Nowsze możliwości diagnozy ciąży u przeżuwaczy – ograniczenia, zalety, wykorzystanie

JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, MAGDALENA HERUDZIŃSKA, JULITA KMIECIK, ALEKSANDRA KIERBIĆ, BARTŁOMIEJ M. JAŚKOWSKI*, MAREK GEHRKE

Centrum Weterynarii, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

*Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Otrzymano 27.10.2017

Zaakceptowano 12.12.2017

Jaśkowski J. M., Herudzińska M., Kmiecik J., Kierbić A., Jaśkowski B. M., Gehrke M.
New possibilities for pregnancy diagnosis in ruminants: Limitations, advantages, use

Summary

Early pregnancy diagnosis in ruminants, especially in high production herds, is one of the most important components of reproduction management. Reducing the time between insemination and the exclusion or confirmation of pregnancy is of major economic importance. That is why the traditional method of pregnancy examination by transrectal palpation is increasingly complemented by additional tests, such as ultrasonography. An alternative to these methods of pregnancy diagnosis are also simple field tests. The best known are tests for progesterone and estrone sulphate concentrations. Over the last few years, the measuring of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) has also been gaining popularity. In cattle, this method can be used as early as the 28th day of pregnancy, when the plasma concentration of PAGs exceeds 1ng/ml. Maximum values of pregnancy-associated glycoproteins are observed about day 240 after fertilization. After calving, their level quickly decreases. In sheep, the concentration of PAGs increases significantly in the 3rd and 4th weeks of gestation and reaches its maximum level around the 9th week. In goats, the concentration of PAGs differs between races, but its measurement can be quite a reliable indirect method of pregnancy diagnosis. The PAGs value in this species grows until about the 8th week after insemination and, depending on the breed, reaches a maximum value of 50 to 69 ng/ml. One limitation for the use of PAGs field tests may be false positives which occur after the death of the embryo. Similarly, an increased PAGs concentration can persist for up to about 70 days after calving. Moreover, the PAGs concentration is also affected by the health, age and milk production of the female. The advantages of field tests are the simplicity of performance, the ease of reading and interpreting the results and the short time needed to complete the entire procedure. Field tests based on the commonly used ELISA method are characterized by low invasiveness (blood, milk), combined with high sensitivity and specificity. Their rapid application under field conditions makes them an excellent extension of diagnostic capabilities, especially in large herds of cows,

Keywords: pregnancy-associated glycoproteins (PAGs), pregnancy diagnosis, field tests, cows

W celu zwiększenia płodności w nowoczesnej hodowli bydła mlecznego, okres między inseminacją a stwierdzeniem ciąży powinien być jak najkrótszy. Dlatego jednym z rozwiązań jest możliwie wcześnie wykrycie zwierząt nieciężarnych i ich szybka, ponowna inseminacja. Do podstawowych metod w diagnostyce ciąży u krów zalicza się badanie kliniczne *per rectum* oraz powszechne już dziś badanie ultrasonograficzne (27, 30, 37). Chemiczne testy ciążowe są alternatywą dla tradycyjnych metod diagnozowania ciąży (badania manualnego lub USG) w rozrodzie krów i jałówek. Do najbardziej znanych należy badanie stężenia progesteronu oraz siarcznanu estronu. W przy-

padku progesteronu jego wysoka wartość wskazuje wprawdzie na obecność aktywnego ciała żółtego, nie jest jednak bezwzględnym dowodem obecności ciąży. Produkcja hormonu, w przypadku śmierci zarodka około 13.-15. dnia po zapłodnieniu trwa jeszcze przez pewien czas mimo wysłania sygnału o utracie zarodka. Wiarygodność tej metody wynosi 80%. Sprzężony siarczan estronu syntetyzowany jest od 70. dnia ciąży w nieuszkodzonym łożysku, w praktyce jednak odpowiedni jego poziom wykrywalny jest dopiero ok. 120. dnia ciąży (> 1 ng/ml osocza krwi). Testami laboratoryjnymi oznaczać można także stężenie EPF (early pregnancy factor), interferonu tau oraz czynnika ISG15

i białka DG29. Wykrywanie wczesnego czynnika ciążyowego (EPF) okazało się zawodne, zwłaszcza przy wykrywaniu samic niecielných. Dokładność metody w tych przypadkach nie przekraczała 50% (3, 12, 14). Pozostałe testy nie są wykorzystywane w praktyce terenowej (14, 35).

Ostatnio w diagnostyce wczesnej ciąży popularność zyskuje badanie swoistych białek ciążyowych (PAG – pregnancy-associated glycoproteins) (4, 9, 24, 25, 46). Glikoproteiny związane z ciążą (PAG) są enzymami proteolitycznymi, z grupy proteinaz asparaginowych (AP). Syntetyzowane są one przez jedno- lub dwujądrowe komórki olbrzymie łożyska przeżywające kilkanaście dni po zapłodnieniu. We krwi krów pojawiają się w okresie mocowania się łożyska (10). Dotychczas zbadano i opisano 22 izoformy bPAG, różniące się między sobą stopniem glikozylacji. Podzielono je na 3 główne podrodziny (boPAG-1, boPAG-2 i boPAG-8) ze względu na zgodność aminokwasową cząsteczek i ich powiązania filogenetyczne (44).

