtung einmalig untersucht. Sämtliche Tiere befanden sich vor der Schlachtung in einem guten Allgemeinzustand. Um zyklusbedingte Änderungen in der FZ zu erfassen,

wurden an sechs gesunden, nicht laktierenden Kühen der Rasse Schweizer Braunvieh Untersuchungen während zwei aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt. Während der gesamten Versuchsdauer waren die Kühe an der Klinik für Reproduktionsmedizin der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich aufgestellt. Sie wurden in Anbindehaltung gehalten und hatten tagsüber Auslauf. Die Kühe waren von einem Tierhändler gekauft worden und wurden vor dem Versuch klinisch auf ihren Gesundheitsstatus und auf regelmässige Zyklusaktivität untersucht.

Für die Untersuchungen lag eine Tierversuchsbewilligung des kantonalen Veterinäramts Zürich vor (Nr. 18/2013).

Versuchsaufbau

Genauigkeit und Präzision der 3D-Sonographie

Zehn Kühe wurden transrektal mittels 2D- und 3D-Sonographie untersucht und anschliessend geschlachtet. Nach Entnahme der Ovarien wurden diese in Gelatine eingelegt um zu verhindern, dass Anzahl und Volumen der Follikel durch den Transport verändert werden. In diesem Zustand wurde die FZ auf den Ovarien mittels Computertomographie (CT, Somatom Sensation Open, Siemens, Erlangen, Deutschland) am Tierspital Zürich bestimmt. Die CT-Bilder wurden mit der Bildanalyse-Software Osirix[®] (Pixmeo SARM, Geneva, Schweiz) ausgewertet und mit den Ergebnissen der sonographischen Untersuchungen verglichen. Sämtliche Untersuchungen fanden innerhalb eines Zeitintervalls von 8 Stunden statt.

Zyklusbedingte und individuelle Unterschiede in der Follikelzahl

Sechs Schweizer Braunviehkühe wurden während zwei aufeinanderfolgenden Zyklen sonographisch untersucht. Vor dem Start der Untersuchungen wurden die Zyklen der Kühe synchronisiert. Dazu wurde den Tieren über 7 Tage eine progesteronhaltige Intra vaginalspange (Eazi-Breed CIDR 1380[®], ad us. vet., Zoetis GmbH, Zürich, Schweiz) appliziert. Einen Tag vor der Entfernung der Spange wurde den Kühen 0.5 mg eines synthetischen Prostaglandins F_{2α} (Estrumate[®], MSD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz) i.m. verabreicht. Anschliessend wurden die Funktionsgebilde auf den Ovarien der Kühe täglich mit einem 2D-Ultraschallgerät (Honda HS 101V, Physia[®], Neu-Isenburg, Deutschland) untersucht, um den Zyklusstand zu definieren. Als Tag der Ovulation (Tag 1) wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem der ovulatorische Follikel erstmals nicht mehr darstellbar war. Nach der Ovulation wurden die Kühe jeden zweiten Tag im Diöstrus und ab dem Tag 15 täglich bis zur nächsten Ovulation transrektal sonographisch untersucht. Die Untersuchungen fanden jeweils vormittags zwischen 7 und 11 Uhr statt.

Die Kühe wurden anhand der FZ auf beiden Ovarien in drei Gruppen (gering: ≤ 15 , mittel: 16–24 und hoch: ≥ 25) eingeteilt^{3,12,13,21}, wobei alle Follikel mit einem Durchmesser ≥ 2 mm erfasst wurden. Die Follikel wurden gemäss ihrem Durchmesser in folgende Kategorien eingeteilt: klein (2–4 mm), mittel (5–7 mm) und gross (≥ 8 mm)^{16,20}. Der Zyklus wurde auf 21 Tage standardisiert, wobei jeweils die ersten 15 Tage des Diöstrus und die letzten zwei Tage vor der Ovulation dargestellt wurden.

