

# Diagnozowanie i monitorowanie ciąży u klaczy poprzez oznaczanie estrogenów w kale

AGNIESZKA SKOLIMOWSKA, TOMASZ JANOWSKI, MAŁGORZATA GOŁONKA\*

Katedra Położnictwa i Patologii Rozrodu Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie,  
ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn

\*Stacja Badawcza Rolnictwa Ekologicznego i Hodowli Zachowawczej Zwierząt PAN w Popielnie, 12-222 Wejsuny

Skolimowska A., Janowski T., Golonka M.

## Pregnancy diagnosis and monitoring in mares via estrogens determination in feces

### Summary

The aim of this study was to evaluate the utility of the mean fecal estrogen concentration for the diagnosis and monitoring of pregnancy. Fecal samples were collected from 30 pregnant mares (17 Thoroughbred and 13 Polish Primitive Horses) once a week from mating to the 120th day of pregnancy and then afterward until parturition or pathological interruption of pregnancy – once every two weeks. Total unconjugated fecal estrogen concentration was evaluated by radioimmunoassay (RIA) with extraction. The border level differentiating pregnant from non-pregnant mares was obtained by the addition of value 3 standard deviations to mean non-pregnant mares estrogen concentration ( $x+3SD$ ). Calculated at 41.88 ng/g feces, it has also been demonstrated that the possibility of pregnancy diagnosis by this method exists from 16 weeks post-mating and lasts during the 2 and 3 trimester of pregnancy until parturition. Fecal estrogen profiles obtained in individual mares were fully related to the physiological or pathological course of pregnancy. Early embryo and fetal death was accompanied by low estrogen concentration. Abortions during late pregnancy, however, were connected with the gradual or sudden decrease of high fecal estrogen concentration. The results of this study indicated the practical importance of this method. Other applications were also discussed in this publication.

**Keywords:** mares, pregnancy, feces, estrogens

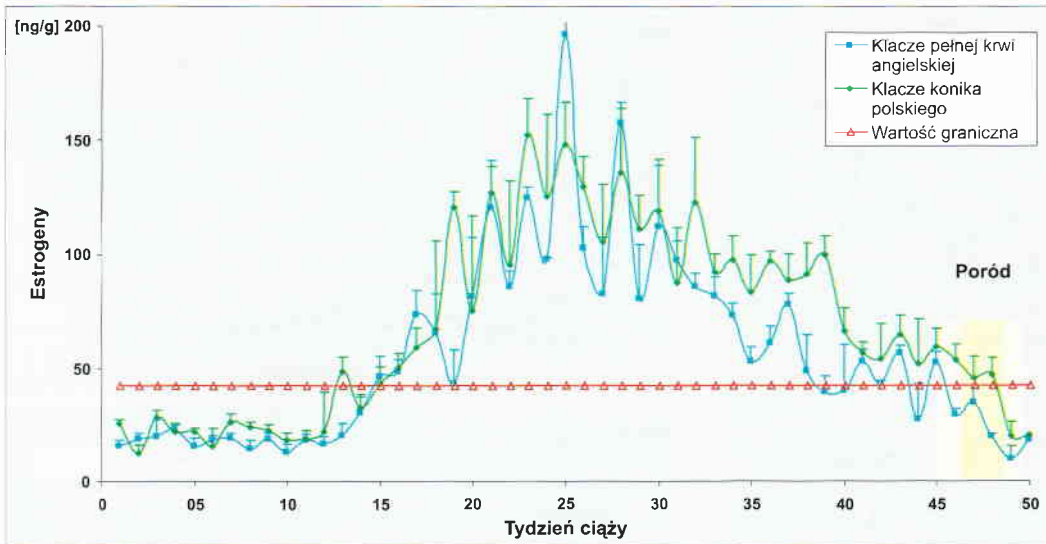
Konie są gatunkiem szczególnie narażonym na utratę ciąży w różnych fazach jej rozwoju, co związane jest z późną implantacją, długo trwającym procesem placentacji oraz zmiennymi źródłami progesteronu (1, 3, 7, 8, 14, 17, 20, 21). Z tego powodu u zwierząt tych równie ważne jak wczesne diagnozowanie ciąży, jest kontrolowanie jej prawidłowego przebiegu (4, 18). Nieinwazyjne monitorowanie ciąży w okresie od około 100. dnia do porodu umożliwia oznaczanie koncentracji estrogenów w kale (16, 18). Możliwość stosowania tej metody u koniowatych wynika z produkcji dużych ilości estrogenów, zwłaszcza w drugim i trzecim trymestrze ciąży (2, 6, 18, 19). Ich źródło stanowi jednostka płodowo-łożyskowa, której funkcjonowanie polega na metabolicznej współpracy płodu i łożyska. Gonady płodu wytwarzają dehydroepiandrosteron (DHEA), który w płodowej części łożyska jest wykorzystywany jako substrat w biosyntezie estrogenów. Warunkiem niezbędnym do fizjologicznego funkcjonowania tego systemu jest żywotność płodu (7, 11, 15, 16, 18). Estrogeny drogą krążenia płodowo-łożyskowego dostają się do krwiobiegu matki, skąd duże ich ilości, poprzez żółć i przewód pokarmowy, są wydalane z kałem (2, 10, 11, 18).

