

A két ellés közötti idő csökkentésének lehetőségei tejelő szarvasmarha- állományban

1. Korai vemhességvizsgálat a Biopryn ELISA-tesztel

Gábor György^{1*}, Tóth Fruzsina¹,
Garth Sasser², Szász Ferenc³,
Bárány Imre¹, Wölfling Anna⁴,
Völgyi-Csík József¹

1 Állattenyésztési és Takarmányozási Kutató Intézet. Gesztenyés út 1. H-2053 Herceghalom.

*E-mail: h12617gab@helka.iif.hu

2 Biotracking LLC, Moscow, ID, USA

3 Androvet Kft. Budapest

4 SZIE-ÁOTK, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika

Gy. Gábor – F. Tóth –
G. Sasser – F. Szász –
I. Bárány – A. Wölfling –
J. Völgyi-Csík:
Ways of decrease the period
between calvings in dairy
cows. 1. Early pregnancy
detection by Biopryn ELISA-test

Összefoglalás. A szerzők vizsgálataik során a kérődzők vemhességének korai megállapítására szolgáló Biopryn® ELISA-teszt alkalmazhatóságát ellenőrizték tejelő tehenekben. A Biopryn a vemhesség alatt a kérődző állatok vérében megtalálható fehérje, a vemhességspecifikus protein B (PSPB) jelenlétének kimutatására alkalmas. Első kísérletük során 69 holstein-fríz tehenet rectalis ultrahanggal vizsgáltak a vemhesítést követő 29 és 55 nap között, és az egyidejű vérvétel után a szérum PSPB-koncentrációját ellenőrizték a Biopryn-tesztel. Az UH-echográfus vizsgálatok és a vemhességi teszt eredményei 100%-ban egyeztek. A 2. vizsgálatban 23 tehenészeti telepen 1742 termékenyítést bíráltak el a termékenyítést követő 30–36. napon Biopryn-tesztel, és a termékenyítést követő 45–90. nap között – a telep gyakorlatának megfelelően – végzett rectalis palpatió vizsgálatával ellenőrizték annak helyességét. A vizsgálat érzékenysége 95,1%-os, a specificitása pedig 68,6% volt. Jelentős eltéréseket tapasztaltak üzemenként az egy vemhesülésre jutó termékenyítések számában: a legmagasabb érték 4,6, a legalacsonyabb pedig 1,5 volt. Ezen érték és a PSPB-teszt érzékenysége között közepes negatív összefüggést találtak ($r=-0,66$, $P<0,01$). A harmadik kísérletben 306 holstein-fríz és 30 magyar tarka tehen korai vemhességvizsgálatát végezték el Biopryn-tesztel a termékenyítést követő 30–36. napon, majd UH-echográfus vizsgálatával ellenőrizték az eredményeket. Fals negatív eredményt nem kaptak a vizsgálat során, tehát a teszt érzékenysége 100% volt. A fals pozitív diagnózisok aránya 5,9%, specificitása 89,1%, a pozitív és a negatív előrejelzési érték pedig egyaránt magas (94,0%, ill. 100%) volt.

Summary. In three experiments the authors checked the effectivity of the Biopryn ELISA test for the early pregnancy detection in dairy cattle. Biopryn is useful for the determination of the PSPB (Pregnancy Specific Protein B) in the blood samples of pregnant ruminants. In Experiment 1, sixty-nine cows were examined by rectal ultrasonography between the 29 and 55 days after AI. At the time of the examination, blood samples were taken from the same animals and were assayed for PSPB with Biopryn. Hundred percent correlation was found between the results of ultrasonic and ELISA examinations. In

Experiment 2, 1742 AIs were carried out in 23 dairies and checked the early pregnancy by Biopryn. Re-check of the diagnosis was carried out by rectal palpation 45–90 days after the AI (depending on the farm technician daily routine). The sensitivity of the Biopryn test was 95.1% and the specificity was 68.6%, respectively. Huge differences were found among the farms on the field of number of AI per pregnancy: the lowest value was 1.5 and the highest was 4.6. These values have a moderate negative correlation with the sensitivity of the PSPB test ($r=-0.66$, $P<0.01$). In Experiment 3, Holstein-Friesian and Hungarian Fleckvieh cows ($n=306$ and $n=30$) were assayed by Biopryn for early pregnancy (30–36 days after AI) detection. Re-check was done by ultrasonography just after the test. No false negative diagnosis was found, the sensitivity of the test was 100%. The rate of false positives was 5.9, positive and negative prediction values were found high (94.0% and 100%).