Ultraschalluntersuchung

Alle sonographischen Untersuchungen wurden immer von derselben Person mit einem portablen 3D-Ultraschallgerät (Voluson i, GE Medical Systems Kretztechnik GmbH, Zipf, Austria) mit definierten Einstellungen (Frequenz 9 MHz) und einer Konvexsonde (RNA 5 bis 9) durchgeführt. Bei jeder Untersuchung wurden mindestens drei verschiedene Aufnahmen des Ovars im 3D-Format gespeichert, um sie anschliessend am Computer mittels 4DView[®]-Programm (GE Medical Systems Kretztechnik GmbH, Zipf, Austria) auszuwerten. Die Ovarien wurden zu Beginn zweidimensional im B-Mode sowohl in longitudinaler als auch in transversaler Ebene dargestellt und die Follikel gezählt. Dazu wurde das Ovar manuell fixiert und mit der Sonde die gesamte Oberfläche der Länge und Breite nach dargestellt und so die einzelnen Follikel gezählt und ausgemessen. Die Untersuchungsdauer betrug in Abhängigkeit von der FZ zwischen 10 bis 15 Minuten für beide Ovarien, wobei sämtliche 2D-Bilder direkt online ausgewertet wurden. Für die 3D-Sonographie wurde das Ultraschallgerät in den „Volume Modus“ (3D-Static) umgestellt. Anschliessend wurden der Aufnahmesektor (60 bis 90° Grad) und die Eindringtiefe (2–5 cm) manuell für die 3D-Aufnahme der Grösse der Ovarien angepasst und eine Frequenz von 9 MHz eingestellt. Es wurden nur 3D-Bilder ohne Bewegungsartefakte und mit vollständiger Volumendarstellung für die Auswertungen verwendet. Für die Untersuchung beider Ovarien einer Kuh wurden etwa 10 bis 15 Minuten (etwa 2.5 Minuten pro 3D-Bild) benötigt.

Sämtliche Auswertungen der mit dem 3D-Ultraschallgerät aufgenommenen Bilder erfolgten offline durch dieselbe Person. Die Bilder wurden dazu auf einen PC transferiert und die sonographischen Aufnahmen mit Hilfe des 4DView[®] Programms ausgewertet, wobei die Analyse der Follikel mit der SonoAVC Funktion des Programms vorgenommen wurde. Das 4DView[®] Programm erkennt automatisch anechogene und schwach echogene Objekte (z.B. Follikel), eingebettet in einem hyperechogenen Organ (Abbildung 1) und berechnet deren Anzahl, Durchmesser und Volumina. Für jeden einzelnen Follikel werden die Durchmesser in den drei orthogonalen Ebenen sowie ein mittlerer (m-d; durch-

schnittlicher Wert der x-,y- und z-Achse) und ein volumenbasierter Durchmesser [d(V)], ausgehend von der Annahme, dass der Follikel von kugelförmiger Gestalt ist, berechnet^{23,24}. Die einzelnen Follikel werden zur besseren Differenzierung voneinander in unterschiedlichen Farben dargestellt und ihre verschiedenen Grösseparameter geordnet in einer Tabelle aufgelistet¹. Bei der Nachbearbeitung der 3D-Bilder können fälschlicherweise als Follikel diagnostizierte Gefässe durch die Analyse der drei orthogonalen Ebenen erkannt werden und mit Hilfe der Programmoption „Follikel entfernen“ von den Berechnungen ausgeschlossen werden. Für die Auswertung der einzelnen Ovarien wurde jeweils das am besten geeignete 3D-Bild verwendet, wobei sich vor allem ein mangelnder Kontrast zwischen dem hyperechogenem Ovargewebe und der hypoechoenen Follikelflüssigkeit als limitierender Faktor erwies.

Statistik

Sämtliche Daten wurden mit den Programmen Windows Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmont, Washington 98052, USA) und OpenEpi (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Atlanta, USA) ausgewertet. Es wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Korrelationen berechnet. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Variablen wurde die Pearson-, bei nicht normalverteilten Variablen die Spearman-Korrelation berechnet. Korrelationskoeffizienten von $0.10 > r < 0.30$ wurden als schwach, $0.30 \geq r < 0.50$ als mittelgradig und ≥ 0.50 als gut definiert⁴. Für normalverteilte, abhängige Stichproben wurde ein gepaarter t-Test, für nicht normalverteilte Stichproben der Wilcoxon Paarvergleichstest ausgewählt. Für unabhängige Stichproben wurde bei normalverteilten Stichproben

Beurteilung der Follikelzahl mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie bei zyklischen Milchkuhen

A. Schweizer, F. Janett, H. Bollwein

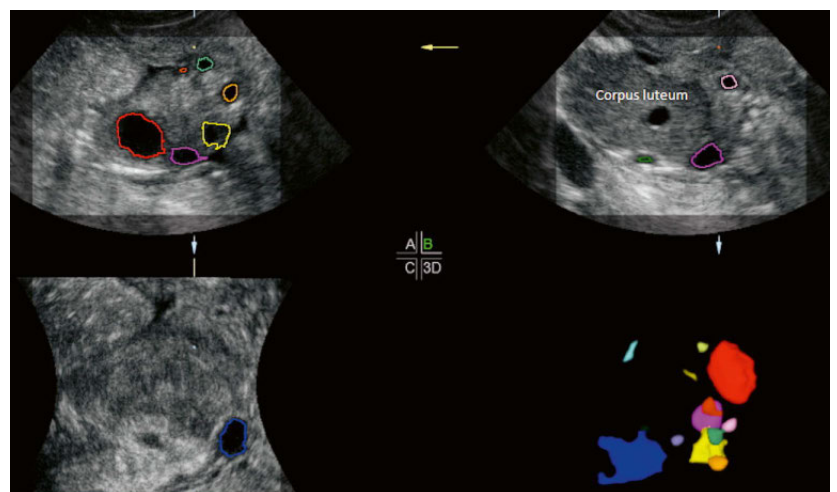


Abbildung 1: Sonographische Darstellung eines Ovars (Kuh Nr. 1, Zyklustag 9) in drei verschiedenen orthogonal zueinander stehenden Ebenen (A, B, C) und farblich individuelle Darstellung der einzelnen Follikel in einer 3D-Bildrekonstruktion mittels SonoAVC Funktion des 4DView[®]-Programms.