PAG-1, zwana także glikoproteiną główną, występuje u krów będących w ciąży, od okresu blastocysty do porodu. Udowodniono, że ma ona swój udział w procesie implantacji zarodka i placentogenezie. PAG-2, tzw. gonadotropowo podobny PAG, wykazuje z kolei działanie luteotropowe. Do jednych z głównych glikoprotein ciążyowych należy też PAG-8 (pepsynogeno podobny PAG), jednak mimo wysokiego stężenia podczas ciąży jego rola nie została jednoznacznie określona (44). PAG-1 jest wskaźnikiem prawidłowego rozwoju łożyska i płodu, natomiast PAG-2 stanowi marker do przewidywania i wykrywania poronień u ciężarnych samic (38). Według różnych danych glikoproteiny te są wykrywalne we krwi już od 18.-28. dnia ciąży (8). Ich poziom między 18. a 42. dniem po inseminacji jest zróżnicowany i wynosi od 1,25 w 18. dniu do 3,47 ng/ml w 41. dniu po zapłodnieniu (9). Podczas ciąży stężenie bPAG we krwi systematycznie rośnie do 240. i 105. dnia ciąży, odpowiednio, u krów i bawolic, a następnie utrzymuje się przez cały okres jej trwania (2, 44). Wartości stwierdzone w szczytowym okresie ich sekrecji (240. dzień) mogą osiągać 160 ng/ml, w skrajnych przypadkach nawet powyżej 2900 ng/ml (9, 43). Podobne tendencje notuje się także w mleku, przy czym poziom PAG jest dwukrotnie niższy niż we krwi (8, 11). Wartości PAG powyżej 1 ng/ml (osiągane od 28. dnia po zapłodnieniu) jednoznacznie wskazują na ciążę (27). Jednocześnie w 23. dniu po zapłodnieniu czułość metody wynosi 23%, natomiast w 28. dniu – 98% przy 100% swoistości (właściwe rozpoznanie krów niecielných) (3). Wyższy poziom PAG stwierdza się u krów pierwszeństwa niż u wieloródek (33). Stwierdzono, że profil metabolitów PGF_2 , kortyzolu, progesteronu i PAGs zmienia się w przypadku urodzenia martwych płodów oraz trudnych porodów (22). Kortyzol jest odpowiedzialny za obniżanie się osocznego i tkankowego poziomu progesteronu oraz

podniesienie się koncentracji estrogenów pod koniec ciąży (21, 31). Poziom PAG jest niski podczas porodu, w przypadku rodzenia się cieląt martwych lub niskiej żywotności (21). Chociaż stężenie PAG w obwodowej krwi matek nie różniło się między krowami z zatrzymaniem łożyska (RFM) i bez tej komplikacji, to jednak przypuszcza się, że jego lokalne stężenie w łożysku może być w RFM wyższe. Sugeruje to możliwość lokalnej roli regulacyjnej PAG w uwalnianiu błon płodowych (16).

U owiec wysoki poziom PAG we krwi notowany jest od 28. do 42. dnia po zapłodnieniu (6). Pozytywny wynik oznaczenia PAG jest równoznaczny ze stwierdzeniem ciąży (6, 10, 11, 33).

Ostatnio pojawiły się interesujące badania dotyczące możliwości wykorzystania oznaczania stężenia PAG do rozpoznawania ciąży bliźniaczej u bydła. Zarówno w 28., 35., jak i 42. dniu ciąży bliźniaczej stężenie PAG we krwi samicy było wyższe niż w przypadku ciąży pojedynczych i wynosiło, odpowiednio, 6,5 ng/ml osocza krwi krowy dla ciąży bliźniaczej i 4,9 ng/ml w przebiegu ciąży pojedynczej w 28. dniu ciąży. Czułość wyżej opisanej metody diagnozowania ciąży bliźniaczych wynosiła 73-76% (w zależności od oznaczanej grupy glikoprotein, 1. lub 2.), a swoistość testu wahała się w granicach 74-80%. Jak podaje autor, zastosowanie testów do oznaczania stężenia PAG może być użyteczną i skuteczną metodą przewidywania ciąży bliźniaczej na wczesnym etapie rozwoju (13).

Testy diagnostyczne PAG

Mimo pewnych wad testy do oznaczania PAG wykorzystywane są na coraz szerszą skalę w dużych stadach bydła mlecznego w Europie zachodniej i niektórych krajach Europy środkowej (8). Pewną korzyścią z ich stosowania jest możliwość przeprowadzenia badania na cielnosc według ustalonego wcześniej harmonogramu, obniżenie kosztów przy – co najistotniejsze – wysokiej czułości testu. W przypadku oznaczeń prowadzonych w laboratoriach do wad tej metody należy często długie oczekiwanie na wynik. Mimo pewnych niedogodności, zainteresowanie testami PAG rośnie. W Ameryce Północnej dostępne są takie testy, jak: BioPRYN, BioTracking, LLC, Moscow, ID; DG29, Conception Animal Reproduction Technologies, Beaumont, QC; IDEXX Bovine Pregnancy Test, IDEXX Laboratories, Inc, Westbrook, ME) (8). Ich możliwości diagnostycznych dowodzą badania. W jednym z nich oceniano czułość testu u krów mlecznych wykorzystując test ciążyowy (IDEXX Milk Test, Westbrook, ME) umożliwiając wykrywanie PAG w mleku. W pierwszym badaniu badano ciążę w 33.-52. dniu po inseminacji, w drugim w 60.-74. Dokładność testu w przypadku krów cielných i niecielných wynosiła 99% i 98%, odpowiednio, dla pierwszego i drugiego badania. W drugim z kolei eksperymencie badano stężenie PAG w mleku poczynając od, odpowiednio, 2. i 4. dnia po inseminacji

Tab. 1. Wartości parametrów oceny wiarygodności diagnostycznej wybranych testów do wczesnego wykrywania ciąży

Test	Materiał	Dzień po AI/TET	Dokładność [%]	Swoistość [%]	Czułość [%]	Wartość predykcyjna dodatnia [%]	Wartość predykcyjna ujemna [%]	Autor
TU*	–	27	93,8	96,2	93,8	89,7	97,5	Silva (2007) (42)
PAG ELISA	osocze	27	93,7	91,7	96,3	89,7	97,1	
IDEXX TEST MILK-ELISA	mleko	60	95,0	95,5	99,2	99,8	80,8	LeBlanc (2013) (25)
IDEXX TEST MILK-ELISA	mleko	33-52	99,0	97,9	100	98,5	100	Lawson (2014) (24)
IDEXX TEST MILK-ELISA	mleko	60-74	98,0	100	97,8	100	83,3	
ELISA-MPT	mleko	41	97,4	90,3	100	96,4	100	Commun (2016) (4)
ELISA	osocze/surowica	41	99,0	96,8	98,1	93,8	100	