**A 28–30 napos
vemhesség a
vérszérumban lévő
vemhességi fehérje
kimutatásával
megállapítható**

Nagy tejtermelésű tehenészetekben (8000–10 000 kg/állat/év) gyakoriak az eltérő etiológiai hátterű szaporodásbiológiai zavarok, amelyek a magas szintű termelési és tenyésztési munka hatékonyságát rontják. A szaporodásbiológiai gondozás legfontosabb feladata ezek megelőzése, ill. kezelése. Ennek eredményességét a két ellés között eltelt idő, ill. az egy vemhesülésre eső termékenyítések száma jellemzi a legjobban. Hazánkban a két ellés közötti idő az elmúlt években jelentősen meghosszabbodott és 2002-ben a termelés-ellenőrzött állományokban elérte a 426 napot (2). Egy üresen álló nap költsége tehenenként kb. 700–800 Ft (ez megegyezik a nemzetközi adatokkal, ami kb. 3 USD/tehen/nap), ezért nagyobb telepeken a két ellés közötti idő néhány napos csökkentése is komoly gazdasági előnyökkel jár.

A két ellés közti idő csökkentésének legkézenfekvőbb módja a termékenyítés után üresen maradt tehenek mielőbbi felderítése. Erre a korai (a termékenyítés után 28–30 nappal végzett) vemhességvizsgálati módszerek alkalmazhatók, amelyek végezhetőek ultrahanggal, a szérum, ill. a tej progesterontartalmának vagy a különböző vemhességet jelző faktorok (pl. vemhességi fehérjék) kimutatásával.

A gyakorlatban ma két, eltérő molekulatömegű vemhességi fehérje, a PAG (pregnancy-associated glycoprotein) és a PSPB (pregnancy-specific protein B) kimutatási módszere áll rendelkezésünkre (PAG kimutatása RIA-módszerrel és a PSPB kimutatása RIA- és ELISA-eljárással) a korai vemhesség vizsgálatára. A két eljárás eredményessége között jelentős különbségeket nem tapasztaltak (6). A vemhességspecifikus protein B a vemhes kóródzó állatok vérszérumában található fehérje, melyet a trophoblast kétmagvú óriássejtjei termelnek. Állományszinten a vemhesség kimutatására a vemhesülés utáni 28–30. napon használható (3). A vemhesség megállapításán kívül egyesek szerint (7) ezek a fehérjék alkalmasak lehetnek a placenta funkcionális állapotának vizsgálatára is.

Az elmúlt években fejlesztették ki a vemhességspecifikus protein B kimutatására alkalmas Biopryn® ELISA (BioTracking LLC, Moscow, Idaho, USA) módszert (5).

Vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Alkalmas-e egy PSPB ELISA-teszt a vemhesség korai laboratóriumi diagnózisára, ill. az érzékenysége eléri-e az UH-echográfiás vemhességvizsgálatét?
2. Lehetséges-e a teszt használata a magyar üzemi körülmények között?
3. Milyen a teszt megbízhatósága kontrollált üzemi körülmények között?

Saját vizsgálatok

Anyag és módszer

A vemhesség korai diagnosztizálására a Biopryn®-tesztet használtuk. Vérmintákat kezeletlen vércsőbe a termékenyítés utáni 30–36. napon vettünk. A lemez fotometrikus vizsgálata ELISA- (EL₈₀₀, Universal Microplate Reader, BIO-TEK Instruments, INC., USA) reader segítségével történt 450 nm hullámhosszon. Az eredményeket és a határértéket (cut-off) a gyártó által megadott formula segítségével számoltuk ki a kontrollminták optikai denzitása (OD) alapján.

A vemhességi fehérje kimutatására irányuló laboratóriumi eredményeket a rectalis palpatió és UH-echográfiás vizsgálat eredményeivel hasonlították össze

1. Összehasonlító vizsgálat

Egy tejtermelő tehenészetben a vizsgálatba vont 69 tehenet rectalisan UH-echográfia (Scanner 100 LC Vet, Pie Medical, Maastricht, Hollandia) megvizsgáltuk (6 Mhz-es lineáris rectalis vizsgálófejjel) a vemhesítést követő 29. és 55. nap között, és egyidejűleg vért vettünk az állatokból, amelyet az Országos Állat-egészségügyi Intézet ELISA-laboratóriuma vizsgált a Biopryn-tesztel. Csak olyan tehen széruma került vizsgálatra, amelynél az előző ellés és a termékenyítés között legalább 60 nap telt el.