Procesy zaburzające prawidłowe funkcjonowanie jednostki płodowo-łożyskowej, prowadzące do patologicznego przerwania ciąży, skutkują szybkim spadkiem koncentracji estrogenów do niskich, charakteryzujących klacze nieżrebne, poziomów (6, 9, 10, 12, 18). Tematyka powyższa nie była dotychczas poruszana w literaturze krajowej, zaś piśmiennictwo światowe jest nadal nieliczne.

Celem badań było określenie przydatności oznaczania estrogenów w kale do diagnozowania ciąży oraz monitorowania jej przebiegu.

### Materiał i metody

Badaniami objęto 30 ciężarnych klaczy, w tym 17 klaczy rasy pełna krew angielska pochodzących ze Stadniny Koni Rzeczna oraz 13 rasy konik polski ze Stacji Badawczej PAN w Popielnie. Próbkę kału do badań pobierano w okresie od krycia do 120. dnia ciąży – jeden raz w tygodniu, a następnie do porodu lub patologicznego przerwania ciąży – jednorazowo w ciągu dwóch tygodni. Zgodnie z klasycznymi zasadami ciążę diagnozowano badaniami rektalnymi i ultrasonograficznymi, wykonywanymi około 20. oraz między 40. a 50. dniem po kryciu, a następnie kontrolowano ją poprzez obserwacje i badania kliniczne.



Ryc. 1. Koncentracja estrogenów w kale u klaczy dwóch ras z fizjologicznym przebiegiem ciąży

Kał pobierano w godzinach rannych z podłoża w indywidualnych boksach do plastikowych, przygotowanych do tego celu próbek. Sporadycznie, przy okazji badania rektalnego, był on pozyskiwany bezpośrednio z prostnicy. Podczas transportu do laboratorium próby schładzano, a następnie przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  aż do analiz.

Koncentrację całkowitych estrogenów nieskoniugowanych w kale oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA) z ekstrakcją (18; 19). Czułość metody wynosiła 14,1 pg, zaś zmienność wewnątrz- i zewnątrzserijna odpowiednio 5,5% i 13,9%.

Koncentracja estrogenów w kale potwierdzająca ciążę (wartość graniczna) została ustalona poprzez określenie średniej zawartości tych hormonów u zwierząt nieciążarnych oraz dodanie do niej wartości trzech odchyłek standardowych ( $x + 3 \text{ SD}$ ). Badania te wykonano u 7 nieżrebnych, dojrzałych płciowo klaczy pełnej krwi angielskiej, u których próbki kału ( $n = 42$ ) gromadzono w odstępach dwutygodniowych przez trzy kolejne miesiące wiosenne. Obliczenia wykonano przy użyciu programów komputerowych Microsoft Access 2000 i Microsoft Excel 2000.