Objaśnienia: *TU = transrektalna ultrasonografia

w tygodniowych odstępach. Badanym materiałem były próbki mleka i surowicy, odpowiednio, 17 i 16 krów. Eksperyment prowadzono do momentu ustalenia właściwej diagnozy. W badaniach tych stwierdzono, że trafną diagnozę można postawić u wszystkich badanych krów w 30. dniu po inseminacji (24). Celem innej pracy była ocena dwóch glikoprotein związanych z ciążą (PAG) w oparciu o immunoenzymatyczne testy (ELISA) przeznaczone do badania krwi i mleka (4). W 12 gospodarstwach krów mlecznych wybrano 116 krów montbéliarde lub holstein, które następnie zainseminowano (artificial insemination – AI; n = 102). Kilka z nich było 2-3 miesiące po wycieleniu. Od wszystkich krów pobrano próbki krwi i mleka. Analizy przeprowadzono w próbkach mleka, surowicy i osocza za pomocą testu ciążowego. U krów inseminowanych krótko po wycieleniu notowano wyniki fałszywie dodatnie. Od krów poddanych AI pobrano próbki w 16., 30. i 41. dniu po inseminacji. Dodatkowa próbka mleka została pobrana 53 dni po AI. Aby ustalić, czy inseminowane krowy były w ciąży, poddawano je badaniu transrektalnej ultrasonografii (transrectal ultrasonography – TU) w 41. dniu po inseminacji. Spośród 102 inseminowanych krów, u 63 potwierdzono ciążę. W 30. dniu po inseminacji czułość testu ELISA w próbkach surowicy, osocza i mleka wynosiła, odpowiednio, 100%, 100% i 98,1%, swoistość natomiast 88,6%, 88,9% i 90,3%. Wykazano także, iż obszar pojawiania się strat ciąży mieści się między 30. a 41. dniem po AI. Dokładność uzyskiwana w surowicy, osoczu i mleku w 41. dniu po AI oraz mleku 53 dni po AI wynosiła od 97,4% do 100%. Nie stwierdzono istotnych różnic diagnostycznych pomiędzy krwią i mlekiem badanym testem ELISA w wybranych okresach po inseminacji.

Testy terenowe

Ostatnio pojawiły się komercyjne testy ciążowe przeznaczone do jakościowej analizy białek PAG w próbkach krwi, surowicy i mleka (5, 18, 19, 25). Dostępne także w kraju, tak zwane testy wzrokowe, umożliwiając, według producenta, wykrywanie glikoprotein ciążowych (PAG) w warunkach terenowych już od 28. dnia ciąży aż do jej końca (5). Wyniki pierw-

szych krajowych eksperymentów z wykorzystaniem testu wzrokowego są zachęcające (18, 19). Wśród zalet podkreśla się możliwość wykorzystania krwi pełnej, szybkie czasy inkubacji i odczyt wizualny. W badaniach przeprowadzonych w północno-wschodniej części stanu Missouri zebrano od krów mlecznych próbki krwi w 28. dniu po sztucznej inseminacji (AI). Próbki badano na obecność glikoprotein związanych z ciążą (PAG) przy użyciu wyżej wspomnianego szybkiego testu wizualnego, a także tradycyjnych testów do wykrywania PAG w osoczu i mleku. Ultrasonograficzna diagnoza ciąży w 35.-38. dniu po inseminacji była punktem odniesienia (tzw. złotym standardem) dla testów wykrywających PAG. Ultrasonograficznie ciążę stwierdzono u 49,7% krów. W doświadczeniu do diagnozy ciąży używano testów ELISA oraz ocenę gęstości optycznej (OD, mierzy się za pomocą czytnika płytek do mikromianowania w osoczu i mleku, szybkie badania wizualne) albo odczyt wizualny (szybkie testy wizualne). Przy zastosowaniu oceny OD odsetek prawidłowych wyników (czułość) w próbkach osocza, mleka i szybkich badaniach wizualnych wynosił, odpowiednio, 97%, 96%, 95%. Czułość szybkiego badania wizualnego wynosiła 98%. Swoistość (proporcja nieciążarnych krów prawidłowo sklasyfikowanych) testu dla badania osocza, mleka i szybkich wizualnych testów, przy użyciu OD, wynosiła, odpowiednio, 94%, 94% i 93%. Podczas odczytu wizualnego, swoistość szybkiego testu wizualnego była mniejsza (85%), ponieważ u niektórych krów zmiana zabarwienia była nieznaczna. Takie wyniki okazywały się fałszywie dodatnie. Całkowita dokładność (odsetek ciężarnych i nieciążarnych krów zdiagnozowanych poprawnie) była podobna we wszystkich testach (osocze, mleko, szybka wizualna kontrola gęstości (OD) i wynosiła, odpowiednio: 96%, 95%, 92%). W drugim eksperymencie, w czterech gospodarstwach krów mlecznych w zachodnim Kentucky przeprowadzono badania między 25. a 95. dniem po AI stosując szybki test wzrokowy. Wnioskiem zasadniczym płynącym z powyższych eksperymentów jest stwierdzenie, że szybki test wizualny ma jednakową czułość i dokładność jak w przypadku istniejących już na rynku testów PAG.

Przy okazji zwraca się także uwagę na jego nieco niższą swoistość poddawanego badaniom testu (30).