2. Nagyüzemi vizsgálatok

A kísérleteket 23 magyarországi tejelő tehenészetben végeztük, mely során 1742 termékenyítést bíráltunk el a termékenyítést követő 30–36. napon végzett Biopryn-teszt (OÁI, ELISA-laboratórium) és a termékenyítést követő 45–90. nap között végzett rectalis palpatió vizsgálat eredményei alapján. A rectalis vizsgálatokat a telepek a saját gyakorlatuknak megfelelően végezték, és a rectalis vizsgálatok eredményével vetettük össze a Biopryn-teszt eredményeit. Valószínű a rectalis vizsgálati eredményeket tekintettük (korrekt pozitív és negatív). A kísérletben résztvevő tehenek mindegyikénél feltétel volt, hogy az előző elléstől az újratemékenyítésig legalább 60 nap teljen el. A kísérletbe vont tejtermelő telepeken a termékenyítések minimális száma 50 volt.

Az eredményeket SZENCI és mtsai (6) által leírt módon elemeztük. A korrekt pozitív (a), ill. a korrekt negatív (b) diagnózis a rectalis palpatió és a PSPB ELISA-teszt azonos eredményeit jelöli. Fals pozitívnak (c) jelöltük az eredményt, ha PSPB-teszt pozitív eredményt adott, de ezt a palpatió vizsgálat nem erősítette meg. Fals negatív (d) diagnózist állítottunk fel, ha a laborvizsgálat nem jelzett vemhességet, de a palpatió vizsgálat igen. Az adatokból számított értékek: érzékenység $\left(\frac{100a}{a+b}\right)$, specifitás $\left(\frac{100b}{b+c}\right)$, pozitív előrejelzés $\left(\frac{100a}{a+c}\right)$ és a negatív előrejelzés $\left(\frac{100b}{b+d}\right)$ (6).

3. A teszt megbízhatósági vizsgálata

Harmadik kísérletünkben, egy gazdaságban 306 holstein-fríz és 30 magyar tarka tehen korai vemhességvizsgálatát végeztük el Biopryn-tesztel a termékenyítést követő 30–36. napon. A laboratóriumi vizsgálatokra a SZIE-ÁOTK Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszékének ELISA-laboratóriumában került sor. A Biopryn-teszt elvégzése után UH-echográfiás vizsgálattal ellenőriztük a korai vemhességvizsgálati eredményeket.

1. táblázat. A szérum PSPB-vizsgálata során mért OD-értékek átlaga
Table 1. Means of OD-values measured during serum PSPB test

OD-érték	Üres (n=37)	Vemhes (n=32)
Minimum	0,164	0,626
Maximum	0,308	1,405
Átlag	0,210	0,916

2. táblázat. A vemhességi vizsgálatok eredményei az első üzemi kísérletben
Table 2. Results of pregnancy tests in the first experiment

Termékenyítés száma	1742
Korrekt pozitív (PSPB és palpatióval +)	772
Korrekt negatív (mindkettővel negatív)	638
Fals pozitív (PSPB+, palpatio -)	292
Fals negatív (PSPB -, palpatio +)	40
Érzékenység, %	95,1
Specifitás, %	68,6
Pozitív előrejelzés, %	72,6
Negatív előrejelzés, %	94,1

Eredmények

1. Összehasonlító vizsgálat

Az ELISA-teszt és a párhuzamosan végzett UH-echográfiás korai vemhességi diagnosztika eredményei 100%-osan egyeztek a vemhes és az üresen maradt tehenek esetében egyaránt.

Amint az **1. táblázatból** látható, a vemhes állatokban mért OD-értékek minimuma közel kétszerese volt az üres kontrollokból meghatározott 0,325 alatti határértéknek is.

2. Üzemi vizsgálatok

A 23 tenyészetben elvégzett 1742 termékenyítésből 772 állat vemhesült az előző elléstől számított 60. és 500.