### Wyniki i omówienie

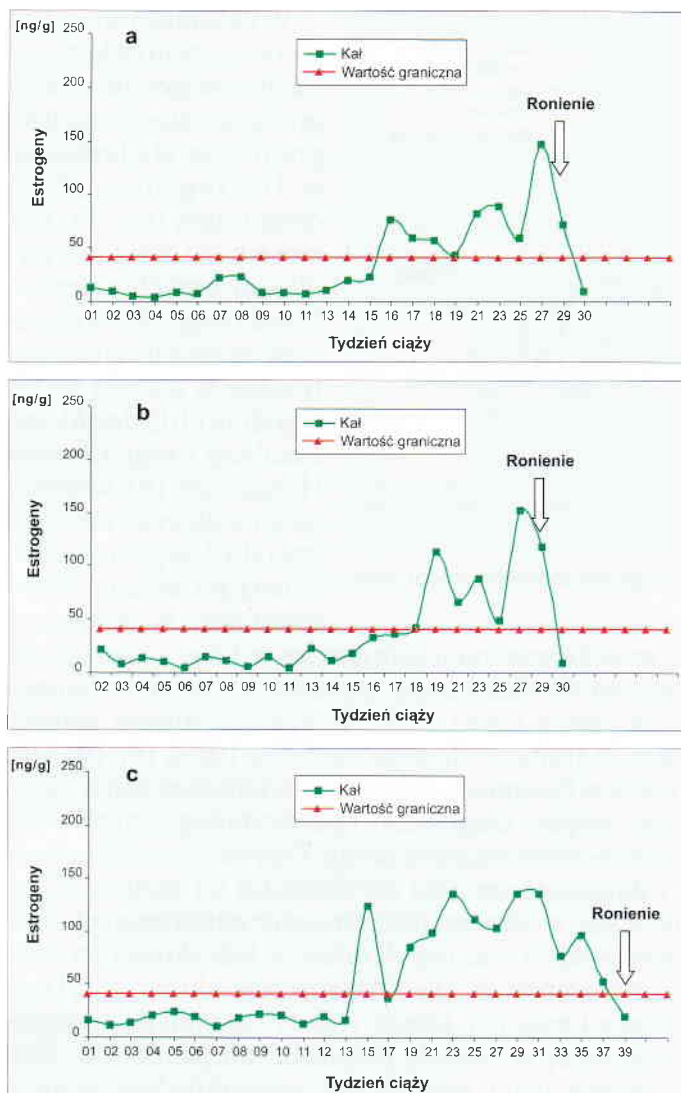
Diagnozowanie ciąży u klaczy przy użyciu oznaczania koncentracji estrogenów w kale polega na jak najwcześniejszym stwierdzeniu różnicy w poziomach tych hormonów u zwierząt ciężarnych i nieciążarnych. Przyjęto uważać, że różnicę tę wyznacza wartość graniczna definiowana jako średnia koncentracja estrogenów u klaczy nieżrebnych, powiększona o wielkość trzech odchyłek standardowych ( $x + 3 \text{ SD}$ ) (6, 10, 11, 16). W niniejszej pracy wartość ta wynosiła 41,88 ng/g kału ( $18,64 + 3 \times 7,746 \text{ ng/g}$ ). Zgodnie z sugestią niektórych autorów, do jej obliczenia włączono także wartości estrogenów u klaczy w rui (2, 16, 18). Wzrost poziomu tych hormonów w *estrus* znajduje bowiem odbicie w ich poziomie w kale, co podnosi wartość graniczną. Wydłuża to okres między kryciem a możliwością stwierdzenia ciąży tą metodą, podnosząc jednak przy tym trafność diagnoz.