Stabilność testów PAG

W niewielu badaniach oceniano stabilność testów do wykrywania PAG. Należą do nich badania niemieckie, w których oceniano czynniki zakłócające prawidłowe wykrycie PAG w mleku (7). Stabilność PAG badano po wielokrotnych cyklach zamrażania i rozmrażania próbek, jak również po przechowywaniu ich przez siedem dni w temperaturze pokojowej i w 37°C, również przez siedem dni. Po drugie, skuteczność diagnostyczną dostępnego w handlu PAG-ELISA w warunkach terenowych oceniano w diagnostyce ciąży między 28. a 60. dniem po inseminacji przez porównanie uzyskanych wyników do wyników otrzymanych podczas transrektalnej ultrasonografii. Po jednej procedurze zamrażania i rozmrażania gęstość optyczna (OD) wzrosła, a potem pozostała stabilna. Przechowywanie próbek mleka w temperaturze pokojowej nie miało wpływu na OD, a po pięciu dniach przechowywania w temperaturze 37°C OD gwałtownie spadła. W związku z powyższym zaleca się, aby podczas transportu i przechowywania próbek mleka do analizy bPAG dodawać odpowiedni środek konserwujący o działaniu bakteriobójczym. W celu uzyskania wiarygodnych wyników należy nie dopuścić do zanieczyszczenia próbek wodą (45). W innych badaniach próbki mleka przechowywano w temperaturze 37°C, 22°C, 4°C, -20°C oraz -80°C przez 4, 7, 14, 28, 60, 90, lub 365 dni. Niezależnie od temperatury, podczas przechowywania przez 365 dni, zanotowano nieznaczne podwyższenie poziomu PAG, podczas gdy przechowywanie przez okres krótszy powodowało nieznaczne obniżenie jej poziomu w porównaniu do prób inicjalnych. W przypadku mniej niż 6% odczyt był inny od oczekiwanego. Były to próbki pobrane relatywnie wcześniej po inseminacji w okresie progowym – tj. takim, w którym zawartość PAG nie była jeszcze wystarczająca do postawienia jednoznacznej diagnozy (48).

Ograniczenia testów PAG

Ograniczeniem testu są wysokie stężenia PAG w okresie poporodowym. Wynika to z długiego okresu półtrwania cząsteczki (średnio 7-9 dni), który z kolei warunkowany jest stopniem jej glikozylacji. Wspomniany proces wpływa także na stężenie PAG we krwi obwodowej (44). W efekcie może on być zawodny (wyniki fałszywie dodatnie) u samic inseminowanych krótko (70 dni) po wycieleniu. Podobnie, fałszywe wyniki dodatnie można uzyskać badając samice na cielność krótko po obumarciu zarodka, ponieważ poziom PAG utrzymuje się w takiej sytuacji na wysokim poziomie jeszcze przez kilkanaście dni (min. 10-14 dni) (26, 31). Obecność PAG-1 w osoczu krów wykazano w przypadku obumarcia płodów, z różnym stopniem zaawansowania procesu

mumifikacji. Prawdopodobnie obumarcie płodu i jego mumifikacja są skutkiem uszkodzenia łożyska, brak jednak danych jednoznacznie potwierdzających tę tezę (26). Fakt występowania PAG w organizmie krowy po obumarciu zarodka oraz w okresie poporodowym może być pewną niedogodnością we współczesnych stadach bydła mlecznego, w których dąży się do maksymalnego skracania okresu przestoju poporodowego. Ponadto pewnym utrudnieniem w przypadku niektórych testów może być stosunkowo długi okres oczekiwania na wynik (2-3 dni) (15). Niebagatelny pozostaje także względnie wysoki koszt testu, choć ceny nowszych zestawów komercyjnych wydają się przeczyć tej tezie (11). Nie bez znaczenia dla wiarygodności wyników testów pozostają także zakażenia samic w ciąży. Jednym z przykładów jest zakażenie *Neospora caninum*, którego skutkiem jest produkcja IFN- γ przez organizm. Udowodniono, że u krów seropozytywnych występuje ujemna korelacja między występowaniem stanu zapalnego spowodowanego zakażeniem a poziomem ciążowej glikoproteiny. Niższe stężenie PAG-1 obserwowano krótko po inseminacji samicy, natomiast spadek poziomu PAG-2 występował około 120. dnia ciąży (38).

Czynniki ryzyka

Poziom PAG zależy także od szeregu czynników indywidualnych. Należą do nich: dzień ciąży, wysokość produkcji mlecznej, liczba płodów, wiek samicy, wielkość płodu oraz dawca nasienia (buhaj) (7, 9, 26, 29, 33). Podwyższony poziom PAG notowano w klinicznych przypadkach *mastitis*, zaburzeniach metabolicznych oraz lewostronnym przemieszczeniu trawieńca (29). Wykazano także niewielkie różnice w czułości testów RIA, szczególnie w okresie wczesnej ciąży (24, 25). Lepszym pod względem czułości okazał się test PAG-RIA-706 niż RIA-497 (25). Wykazano ponadto, iż komercyjnie używany test PAG-ELISA (Bovine Preg Test) do określania zawartości PAG w surowicy krwi krów jest porównywalny do testu radioimmunologicznego (PAG-RIA) oraz ultrasonograficznej diagnozy ciąży w 28. dniu po inseminacji (20).

Badanie stężenia PAG w programach zarządzania rozrodem

Jednym ze sposobów zarządzania rozrodem w stadach krów mlecznych jest wykorzystanie programów synchronizacji rui i owulacji w połączeniu z ustaloną w czasie inseminacją. Programy takie zakładają cotygodniową kontrolę zwierząt – w tym możliwie wczesne ustalenie cielności. Przy założeniu siedmiodniowych odstępów najwcześniejsze badanie byłoby możliwe 28. dnia po inseminacji. Wychodząc z takiego założenia oceniano dokładność diagnozy ciąży przy pomocy testu ELISA przeprowadzanego 27 dni po ustalonej w czasie inseminacji (TAI). Probki krwi pobrane zostały od krów (n = 1079) 27 dni po