Beurteilung der Follikelzahl mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie bei zyklischen Milchkühen

A. Schweizer, F. Janett, H. Bollwein

ein t-Test, für nicht normalverteilte Stichproben der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ gewählt. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Follikelbestimmung mittels 3D-Sonographie wurde der Intra-Class-Correlation-Koeffizient (ICC) bestimmt. An je drei 3D-Bildern von 20 per Losverfahren ausgewählten Ovarien wurden die FZ bestimmt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Zur Beurteilung der Genauigkeit der Follikelzählung mittels 2D- und 3D-Sonographie wurden die mit beiden Verfahren bestimmten FZ auf 20 Ovarien jeweils mit dem Goldstandard, den Ergebnissen der computertomographischen Analyse der FZ, verglichen. Zur Erfassung der Intra-Observer-Variability (IOV) wurden ebenfalls 20 per Losverfahren ausgewählte 3D-Aufnahmen von Ovarien sechs und neun Monate nach der Untersuchung nochmals unabhängig von der ersten Untersuchung ausgewertet und der ICC bestimmt.

Ergebnisse

Praktikabilität der transrektalen 3D-Sonographie

Für die transrektale 3D-Sonographie war eine Konvexsonde nötig, die im Vergleich zur üblicherweise bei der 2D-Sonographie genutzten, kleineren Linearsonde zu Beginn der Studie schwieriger zu handhaben war. Nach einer kurzen Eingewöhnungszeit und praktischen Übungen war dies jedoch kein Hindernis mehr. Sämtliche Bestimmungen der FZ anhand der 2D- (online im Stall) und 3D-Bilder (offline am Computer) unterschieden sich nicht in der Dauer der Auswertungszeit (10 bis 15 Minuten für beide Ovarien). Bei der Erstellung eines 3D-Bildes von einem Ovar müssen sich die Tiere mehrere Sekunden ruhig verhalten, um Bewegungsartefakte bei der Aufnahme zu vermeiden. Leichte Vibrationen der Schallsonde während der Untersuchungen beunruhigten jedoch die Kühe und führten so häufig zu Bewegungsartefakten und damit zu einer schlechteren Bildqualität. Die Nachbearbeitung und Auswertung der 3D-Bilder mit dem 4D-View[®] Programm erwies sich als einfach und benutzerfreundlich.

Vergleich 2D-, 3D-Sonographie und Computertomographie

Für die Bestimmung der Richtigkeit und Präzision wurde bei allen drei Untersuchungsmethoden die Zahl der Follikel ab einer Grösse von 2 mm bestimmt. Die Zahlen aller mit den verschiedenen Untersuchungsmethoden darstellbaren Follikel korrelierten sehr gut miteinander, wobei die mittels 3D-Sonographie erfassten FZ besser mit den anhand der CT bestimmten Follikelzahlen korrelierten ($r \geq 0.86$, $p < 0.05$) als diejenigen, die mittels konventioneller 2D-Methode erhoben worden waren ($r \geq 0.76$, $p < 0.05$). Die mit der CT und der 3D-Sonographie ermittelten FZ differierten nicht ($p > 0.05$), während die mittels 2D-Sonographie ermittelte Zahlen kleiner Follikel höher ($p \leq 0.05$) und mittlerer Follikel kleiner ($p \leq 0.05$) waren als diejenigen, die nach der CT Untersuchung festgestellt wurden (Tabelle 1).

Der ICC, ermittelt anhand von drei während einer Untersuchung aufgenommenen dreidimensionalen Bildern, war in allen Follikelklassen hoch (2–4 mm: 0.88, 5–7 mm: 0.96, ≥ 8 mm: 1.00). Auch die ICC-Werte bei wiederholter Analyse derselben Bilder in einem mehrmonatigen Abstand waren hoch (2–4 mm: 0.88, 5–7 mm: 0.92, ≥ 8 mm: 1.00).