W badaniach własnych pierwszy wzrost koncentracji estrogenów w kale przekraczający wartość graniczną stwierdzono w 16. tygodniu (112. dzień) ciąży (ryc. 1). Termin ten jest zbliżony z wynikami innych autorów. Möstl i wsp. (16) bowiem najwcześniej diagnozowali ciążę tą metodą w 15. tygodniu (105 dzień), zaś Bamberg i wsp. (2) oraz Henderson (6) widzieli taką możliwość począwszy od 17. tygodnia (120. dzień) po kryciu. Natomiast dużo wcześniejszy

wzrost koncentracji estrogenów w kale, bo przypadający na 90. dzień ciąży wykazali w swych badaniach Kirkpatrick i wsp. (10). Wszyscy cytowani autorzy ocenili trafność diagnoz na 95%-100% (6, 10, 16). Także w badaniach własnych stwierdzono pełną zgodność między diagnozami endokrynologicznymi i kliniczno-ultrasonograficznymi. Przytoczone rozbieżności dotyczące terminu przydatności tej metody mogą wynikać z odmienności procedur analitycznych oraz osobniczych i rasowych różnic w łożyskowej produkcji estrogenów (8, 18). Dysproporcje takie opisują Henderson i wsp. (6), którzy w indywidualnych przypadkach ciążę tą metodą rozpoznawali już 50.-60. dnia po stanowieniu, podczas gdy generalnie było to możliwe dopiero około 140.-150. dnia. Inni autorzy także zwracają uwagę na rozbieżności istniejące u poszczególnych zwierząt. Uważają oni jednak, że okres między 105. a 120. dniem po pokryciu stanowi optymalne stadium ciąży, w którym jej diagnozowanie jest możliwe u wszystkich klaczy (2, 10-12, 16). Termin ten jest także zgodny z obserwacjami własnymi.

Stwierdzona w niniejszych badaniach możliwość diagnozowania ciąży w 16. tygodniu jest znacznie późniejsza w stosunku do terminu stosowania badań rektalnych i ultrasonograficznych. Wyklucza to w zasadzie praktyczną użyteczność omawianej metody do rutynowego diagnozowania wczesnej ciąży, jednakże w niektórych przypadkach może być ona przydatna. U koniowatych bowiem, ze względu na często występujące zjawiska resorpcji i utraty ciąży (3, 8, 9, 12, 14, 17, 20, 21), niezależnie od wczesnego diagnozowania, zaleca się jej 1-2-krotne potwierdzenie w późniejszych fazach (4). Metoda oznaczania estrogenów w kale mogłaby zatem pełnić funkcję kontrolnego badania uzupełniającego u klaczy hodowlanych, pozwalającego dodatkowo potwierdzać żywotność płodów (6). Okresem szczególnym jest zwłaszcza 5.-7. miesiąc ciąży, kiedy ciężar rosnącego płodu ściąga macicę w głąb jamy brzusznej, utrudniając lub uniemożliwiając jej