pierwszym, drugim lub trzecim zabiegu inseminacji. Diagnozę ciąży za pomocą transrektalnej ultrasonografii (TU) przeprowadzono natychmiast po pobraniu próbki krwi, a wyniki ciąży stwierdzone przy użyciu TU służyły jako standard do testowania dokładności testu ELISA do określenia stężenia PAG. Wyniki ciąży ustalonej w oparciu o badanie PAG (ELISA) i TU, uznawano za właściwe. W przypadku niezgodności między badaniami stawiano diagnozę poprzez badanie ultrasonograficzne po upływie 5 dni. Dokładność diagnozy ciąży była mniejsza niż oczekiwano przy użyciu transrektalnej ultrasonografii 27 dni po TAI (od 93,7% do 97,8%), zwłaszcza gdy diagnozę ciąży oparto na wizualizacji płynu kosmówkowo-omocznowego i obecności ciała żółtego, z pominięciem uwidocznienia zarodka. Dokładność testu PAG-ELISA w 27. dniu po TAI wynosiła 93,7%, 95,4% i 96,2%, odpowiednio dla pierwszego, drugiego i trzeciego TAI. Korelacja między TU i PAG ELISA 27 dni po TAI wynosiła od 0,87 do 0,90. Równocześnie ustalono, że wyniki oparte na teście ciążowym PAG ELISA miały wysoką ujemną wartość predykcyjną, co wskazuje, że prawdopodobieństwo podania $\text{PGF}_{2\alpha}$ ciężarnym krowom jest niskie (41). W innych badaniach oceniano płodność krów poddawanych wczesnej (ER) lub późnej (LR) resynchronizacji po wykluczeniu ciąży w oparciu o wyniki testu (PAG) ELISA lub transrektalnej palpacji. Krowy poddawano protokołowi między 61. a 74. dniem laktacji z wykorzystaniem programów Presynch-Ovsynch i ustaloną w czasie inseminacją. Krowy z grupy ER nie były inseminowane w kolejnej rui, lecz otrzymywały pierwszą iniekcję GnRH programu Ovsynch, dwa dni przed przewidzianym momentem diagnozy ciąży. W 28. dniu po pierwszej AI (27.-34. dzień) stwierdzano bądź wykluczano ciążę poprzez ocenę PAG ELISA i kontynuowano program Ovsynch do inseminacji. Ciążę kontrolowano powtórnie w 46. (od 35. do 52.) dniu po inseminacji dokonując badania rektalnego, a samice, u których doszło do jej zamarcia, reinseminowano. Z kolei krowy grupy LR badano na ciążę w 46. dniu, a zwierzęta niecielnne poddawano programowi Ovsynch. Odsetek samic niecielnnych, które poddawano powtórnej inseminacji, unasienniając je w ustalonym czasie, wynosił, odpowiednio, 30% wobec 7,6%. Krowy poddawane późnej resynchronizacji miały krótszy odstęp między inseminacjami naturalnymi, tj. 21,7 w porównaniu ze średnim odstępem wynoszącym 27,8 dni lub inseminacji ustalonej w czasie 35,3 wobec 55,2 dnia. Niemniej późna powtórna synchronizacja nie wpłynęła na wskaźnik ciąży (współczynnik ryzyka = 1,23, 95% przedział ufności = 0,94 do 1,61) i długość okresu międzyciążowego (ER = 132 vs. LR = 140). Czułość, swoistość oraz dodatnia i ujemna wartość prognostyczna wynosiły, odpowiednio, 95,1%, 89,0%, 90,1% i 94,5%, natomiast dokładność – 92,1%. W podsumowaniu ustalono, że test PAG-ELISA do wczesnej diagnozy

ciąży wykazuje akceptowalną dokładność, jednak wczesna resynchronizacja rui po wykluczeniu ciąży nie ma wpływu na wskaźnik ciąży oraz nie skraca okresu międzyciążowego (42). Wcześniejsza detekcja krów niecielnnych w przypadku wykorzystania testu PAG ELISA w powiązaniu z programem ustalonej w czasie inseminacji (TAI – time oriented insemination) przy resynchronizacji cyklu rujowego u samic niecielnnych może istotnie poprawiać odsetek zacieleń w stadach w porównaniu do programu opartego na późniejszym wykrywaniu zwierząt niecielnnych z wykorzystaniem ultrasonografu (41, 42).

Testy PAG u krów mięsnych

Wprawdzie testy ciążowe wykrywające PAG wykorzystywane są przeważnie u bydła mlecznego, jednak nie brak informacji na temat ich użycia u krów mięsnych. W jednym z badań od każdej krowy doświadczalnej pobierano próbki mleka i surowicy. Równocześnie wszystkie zwierzęta były badane transrektalnie – palpacyjnie lub z użyciem USG. W badaniach wykorzystano testy ELISA-IDEXX Milk Pregnancy Test (IDEXX, Westbrook, ME) oraz IDEXX Bovine Pregnancy Assay (serum). W porównaniu z badaniem transrektalnym, czułość badania stężenia PAG w mleku wynosiła 99,7% (99,0-100,0%), a swoistość 80,8% (65,6-95,9%). Niższa swoistość była prawdopodobnie związana z niską częstością występowania (9,9%) krów niecielnnych. Spośród 332 przebadanych próbek mleka 1,8% (n = 6) wyników zaklasyfikowano jako wymagające ponownego sprawdzenia. Wyniki testu PAG-ELISA dla mleka i surowicy wykazały wysoką korelację. PAG oznaczane testem ELISA w mleku były precyzyjne w przewidywaniu stanu ciąży u bydła mięsnego między 37. a 125. dniem po inseminacji, mogą być zatem przydatne do wspomagania decyzji w zakresie zarządzania w stadach bydła mięsnego (35).