Variabilität der Follikelzahl innerhalb und zwischen den Zyklen

Die mittlere Länge aller 12 Zyklen betrug 21.5 ± 1.44 Tage (17 bis 24 Tage), wobei je ein Follikel ovulierte. In 7 von 12 Zyklen bildeten sich 3 Follikelwellen und in den restlichen 5 Zyklen 2 Follikelwellen an, wobei die Zyklen mit zwei Follikelwellen kürzer waren (20.7 ± 2.29 Tage) als solche mit drei Follikelwellen (22.0 ± 1.00 Tage). Drei Kühe wiesen in beiden untersuchten Zyklen einen 3-welligen Zyklus auf, eine Kuh einen 2- und einen 3-welligen Zyklus und zwei Kühe zeigten in beiden untersuchten Zyklen 2 Follikelwellen. Die Ovulation wurde in 9 Zyklen auf dem linken Ovar und in 3 Zyklen auf dem rechten Ovar beobachtet. Die Ovulationen ereigneten sich bei fünf von sechs Kühen in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen auf demselben Ovar.

Die sechs untersuchten Kühe unterschieden sich sowohl in der gesamten FZ als auch in den Zahlen der einzelnen Follikelkategorien ($p < 0.05$). Die FZ auf beiden Ovari-

Tabelle 1: Zahl der Follikel verschiedener Kategorien, definiert anhand ihres mittleren Durchmessers, bei der Bestimmung mittels 2D- und 3D-Sonographie *in vivo* und mittels Computertomographie *ex vivo*. Es sind von 10 Kühen jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichungen beider Ovarien angegeben.

Follikelkategorie	2–4 mm	5–7 mm	≥ 8 mm	alle Follikel
2D-Sonographie	5.9 ± 3.44^a	0.9 ± 0.76^a	0.4 ± 0.62	7.2 ± 3.02^a
3D-Sonographie	4.2 ± 2.94^b	1.3 ± 0.84^b	0.5 ± 0.62	6.0 ± 1.05^b
Computertomographie	4.1 ± 2.58^b	1.2 ± 0.80^b	0.6 ± 0.70	5.9 ± 1.86^b

Werte mit unterschiedlichen Buchstaben (a, b) innerhalb der Spalten unterscheiden sich ($p < 0.05$).

Tabelle 2: Zahl der Follikel (Mittelwerte \pm Standardabweichungen) verschiedener Kategorien auf beiden Ovarien, definiert anhand ihres mittleren Durchmessers. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von je zwei aufeinanderfolgenden Zyklen von Kühen (n=6), berechnet aus je 13 Untersuchungstagen (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21), dargestellt.

Kuh.	Zyklus	Follikelkategorie			
		2–4 mm	5–7 mm	≥ 8 mm	alle Follikel
1	1	13.1 \pm 5.53 ^{c,d}	8.6 \pm 3.48 ^d	2.1 \pm 1.27	24.1 \pm 5.57 ^b
	2	14.2 \pm 6.63 ^d	5.6 \pm 3.45 ^{b,c}	1.7 \pm 0.86	21.4 \pm 5.42 ^{b,c}
2	1	13.2 \pm 3.51 ^d	6.0 \pm 3.60 ^{b,c,d}	2.1 \pm 1.08	21.8 \pm 5.02 ^{b,c}
	2	12.7 \pm 4.65 ^{c,d}	5.0 \pm 1.84 ^b	2.4 \pm 1.35	20.8 \pm 4.92 ^{b,c}
3	1	11.2 \pm 4.64 ^{c,d}	5.8 \pm 2.13 ^{b,c}	2.2 \pm 1.34	19.5 \pm 4.04 ^c
	2	18.4 \pm 7.05 ^e	5.5 \pm 2.68 ^{b,c}	1.7 \pm 0.79	25.2 \pm 7.28 ^b
4	1	5.0 \pm 2.56 ^a	2.4 \pm 1.21 ^a	2.3 \pm 0.95	9.2 \pm 1.31 ^e
	2	5.8 \pm 2.57 ^a	3.1 \pm 1.89 ^a	2.3 \pm 1.04	10.8 \pm 1.92 ^{d,e}
5	1	7.2 \pm 3.44 ^{a,b}	4.2 \pm 1.88 ^b	2.5 \pm 1.57	13.3 \pm 2.55 ^d
	2	9.2 \pm 3.18 ^{b,c}	2.7 \pm 1.44 ^a	1.5 \pm 0.82	13.8 \pm 3.40 ^d
6	1	19.8 \pm 6.99 ^e	8.4 \pm 3.69 ^{c,d}	1.8 \pm 1.14	30.0 \pm 7.92 ^a
	2	18.9 \pm 6.73 ^e	5.4 \pm 2.93 ^b	1.8 \pm 1.22	26.6 \pm 7.88 ^{a,b}

Ungleiche Buchstaben (a–e) innerhalb der gleichen Spalte kennzeichnen Unterschiede zwischen der FZ verschiedener Kategorien in Abhängigkeit von Kuh und Zyklus ($p < 0.05$).