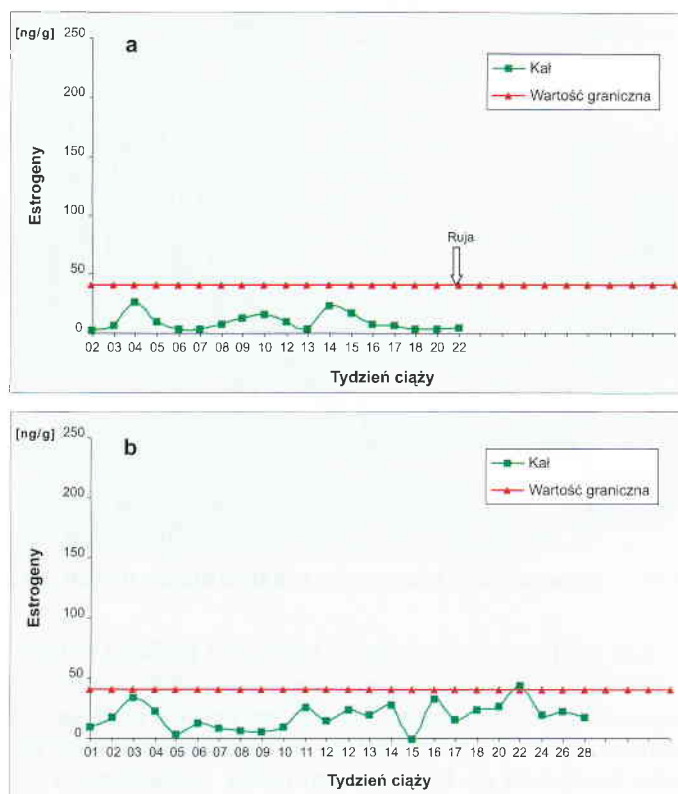




Ryc. 2. Koncentracja estrogenów w kale u klaczy z poronieniami

prawidłową palpacją (4). Możliwość szerokiego wykorzystania omawianej metody do badania na ciążę wynika głównie z nieinwazyjnego sposobu pobierania próbek do badań. Przez to może ona znaleźć zastosowanie u klaczy o szczególnie nerwowym temperamencie, jak również u koni ras miniaturowych. U zwierząt tych klasyczne badanie *per rectum* jest często trudne lub niemożliwe do wykonania ze względu na stosunki anatomiczne (5, 6, 10). Kolejne zastosowanie stanowią konie hodowców, którzy hołdują przesądowi o szczególnej wrażliwości źrebnych klaczy na badania palpacyjne oraz zwierzęta utrzymywane w hodowli ekstensywnej, a także w rezerwach i ogrodach zoologicznych (5, 6, 10, 11, 18).

Praktyczne zastosowanie metody oznaczania estrogenów w kale nie ogranicza się jednak wyłącznie do diagnozowania ciąży. Pozwala ona także na kontrolowanie jej przebiegu wraz z oceną żywotności płodu (6, 16). Wynika to z funkcjonowania u koniowatych opisanej we wstępnej części pracy jednostki płodowo-łożyskowej (6, 7, 11, 15). Zaburzenia funkcji łożyska lub śmierć płodu powodują spadek koncentracji es-



Ryc. 3. Koncentracja estrogenów w kale u klaczy z resorpcją zarodków/płodów

trogenów do wartości typowych dla klaczy nieciążarnych (6, 9, 10, 18). Ten sposób kontrolowania ciąży jest możliwy w okresie drugiego i trzeciego trymestru ciąży (2, 6, 18).

Dane piśmiennictwa wskazują na potrzebę monitorowania przebiegu ciąży u klaczy i możliwość wykorzystania do tego celu badanej metody (6, 10). Henderson i wsp. (6) opisują przypadek klaczy z patologicznym przebiegiem ciąży oraz towarzyszący mu spadek poziomu estrogenów w kale. Patologiczne przerwanie ciąży w różnych fazach jej rozwoju obserwowano także w badaniach własnych. Łącznie u trzech klaczy miały miejsce ronienia, występujące w 208., 213. i w 276. dniu ciąży (ryc. 2). Zaburzeń tych nie poprzedzały objawy kliniczne, z wyjątkiem jednej klaczy, u której kilka tygodni wcześniej obserwowano utratę masy ciała. W przypadku tym znaczne obniżenie wartości estrogenów miało miejsce przed przerwaniem ciąży (ryc. 2c), podczas gdy w pozostałych wystąpiło dopiero po wyparciu płodów (ryc. 2a, 2b). Różny przebieg profili estrogenów w tych przypadkach wskazuje na odmienne mechanizmy patologiczne, które doprowadziły do przerwania ciąży. Hoffman (7) oraz Meinecke i Gips (13) nie potwierdzają możliwości przewidywania ronienia na podstawie analizy poziomu estrogenów. Opisany powyżej przypadek (ryc. 2c) przeczy temu twierdzeniu, jednakże możliwość ta jest zapewne ograniczona do pojedynczych zwierząt.