Testy PAG jako narzędzie do przewidywania wczesnych strat ciąży

Możliwość diagnozy późnej śmiertelności zarodkowej (EM – embryo mortality) jest często wymieniana jako zaleta badania stężenia PAG (24, 31, 34). Wielkość strat ciąży pojedynczych we współczesnych stadach krów mlecznych pomiędzy 32. a 104. dniem ciąży, opierając się na badaniach ultrasonograficznych, wynosić może nawet 13%. Podobne możliwości daje badanie stężenia PAG (31, 33, 34). Przyjmuje się, że przynajmniej u połowy krów mających ciało żółte w dniu badania na ciążę testem PAG (32 dzień po TAI) doszło do utraty ciąży (34). Celem szerszych badań wykorzystaniem testów PAG do wykrywania EM było: (1) określenie korelacji między stężeniem PAG a występowaniem zjawiska późnej śmierci zarodkowej; (2) identyfikacja PAG w 31. dniu, po którym późna EM może wystąpić oraz (3) określenie końca okresu w czasie ciąży, podczas którego późne EM występuje

najczęściej (31.-59. dzień). U krów diagnozowano ciążę w 31. dniu na podstawie obecności płodu i bicia serca oraz potwierdzano ją w 59. dniu ciąży. Za późne EM przyjmowano sytuację, gdy u krowy stwierdzono zarodek/płód w 31. dniu ciąży, ale nie wykazano go w 59. dniu po TAI lub TET. W analizie uwzględniono jedynie krowy, które były w ciąży w 31. dniu po inseminacji lub transferze. Krowy, które w 31. dniu po inseminacji były w ciąży i utrzymały ją do 59. dnia miały istotnie wyższe stężenia krążących PAG w 31. dniu ciąży w porównaniu do krów, u których nastąpiło późne zamarcie zarodka/płodu między 31. a 59. dniem po inseminacji, zarówno w przypadku ustalonej w czasie inseminacji, jak i transferu zarodka. W celu przeprowadzenia dokładniejszych testów wykonano oznaczenie stężenia PAG w 31. dniu ciąży. Ustalono, że poziom PAG pozwala na przewidywanie z dużą dokładnością (> 95%) wystąpienia EM u krów poddanych TAI lub ustalonemu w czasie transferowi zarodków (TET – time oriented embryo transfer). Jednocześnie stężenie PAG poniżej 1,4 ng/ml po zabiegu TAI (minimalny wykrywalny poziom to 0,28 ng/ml) i 1,85 ng/ml) i TET (w 31. po rui) pozwala na trafne przewidywanie wystąpienia zjawiska EM z dokładnością na poziomie 95%. Po TET, utrata ciąży była dodatkowo monitorowana w oparciu o badanie dopplerowskie USG, ocenę poziomu progesteronu i stężenia PAG od 24. do 59. dnia ciąży. Ponad 50% strat miało miejsce między 31. a 38. dniem ciąży. Podsumowując, stężenie PAG w 31. dniu ciąży może stanowić dobry marker prognostyczny śmierci zarodkowej następującej pomiędzy 31. a 59. dniem ciąży (34).

PAG u małych przeżuwaczy

W przypadku owiec badanie stężenia PAG w osoczu i mleku może stanowić pewną i skuteczną metodę diagnostyczną ciąży począwszy od 32. dnia po zapłodnieniu (39, 40). Wzrost stężenia glikoproteiny ciążowej rozpoczyna się w 3.-4. tygodniu i rośnie do 9. tygodnia ciąży, osiągając wartość 92 ± 14 ng/ml surowicy, a następnie stopniowo się obniża (36). Warty podkreślenia jest też fakt, iż stężenie glikoproteiny ciążowej w mleku owiec jest 10 razy niższe niż w osoczu krwi, co należy uwzględnić podczas interpretacji wyników testów (6). Stężenie PAG-1 w organizmie samicy w okresie poporodowym spada do poziomu niewykrywalnego testami przez ok. 10 tygodni (36).

Wykrycie ciąży w surowicy krwi kóz z wykorzystaniem testu caPAG jest możliwe od 23. dnia po inseminacji (1). Stężenie PAG różni się w zależności od rasy. Dla przykładu, wzrost stężenia glikoproteiny ciążowej u kóz burskich rozpoczyna się 21.-28. dnia ciąży. Maksymalne stężenie PAG notuje się w 5.-8. tygodniu ciąży, które osiąga wartość ok. 69 ng/ml surowicy, a następnie stopniowo się obniża do 0,3 ng/ml około 4 tygodni po porodzie (39, 40). Z kolei u kóz

karpackich stężenie PAG rośnie do 8. tygodnia ciąży, osiągając wartość maksymalną 50 ng/ml, po czym spada między 12. a 14. tygodniem do poziomu 16-32 ng/ml i pozostaje stosunkowo stałe do porodu (49). Podobne tendencje notowano u kóz grzywiastych (47). Równocześnie stwierdzano wysoką ekspresję mRNA glikoprotein ciążowych (izoforymy PAG 1-11) w tkankach łożyska korelującą z poziomem PAG we krwi (46). Ostatnio komercyjny test ELISA do wykrywania PAG u krów wykorzystano do diagnozy ciąży u zagrożonych wyginieciem owcy grzywiastej uzyskując 100,0% czułość i 95,8% swoistość (23).

Zaletą zastosowania testów PAG w wykrywaniu ciąży u małych przeżuwaczy jest ich mała inwazyjność oraz możliwość potwierdzenia lub wykluczenia ciąży dużo wcześniej niż w przypadku ultrasonograficznej diagnozy ciąży przez powłoki brzuszne. Przechodząc USG można przeprowadzać u kóz dopiero około 42. dnia po zapłodnieniu. Natomiast w transrektalnym badaniu ultrasonograficznym, z wykorzystaniem specjalnego wysięgnika – istnieje ryzyko uszkodzenia odbytnicy, a samo badanie wymaga dużego doświadczenia. Ponadto, dokładność diagnostyki ciąży poprzez oznaczanie stężenia PAG jest wyższa niż w przypadku rozpoznawania ciąży na podstawie badania ultrasonograficznego (w 24. dniu, odpowiednio: 98,8% i 89,3%) (16).

Oznaczanie glikoproteiny ciążowej we krwi lub mleku samic przeżuwaczy może stanowić skuteczną metodę diagnostyki wczesnej ciąży u bydła i małych przeżuwaczy. Niewątpliwą zaletą testów terenowych do oznaczania poziomu PAG jest ich niska inwazyjność, wysoka czułość i swoistość. Mimo pewnych ograniczeń, np. w postaci podwyższonego stężenia glikoproteiny także po obumarciu zarodka, znaczenie tej metody stopniowo wzrasta.