en differierten sehr deutlich zwischen verschiedenen Tieren (6–40 Follikel, $\varnothing 20.4 \pm 8.20$, $p < 0.0001$), wobei kein Unterschied ($p > 0.05$) zwischen dem linken und rechten Ovar innerhalb der einzelnen Kühe zu verzeichnen war. Bei zwei Kühen war die FZ auf beiden Ovarien gering (≤ 15 Follikel), bei zwei Kühen mittel (16–24 Follikel) und bei einer Kuh hoch (≥ 25 Follikel). Bei einer Kuh ergab sich zwischen dem ersten und zweiten Zyklus ein signifikanter Unterschied in der gesamten FZ, wobei im ersten Zyklus eine mittlere und im zweiten eine hohe FZ beobachtet wurde [1. Zyklus 19.5 ± 4.04 (13–26), 2. Zyklus 25.2 ± 7.28 (17–36)]. Dabei waren im zweiten Zyklus an 9 von 13 Messtagen mehr Follikel nachweisbar als im ersten Zyklus. Zwischen den beiden aufeinanderfolgenden Zyklen bestanden Unterschiede ($p < 0.05$) in den Zahlen kleiner und mittlerer Follikel (Tabelle 2). Es wurden auch zyklische Schwankungen der FZ innerhalb des Zyklus beobachtet, d.h. an Tag 7 war die FZ niedriger ($p < 0.05$) als an den anderen Zyklustagen (Abbildung 2).

Diskussion

Es existieren in der Humanmedizin bereits diverse Studien, welche sich mit der Evaluierung der Genauigkeit und Präzision der 3D-Sonographie in Kombination mit der SonoAVC Funktion des 4DView[®]-Programms zur Bestimmung der FZ bei der Frau beschäftigen^{1,5,22,23,24}, bisher fehlten jedoch solche Untersuchungen beim Rind.

Damit die 3D-Sonographie künftig vermehrt in der veterinärmedizinischen Rinderpraxis eingesetzt werden

kann, muss die Technik noch verbessert bzw. modifiziert werden. Ein Punkt, der gegenwärtig noch gegen einen praktischen Einsatz im Stall spricht, ist zum Beispiel die Grösse des Ultraschallgerätes. Die bisher auf dem Markt befindlichen 3D-Geräte sind nicht portabel und erfordern daher einen Untersuchungswagen. Ausserdem sind die Geräte noch sehr teuer und nicht robust genug oder gegenüber Spritzwasser geschützt, so dass es leicht zu Schäden kommen kann. Ein weiteres Verbesserungspotential liegt darin, die Vibrationen der Sonde während einer 3D-Aufnahme zu minimieren, sodass die Tiere während der Untersuchung nicht beunruhigt und damit Bewegungsartefakte bei der Erstellung von 3D-Bildern vermieden werden können.

Die offline-Bearbeitung der 3D-Bilder mittels eines externen Computerprogramms bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Nachbearbeitung mittels einer 2D-Sequenz. Durch die gleichzeitige Betrachtung des Ovars in drei verschiedenen Ebenen ist eine Lokalisierung und Identifizierung aller Follikel möglich, da das Ovar und die Funktionsgebilde gleichzeitig in mehreren Schnittebenen untersucht und überprüft werden können. Mit einer 2D-Sequenz können die Funktionsgebilde dagegen nur in einer Ebene betrachtet werden. Folglich kann zum Beispiel die Unterscheidung von kleinen Follikeln und Gefässen unzuverlässig sein. Im Vergleich zur 2D- liefert die 3D-Sonographie somit genauere Ergebnisse bei der Bestimmung der FZ. So korrelierten die im 3D-Modus automatisch erhobenen FZ besser mit dem Goldstandard, der CT, als die FZ, die im 2D-Modus gezählt wurde. Ferner gab es keine Unterschiede zwischen den im 3D-Modus und mittels CT bestimmten FZ, während bei der 2D-Sonographie die

Beurteilung der Follikelzahl mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie bei zyklischen Milchkühen