W badaniach własnych obserwowano także dwa przypadki zamierania i resorpcji płodów (ryc. 3). Pozytywne wyniki badań rektalnych i ultrasonograficz-

nych na ciążę oraz profile estrogenów w kale wskazują, że w przypadkach tych ciąży została przerwana w okresie między 50. a 100. dniem po kryciu. Koncentracja estrogenów potwierdziła u tych zwierząt brak prawidłowego rozwoju ciąży, bowiem począwszy od 15.-16. tygodnia nie nastąpił u nich wzrost poziomu tych hormonów do wartości typowych dla żrebnych klaczy. W jednym z tych przypadków, u klaczy pełnej krwi angielskiej ruja wystąpiła w 22. tygodniu po kryciu, zaś u klaczy konika polskiego w okresie obserwacji nie zauważono jej objawów. Trudno jest jednoznacznie ustalić przyczynę tego zjawiska. Należy tutaj brać pod uwagę możliwość długotrwałego hamowania sekrecji gonadotropin przysadkowych przez gonadotropinę kosmówkową, pochodzącą z kubków endometrialnych, funkcjonujących niezależnie od dalszego rozwoju ciąży, oraz wpływ sezonowości na aktywność jajników klaczy (4, 7, 18).

Reasumując, przeprowadzone badania wykazały, iż w okresie 2. i 3. trymestru ciąży koncentracja estrogenów w kale klaczy jest wysoka i znacznie różni się od jej zawartości u zwierząt niezrebných. Możliwość trafnego diagnozowania ciąży na tej podstawie istniała od ok. 110 dnia. Ponadto, profile estrogenów u indywidualnych klaczy korespondowały z fizjologicznym lub patologicznym przebiegiem ciąży. Trwale niskie koncentracje estrogenów towarzyszyły zamieraniu zarodków i płodów, natomiast w przypadkach poronień obserwowano spadek poziomu tych hormonów w kale do niskich wartości. Możliwość diagnozowania ciąży oraz kontrolowania jej fizjologicznego i patologicznego przebiegu dotyczyła w równym stopniu zwierząt obu badanych ras. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje własne, sugerujące bardzo zbliżoną sekrecję estrogenów podczas ciąży u koni różnych ras (18, 19).

### Piśmiennictwo

- Allen W. R., Kydd J. H., Boyle M. S., Antczak D. F.: Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *J. Reprod. Fert.* 1987, Suppl. 35, 197-209.
- Bamberg E., Choi H. S., Möstl E., Wurm W., Lorin D., Arbeiter K.: Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares. *Equ. Vet. J.* 1984, 16, 537-539.
- Darenius K., Kindahl H., Knudsen O., Madej A., Edqvist L. E.: PMSG, progesterone and estrone sulphate during normal pregnancy and early fetal death. *J. Reprod. Fert.* 1982, Suppl. 32, 625-626.
- Ginther O. J.: Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. *Equi-services, USA* 1986, s. 122-124, 166, 229-246, 253-282.
- Henderson K., Stevens S., Bailey C., Hall G., Stewart J., Wards R.: Comparison of the merits of measuring equine chorionic gonadotrophin (eCG) and blood and faecal concentrations of estrone sulphate for determining the pregnancy status of miniature horses. *Reprod. Fert.* 1998, 10, 441-444.
- Henderson K. M., Perkins N. R., Wards R. L., Stewart J. I.: Non-invasive pregnancy determination in mares by enzyme immunoassay of estrone sulphate concentrations in faeces. *Proc. New Zealand Society Anim. Prod.* 1997, 57, s. 234-236.
- Hoffmann B., Gentz F., Failing K.: Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG- concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 1996, 31, 717-723.
- Jeffcott L. B., Hyland J. H., McLean A. A., Dyke T., Robertson-Smith G.: Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day 45 of gestation in mares. *Reprod. Fert.* 1987, Suppl. 35, 461-467.
- Kasman L. H., Hughes J. P., Stabenfeldt G. H., Starr M. D., Lasley B. L.: Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. *Anim. J. Vet. Res.* 1988, 49, 184-187.
- Kirkpatrick J. F., Lasley B. L., Shideler S. E., Roser J. F., Turner J. W.: Non-instrumented immunoassay field tests for pregnancy detection in free-roaming feral horses. *J. Wildl. Manag.* 1993, 57, 168-173.
- Kuckelkorn B.: Assessment of pregnancy in kiang mares (*Equus hemionus holdereri*) using estrogen determination in faeces. *Theriogenology* 1994, 42, 37-41.
- Lucas Z., Reaside J. I., Betteridge K. L.: Non-invasive assessment of the incidences of pregnancy and pregnancy loss in the feral horses of Sable Island. *J. Reprod. Fert.* 1991, Suppl. 44, 479-488.
- Meinecke B., Gips H.: The endocrine status of clinically conspicuous mares during peripartum period. *Prakt. Tierärz.* 1990, 18, 513-523.
- Miller J. F., Glue J., Williamson E., Gordon Y. B., Sykes A., Grudzinskas J. G.: Foetal loss after implantation. *Lancet* 1980, 2, 554-556.
- Möstl E.: The horse feto-placental unit. *Exp. Clin. Endocrinol.* 1994, 102, 166-168.
- Möstl E., Nobauer H., Choi H. S., Wurm W., Bamberg E.: Trächtigkeitsdiagnose bei der Stute mittels Oestrogenbestimmung im Kot. *Prakt. Tierärz.* 1983, 64, 491-492.
- Sharp D. C.: Factors associated with the maternal recognition of pregnancy in mares. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.* 1980, 2, 277-290.
- Skolimowska A.: Monitorowanie ciąży u koniowatych przy użyciu metody oznaczania estrogenów w kale. *Praca dokt., Wydz. Med. Wet., UWM Olsztyn* 2002.
- Skolimowska A., Janowski T., Golonka M.: Koncentracja estrogenów w kale i krwi u klaczy ras pełna krew angielska i konik polski podczas ciąży. Przyjęte do druku w *Medycynie Wet.*
- Wiśniewski E., Dąbrowska J.: Wczesna obumieralność zarodków, ronienia i przedwczesne porody u klaczy. *Zycie Wet.* 1996, 2, 41-46.
- Woods G. L., Baker C. B., Baldwin J., Ball B. A., Bilinski J., Cooper W. L., Ley W. B., Mank E. C., Erb H. N.: Early pregnancy loss in brood mares. *J. Reprod. Fert.* 1987, Suppl. 35, 453-459.