Piśmiennictwo

1. Al-Hassan M. J., Al-Samawi K. A.: Seasonal variations in serum pregnancy associated glycoproteins during early pregnancy in Aardi goats in central Saudi Arabia. *Asian Pac. J. Reprod.* 2017, 226-230.
2. Barbato O., Menchetti L., Sousa N. M., Malfatti A., Brecchia G., Canali C., Beckers J. F., Barile V. L.: Pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) concentrations in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) during gestation and the postpartum period. *Theriogenology* 2017, 97, 73-77.
3. Carvalho P. D., Consentini C. C., Weaver S. R., Barletta R. V., Hernandez L. L., Fricke P. M.: Temporarily decreasing progesterone after timed artificial insemination decreased expression of interferon-tau stimulated gene 15 (ISG15) in blood leukocytes, serum PSPB concentrations, and embryo size in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2017, 100, 3233-3242.
4. Commun L., Velek K., Barbry J. B., Pun S., Rice A., Mestek A., Egli C., Leterme S.: Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2016, 28, 207-213.
5. Dufour S., Durocher J., Dubuc J., Dendukuri N., Hassan S., Buczinski S.: Bayesian estimation of sensitivity and specificity of a milk pregnancy-associated glycoprotein-based ELISA and of transrectal ultrasonographic exam for diagnosis of pregnancy at 28-45 days following breeding in dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 2017, 140, 122-133.
6. El Amiri B., Sousa N. M., Alvarez Oxley A., Hadarbach D., Beckers J. F.: Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacauene dairy sheep. *Res. Vet. Sci.* 2015, 99, 30-36.