A. Schweizer, F. Janett, H. Bollwein

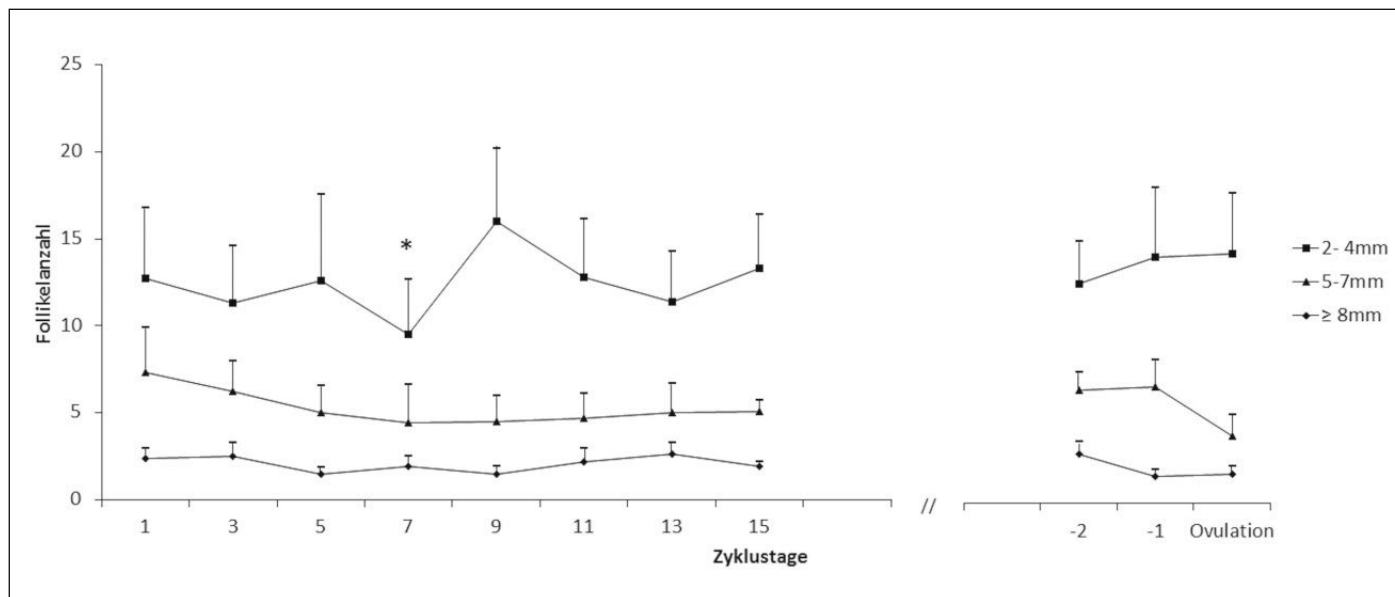


Abbildung 2: Änderung der Follikelzahl verschiedener Follikelkategorien innerhalb eines Zyklus. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung jeweils beider Ovarien von Kühen (n=6) während zweier Zyklen dargestellt. Die Zyklen sind auf 21 Tage standardisiert.

* Unterschied ($p < 0.05$) im Vergleich zu den anderen Zyklustagen.

FZ höher war als im 3D-Modus und CT. Wie bereits bei der Untersuchung humaner Ovarien beschrieben⁵, waren auch in dieser Studie vor allem kleine Follikel für die erhöhte FZ bei der Bestimmung im sonographischen 2D-Modus verantwortlich. Nach Ansicht der letztgenannten Autoren werden bei der Auswertung von 2D-Bildern kleinere Follikel teilweise doppelt gezählt. Dies kann bei der 3D-Darstellung in Kombination mit der automatisierten Auswertung mit Hilfe der SonoAVC Funktion des 4DView® Programms und dessen farblicher Markierung der Follikel ausgeschlossen werden. Die hohe Reproduzierbarkeit der damit erhaltenen FZ zeigt sich darin, dass die Analyse wiederholter Zählungen sehr hohe ICC-Werte von mindestens 0.88 ergab. Bei der wiederholten Bestimmung der ovariellen FZ bei Frauen wurden ähnliche Resultate erzielt²⁵. Grundsätzlich gelten klinische Messmethoden ab einem ICC-Wert von 0.75 als gut reproduzierbar².

Die FZ war am Tag 7 im Vergleich zu den anderen Zyklustagen niedriger, wobei diese Differenz ausschliesslich auf niedrigere Zahlen kleiner und mittlerer Follikel beruhte. Im weiteren Zyklusverlauf zeigte sich wieder ein Anstieg der Zahl kleiner Follikel, insbesondere bei der darauffolgenden Messung. Auch in anderen Studien wurde ein starker Abfall der FZ der kleinsten Follikelkategorie am Tag 6 nach der Ovulation, gefolgt von einem starken Anstieg zwei Tage später am Zyklustag 8, beobachtet¹⁶. Diese Feststellung kann durch die innerhalb eines Zyklus auftretenden Follikelwellen erklärt werden. Die erste Follikelwelle beginnt unmittelbar um den Zeitpunkt der Ovulation eines dominanten Follikels des vorherigen Zyklus^{8,9}, wobei mehrere Follikel ab

einer Grösse von >2 mm für eine Welle rekrutiert werden und zu wachsen beginnen^{8,9,17}. Ein dominanter Follikel wächst bis zum Tag 7 nach der Ovulation heran, hemmt das Wachstum subdominanter Follikel und führt zu deren Atresie²⁷. Während der Wachstumsphase des dominanten Follikels findet keine Rekrutierung anderer Follikel statt¹⁷. Dies ist eine mögliche Erklärung für die niedrigere FZ am Tag 7.