Adres autora: dr Agnieszka Skolimowska, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn; e-mail: slonce66@wp.pl

**STUDDERT M. J., HARTLEY C. A., DYNON K., SANDY J. R., SLOCOMBE R. F., CHARLES J. A., MILNE M. E., CLARKE A. F., EL-HAGE C.: Masowe zachorowania na zapalenie mózgu i rdzenia wywołane przez herpeswirus koni typ-1: nowe dane na podstawie identyfikacji wirusa testem PCR i ELISA do wykrywania swoistego przeciwciała dla EHV-1. (Outbreak of equine herpesvirus type 1 myeloencephalitis: new insights from virus identification by PCR and the application of an EHV-1-specific antibody detection ELISA). *Vet. Rec.* 153, 417-423, 2003 (14)**

Zaburzenia neurologiczne wystąpiły u 5 klaczy karmiących potomstwo w stadzie liczącym 74 klacze, 58 żrebiąt i 6 ogierów. Trzy klacze, u których wystąpiły porażenia kończyny, poddano eutanazji. Z dwóch klaczy, które przeżyły, jedna poroniła płód zakażony herpeswirusem koni typ 1 (EHV-1), druga urodziła w 283. dniu ciąży atakcyjne żrebie. U klaczy poddanych eutanazji zdiagnozowano zapalenie mózgu i rdzenia, a zakażenie EHV-1 testem PCR i testem ELISA. U 10 żrebiąt występował silny śluzowo-ropny wyciek z nosa. W surowicy chorych klaczy pobranej 7. dnia choroby nie stwierdzono przeciwciał dla EHV-1 lub miano przeciwciał było na granicy ich wykrywalności. Po kilku dniach u 2 klaczy miano swoistych przeciwciał wzrosło. W surowicy 5 zdrowych klaczy badanych 7. i 13. dnia po wystąpieniu choroby w stadzie stwierdzono przeciwciała dla EHV-1.