7. Engelke J., Feldmann M., Gundling N., Gundelach Y., Egli C., Hoedemaker M., Piechotta M.: Pregnancy diagnosis by detection of pregnancy associated glycoproteins in milk: evaluation of a commercial available ELISA. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2015, 128, 402-408.
8. Fricke P. M., Ricci A., Carvalho P. D., Mason C., Amundson M. C.: Milk vs. Blood – Which is Best for PAG Pregnancy Prediction? Western Dairy Management Conference, Reno, March 3-5, 2015.
9. Gajewski Z., Melo de Sousa N., Konopka A. et al.: Determination of PAG in the milk and blood in cow's in comparison to other examination methods for pregnancy diagnosis. Proc. XXV WBC, Budapest 2008, p. 92-97.
10. Gajewski Z., Pawliński B., Wehrend A., Petrajakis-Golobow M., Siewruk K., Treła M., Dąbrowski M., Aniolek A.: Endokrynologia wczesnej ciąży u bydła, [w:] Gajewski Z., Wehrend A. (red.): Rozród bydła – wybrane zagadnienia. Apra-wetpress s.c., Warszawa 2014, s. 12-17.
11. Gajewski Z., Petrajakis-Golobow M., Melo de Sousa N., Beckers J. F., Pawliński B., Wehrend A.: Comparison of accuracy of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in blood and milk for early pregnancy diagnosis in cows. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 2014, 156, 585-590.
12. Gandy B., Tucker W., Ryan P., Williams A., Tucker A., Moore A., Godfrey R., Willard S.: Evaluation of the early conception factor (ECF™) test for the detection of non pregnancy in dairy cattle. Theriogenology 2001, 56, 637-647.
13. García-Ispuerto I., Rosselló-Visa M. A., Serrano-Pérez B., Mur-Navales R., Sousa de N. M., Beckers J. F., López-Gatiús F.: Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoproteins I and II and progesterone on day 28 post-AI as markers of twin pregnancy in dairy cattle. Livestock Science 2016, 192, 44-47.
14. Ghaffari Laleh V., Ghaffari Laleh R., Pirany N., Moghadaszadeh Ahrabi M.: Measurement of EPF for detection of cow pregnancy using rosette inhibition test. Theriogenology 2008, 70, 105-107.
15. Giordano J. O., Guenther J. N., Lopes G. Jr., Fricke P. M.: Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 2012, 95, 683-697.
16. González F., Cabrera F., Batista M., Rodríguez N., Álamo D., Sulon J., Beckers J. F., Gracia A.: A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectal ultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays. Theriogenology 2004, 62, 1108-1115.
17. Hooshmandabbasi R., Zerbe H., Bauersachs S., de Sousa N. M., Boos A., Klisch K.: Pregnancy-associated glycoproteins in cows with retained fetal membranes. Theriogenology 2017, 105, 158-163.
18. Jaśkowski J. M., Gehrke M., Herudzińska M., Jaśkowski B. M., Kulus J.: Szybki test ciążowy u krów – wstępne badania. Weterynaria w Terenie 2017 (w druku).
19. Jaśkowski J. M., Herudzińska M., Kmiecik J., Jaśkowski B. M., Kierbić A., Kulus J.: Wstępne uwagi dotyczące wykorzystania testu terenowego do wykrywania wczesnej ciąży u krów. Lecznica Dużych Zwierząt 2017 (w druku).
20. Karen A., Sousa N. M., Beckers J. F., Bajcsy Á. C., Tibold J., Mádl I., Szenci O.: Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmo assay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. Anim. Reprod. Sci. 2015, 159, 131-137.
21. Kornmatitsuk B., Dahl E., Ropstad E., Beckers J. E., Gustafsson H., Kindahl H.: Endocrine profiles, haematology and pregnancy outcomes of late pregnant Holstein dairy heifers sired by bulls giving a high or low incidence of stillbirth. Acta. Vet. Scand. 2004, 45, 47-68.
22. Kornmatitsuk B., Veronesi M. C., Madej A., Dahl E., Ropstad E., Beckers J. F., Forsberg M., Gustafsson H., Kindahl H.: Hormonal measurements in late pregnancy and parturition in dairy cows – possible tools to monitor foetal well being. Anim. Reprod. Sci. 2002, 72, 153-164.
23. Lamglait B., Rambaud T.: Diagnosis of pregnancy in Barbary sheep (*Ammotragus lervia*) using a bovine assay for pregnancy-associated glycoproteins. J. Zoo. Wildl. Med. 2017, 48, 525-528.
24. Lawson B. C., Shahzad A. H., Dolecheck K. A., Martel E. L., Velek K. A., Ray D. L., Lawrence J. C., Silvia W. J.: A pregnancy detection assay using milk samples: evaluation and considerations. J. Dairy Sci. 2014, 97, 6316-6325.
25. LeBlanc S. J.: Short communication: Field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows. J. Dairy Sci. 2013, 96, 2345-2348.
26. López-Gatiús F., Garbayo J. M., Santolaria P., Yáñez J., Ayad A., de Sousa N. M., Beckers J. F.: Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. Domest. Anim. Endocrinol. 2007, 32, 29-42.
27. Max A.: Problemy z rozpoznawaniem ciąży u krów. Życie Wet. 2013, 88, 11.
28. Mayo L. M., Moore S. G., Poock S. E., Silvia W. J., Lucy M. C.: Technical note: Validation of a chemical pregnancy test in dairy cows that uses whole blood, shortened incubation times and visual readout. J. Dairy Sci. 2016, 99, 7634-7641.
29. Mercadante P. M., Ribeiro E. S., Risco C., Ealy A. D.: Associations between pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy outcomes, milk yield, parity, and clinical diseases in high-producing dairy cows. J. Dairy Sci. 2016, 99, 3031-3040.
30. Nation D. P., Malmo J., Davis G. M., Macmillan K. L.: Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. Aust. Vet. J. 2003, 81, 63-65.
31. Pohler K. G., Pereira M. H., Lopes F. R., Lawrence J. C., Keisler D. H., Smith M. F., Vasconcelos J. L., Green J. A.: Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. J. Dairy Sci. 2016, 99, 1584-1594.
32. Power S. G., Challis J. R.: Tissue-specific concentration changes of estrone and estradiol during spontaneous and ACTH-induced parturition in sheep. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1987, 65, 130-135.
33. Ricci A., Carvalho P. D., Amundson M. C., Fourdraine R. H., Vincenti L., Fricke P. M.: Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. J. Dairy Sci. 2015, 98, 2502-2514.
34. Ricci A., Carvalho P. D., Amundson M. C., Fricke P. M.: Characterization of luteal dynamics in lactating Holstein cows for 32 days after synchronization of ovulation and timed artificial insemination. J. Dairy Sci. 2017 Oct 4. pii: S0022-0302(17)30911-6. doi: 10.3168/jds.2017-13293. [Epub ahead of print]
35. Roberts J. N., Byrem T. M., Grooms D. L.: Application of an ELISA Milk Pregnancy Test in Beef Cows. Reprod. Domest. Anim. 2015, 50, 651-658.
36. Roberts J. N., May K. J., Veiga-Lopez A.: Time-dependent changes in pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in commercial crossbred sheep. Theriogenology 2017, 89, 271-279.
37. Sasser R. G., Ruder C. A.: Detection of early pregnancy in domestic ruminants. J. Reprod. Fertil. Suppl. 1987, 34, 261-271.
38. Serrano-Pérez B., García-Ispuerto I., Sousa N. M., Beckers J. F., Almería S., López-Gatiús F.: Gamma Interferon Production and Plasma Concentrations of Pregnancy-Associated Glycoproteins 1 and 2 in Gestating Dairy Cows Naturally Infected With *Neospora caninum*. Reprod. Domest. Anim. 2014, 49, 275-280.
39. Shahin M.: Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) profiles in cows and goats and attempts to measure PAG in milk. Diss. Doktor., Georg-August-Universität, Göttingen 2013.
40. Shahin M., Friedrich M., Gaulty M., Beckers J. F., Holtz W.: Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera. Small Rum. Res. 2013, 113, 141-144.
41. Silva E., Sterry R. A., Kolb D., Mathialagan N., McGrath M. F., Ballam J. M., Fricke P. M.: Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. J. Dairy Sci. 2007, 90, 4612-4622.
42. Silva E., Sterry R. A., Kolb D., Mathialagan N., McGrath M. F., Ballam J. M., Fricke P. M.: Effect of interval to resynchronization of ovulation on fertility of lactating Holstein cows when using transrectal ultrasonography or a pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose pregnancy status. J. Dairy Sci. 2009, 92, 3643-3650.
43. Sinedino L. D., Lima F. S., Bisinotto R. S., Cerri R. L., Santos J. E.: Effect of early or late resynchronization based on different methods of pregnancy diagnosis on reproductive performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 2014, 97, 4932-4941.
44. Sousa N. M., Ayad A., Beckers J. F., Gajewski Z.: Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. J. Physiol. Pharmacol. 2006, 57, Suppl 8, 153-171.
45. Stahmann F., Gaulty M., Borstel von U. K., Holtz W.: Pre-Analytic Sources of Error with the Serum PAG-Pregnancy Test for Cows. J. Agr. Sci. 2015, 7, 10-40.
46. Szenci O., Beckers J. F., Humblot P., Sulon J., Sasser G., Taverne M. A. M., Varga J., Baltusen R., Schekk G.: Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein I tests for pregnancy detection in dairy cows. Theriogenology 1998, 50, 77-88.
47. Tandiya U., Nagar V., Yadav V. P., Ali I., Gupta M., Dangi S. S., Hyder I., Yadav B., Bhakat M., Chouhan V. S., Khan F. A., Maurya V. P., Sarkar M.: Temporal changes in pregnancy-associated glycoproteins across different stages of gestation in the Barbary goat. Anim. Reprod. Sci. 2013, 142, 141-148.
48. Wynands E. M., LeBlanc S. J., Kelton D. F.: Short communication: The effect of storage conditions and storage duration on milk ELISA results for pregnancy diagnosis. J. Dairy Sci. 2017 Oct 4. pii: S0022-0302(17)30897-4. doi: 10.3168/jds.2017-12799. [Epub ahead of print]
49. Zamfirescu S., Anghel A., Nadolu D., Dobrin N.: Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during early pregnancy in carpathian goat. Annals RSCB 2011, 16, 50-53.

Adres autora: prof. dr hab. Jędrzej M. Jaśkowski, ul. Azaliowa 23, 62-002 Złotniki