Eine untersuchte Kuh zeigte in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen eine unterschiedliche FZ, während bei den restlichen fünf Kühen diese in beiden Zyklen gleich blieb. Die in diversen Studien^{12,15} beschriebene hohe Konstanz in der FZ wird in der vorliegenden Untersuchung mit einem ICC Wert von 0.85 bis 0.95 bestätigt. Die Differenz in der FZ zwischen zwei Zyklen, die bei einer Kuh beobachtet wurde, beruht mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf Messfehlern, da bei mehreren Untersuchungen an verschiedenen Zyklustagen diese Unterschiede zu verzeichnen waren. Die FZ auf den Ovarien kann durch eine negative Energiebilanz, wie sie häufiger bei Milchkühen zu beobachten ist, reversibel abnehmen¹⁷. Die Gründe für den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Anstieg in der FZ zwischen zwei Zyklen sind jedoch nicht genau bekannt, da die Kühe von einem Händler gekauft worden sind und so keine genaue Anamnese zu den Tieren erhältlich war.

Schlussfolgerung

Die 3D-Sonographie ist eine geeignete und zuverlässige Methode zur Beurteilung der Follikelaktivität beim Rind. Wegen des hohen Zeit- und Kostenaufwandes sowie der Grösse und Empfindlichkeit der gegenwärtig auf dem Markt erhältlichen 3D-Ultraschallgeräte ist der Einsatz in der Praxis zurzeit noch limitiert. Aufgrund des raschen technologischen Fortschritts in diesem Bereich ist jedoch davon auszugehen, dass geeignete 3D-Ultraschallgeräte in nicht allzu ferner Zukunft auch für die Rinderpraxis verfügbar werden.

Dank

Ein besonderer Dank geht an Hanspeter Müller für die Betreuung der Kühe am Alten Strickhof und für die Hilfe und Geduld bei den Untersuchungen. Weiter möchten wir uns ganz herzlich bei Frau Regina Peukert für die Einführung und Erklärung des Voluson I Gerätes und bei der Klinik für Bildgebende Diagnostik des Tierospitals Zürich für die Erstellung der computertomographischen Bilder bedanken.

Beurteilung der Follikelzahl mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie bei zyklischen Milchkühen

A. Schweizer, F. Janett, H. Bollwein

Comptage du nombre de follicules par échographie transrectale tridimensionnelle chez les vaches laitières cyclées

L'objectif de la présente étude était d'étudier la fiabilité de l'échographie tridimensionnelle transrectale (3D-S) pour le comptage des follicules (FC) chez les vaches laitières. Sur la base du nombre de follicules, on a contrôlé s'il y avait des variations individuelles au sein et entre les différents cycles. Pour tester la fiabilité de la 3D-S, le FC a été déterminée *in vivo* sur les ovaies de 10 vaches et comparé aux résultats obtenus après l'abattage par tomodensitométrie. Pour évaluer les variations cycliques, six vaches ont été examinées à plusieurs reprises par 3D-S sur une période de deux cycles. En utilisant 3D-S, les follicules avec un diamètre moyen supérieur à 2 mm peuvent être visualisés. Le FC déterminé avec 3D-S et la tomodensitométrie ont montré une significative corrélation ($r \geq 0,86$, $p < 0,05$) et les valeurs étaient similaires ($p \geq 0,05$). Le FC différait principalement entre les individus ($p < 0,0001$) et une fluctuation modérée dans et entre deux cycles chez la même vache était apparente ($p < 0,05$). En conclusion, la 3D-S est une méthode appropriée pour la détermination du FC chez les bovins. Le FC diffère principalement entre les vaches et des fluctuations cycliques sont apparentes dans une moindre mesure.

Mots-clés: échographie 3D, follicule ovarien, bovin

Valutazione del numero di follicoli mediante ecografia tridimensionale transrettale in vacche da latte cicliche

Con il presente studio si è esaminato se il numero dei follicoli (NF) nelle vacche da latte può essere determinato accuratamente mediante l'ecografia tridimensionale transrettale (3D-S). Inoltre si è valutato se il numero dei follicoli si differenziava da animale ad animale e se il NF tra e all'interno dei differenti cicli diminuiva. Per verificare l'affidabilità della 3D-S, è stato determinato il numero dei follicoli nelle ovaie di 10 vacche usando la 3D-S *in vivo* e la tomografia computerizzata dopo la macellazione. Per l'analisi dei cambiamenti legati al ciclo, sei vacche sono state ripetutamente esaminate per due cicli tramite la 3D-S. Con la 3D-S è stato possibile rilevare dei follicoli di un diametro di 2 mm. Il numero di follicoli determinato dall'ecografia 3D e dalla tomografia computerizzata era ben correlato ($r \geq 0,86$, $p < 0,05$) e con simili valori ($p \geq 0,05$). Il numero di follicoli era soggetto principalmente a differenze specifiche dell'animale ($p < 0,0001$) e, in misura minore, a fluttuazioni all'interno e tra i cicli. I risultati mostrano che l'ecografia 3D è un metodo affidabile per la determinazione del NF. In conclusione, il numero di follicoli differisce principalmente tra le vacche, è soggetto a meno fluttuazioni legate al ciclo.

Parole chiave: ecografia 3D, ovaia, follicolo, bovino

Beurteilung der Follikelzahl mittels transrektaler dreidimensionaler Sonographie bei zyklischen Milchkühen

A. Schweizer, F. Janett, H. Bollwein

Literatur

- 1 Baris A, Togas T: Ultrasound automated volume calculation in reproduction and in pregnancy. *Fertil. Steril.* 2011; 95: 2163-2170.
- 2 Burdock EI, Fleiss JI, Hardesty AS. A new view of interobserver agreement. *Pers. Psychol.* 1963; 16: 373-384.
- 3 Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and in inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 2005; 73: 54-62.
- 4 Cohen J. A power primer. *Quant. Meth. Psychol.* 1992; 112: 155-159.
- 5 Deb S, Campell BK, Clewes JS, Raine-Fenning NJ. Quantitative analysis of antral follicle number and size: a comparison of two-dimensional and automated three-dimensional ultrasound techniques. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2010; 35: 354-360.
- 6 Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 2008; 43(Suppl. 2): 260-267.
- 7 Erickson BH. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1966; 10: 97-105.
- 8 Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 87: 223-230.
- 9 Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 61-79.
- 10 Hartung J, Kalache KDK, Chaoui R. Der 3D-Power-Doppler-Ultraschall (3D-PDU) in der fetalen Diagnostik. *Ultraschall Med.* 2004; 25: 200-205.
- 11 Hata T, Hata K, Noguchi J, Kanenishi K, Shiota A. Ultrasound for evaluation of adnexal malignancy: from 2D to 3D ultrasound. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2011; 37: 1255-68.
- 12 Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 1687-1695.
- 13 Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans AC, Ireland JJ. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 2008; 79: 1219-1225.
- 14 Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011; 23: 1-14.
- 15 Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Smith GW, Hou X, Davis JS, Lonergan P, Evans AC, Ireland JJ. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* 2009; 80: 1272-1281.
- 16 Lucy MC, De La Sota RL, Staples CR, Thatcher WW. Effect of dietary calcium salts of long chain fatty acids (CaLCFA), energy intake, and lactation on ovarian follicular dynamics in Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 1991; 69 (Suppl. 1): 451.
- 17 Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 1992; 70: 3615-3626.
- 18 Merz E., Bahlmann F., Weber G. Volume scanning in the evaluation of fetal malformation; a new dimension in prenatal diagnosis. *Ultrasound Obstet. Gynaecol.* 1995; 5: 222-27.
- 19 Merz E, Welter C. 2D and 3D ultrasound in the evaluation of normal and abnormal fetal anatomy in the second and third trimester in a level III center. *Ultraschall Med.* 2005; 26: 9-16.
- 20 Monniaux D, Drouihet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé J, Sapa J, Phocas F, Dupont J, Dalbiès-Tran R, Fabre S. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.* 2013; 25: 1-16.
- 21 Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans ACO. Low numbers of ovarian follicles > 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2012; 95: 2355-2361.
- 22 Raine-Fenning N, Jayaprakasan K, Clewes J. Picture of the month. Automated follicle tracking facilitates standardization and may improve work flow. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2007; 30: 1015-1018.
- 23 Raine-Fenning N, Jayaprakasan K, Clewes J, Joergner I, Dehghani Bonaki S, Chamberlain S, Devlin L, Priddle H, Johnson I. SonoAVC: a novel method of automatic volume calculation. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2008; 31: 691-696.
- 24 Raine-Fenning N, Jayaprakasan K, Chamberlain S, Devlin L, Priddle H, Johnson I. Automated measurements of follicle diameter: a chance to standardize? *Fertil. Steril.* 2009; 91: 1469-1472.
- 25 Scheffer GJ, Broekmans FJM, Bancsi LF, Habbema JDF, Looman CWN, Te Velde ER. Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2002; 20: 270-275.
- 26 Singh JM, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 2004; 62: 227-243.
- 27 Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 101: 547-555.
- 28 Weissmann C; Hergan K. Aktueller Stand der 3D-/4D-volumensonographie der mamma. *Ultraschall Med.* 2007; 28: 273-282.

Korrespondenzadresse

Adrian Schweizer
Tierarztpraxis Kreuzberg AG
Felsbachriet 6
9473 Gams
E-Mail: schweizer@meintierarzt.ch