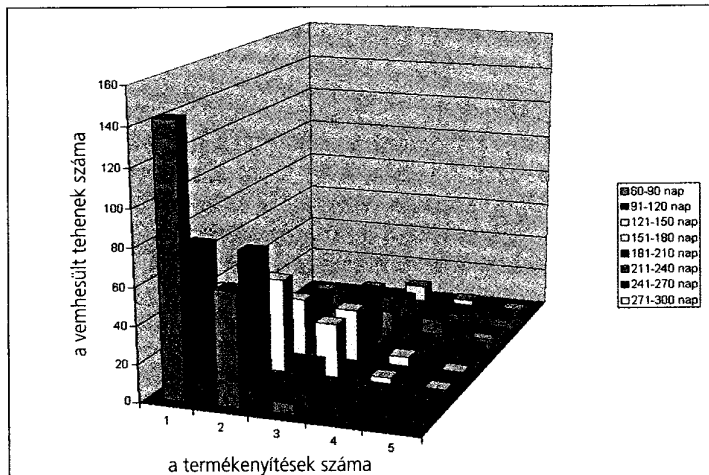
nap között. A **2. táblázatban** a 23 telep összesített eredményeit mutatjuk be. A PSPB-teszt érzékenysége az üres állatok felismerésének megbízhatóságát jelenti (95,1%). A vemhesség biztos megállapítása (specifitás) 68,6%-os biztonságu volt. Az adatok további elemzésekor csak az előző elléstől számított 60. és 300. nap közé eső 1 és 5 közötti termékenyítéseket vettük figyelembe. Ezt követően 1556 termékenyítéssel és 730 vemhességgel számoltunk a továbbiakban.

A **3. táblázatban** a 23 üzemben az egy vemhesülésre eső termékenyítések számának csoportonkénti alakulása látható az inszeminálások sorszámának függvényében. A táblázatban szereplő értékek az eredményes vemhesítésre

3. táblázat. Az egy vemhesülésre eső termékenyítések száma az ellés utáni napok és az elvégzett inszeminálások sorszámának függvényében

Table 3. Insemination per pregnancy as a function of days after calving and serial number of insemination carried out

Ellés utáni napok száma	1. term.	2. term.	3. term.	4. term.	5. term.	Átlag
60–90	2,3	2,1	1,2	0	0	2,2
91–120	2,1	1,9	2,2	0	0	2,1
121–150	1,8	2,2	1,9	2,0	0	2,0
151–180	1,8	2,0	2,3	3,2	0	2,1
181–210	2,0	1,9	2,1	2,4	2,0	2,0
211–240	3,3	2,5	2,6	1,8	1,7	2,3
241–270	1,3	3,2	3,3	2,3	2,0	2,7
271–300	3,0	1,8	1,8	2,3	0	1,9
Átlag	2,2	2,1	2,2	2,3	2,0	2,1



Ábra. A vemhesülések száma az előző elléstől eltelt idő és a termékenyítések sorszámának függvényében

Figure. Number of pregnancy as a function of days after previous calving and serial number of insemination carried out

4. táblázat. A PSPB-teszt megbízhatósága üzemi vizsgálatban (n=336)

Table 4. Results of sensitivity test in the experiment (n=336)

Termékenyítés	336
Korrekt pozitív	152
Korrekt negatív	164
Fals pozitív	20
Fals negatív	0
Érzékenység, %	100,0
Specifitás, %	89,1
Pozitív előrejelzés, %	88,4
Negatív előrejelzés, %	100,0

eső termékenyítések átlagos számát jelentik kategóriánként (termékenyítés sorszáma, ill. az elléstől a vemhesülésig eltelt napok száma). A csoportok között az átlagértékekben nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket. Az egy vemhesülésre eső termékenyítések átlagos száma csak az előző elléstől számított 211. és 270. nap között növekedett. Az átlagok elfedik az üzemek közötti különbségeket, azonban a 23 üzem között jelentős eltéréseket tapasztaltunk a PSPB-teszt érzékenységi értékeiben. Az üzemek 52,2%-ának (23 üzemből 12) érzékenységi értéke 95 és 100% közötti volt, sok üzemben azonban ennél lényegesen alacsonyabb. Az egy vemhesülésre eső termékenyítések számának alakulását üzemenként vizsgálva is jelentős különbségeket kaptunk. A legnagyobb érték 4,6, a legkisebb 1,52 volt. Az egy vemhesülésre eső termékenyítések száma és a PSPB-teszt érzékenysége között közepesen erős negatív összefüggést találtunk ($r=-0,66$), vagyis a nagy érzékenységi értékekhez (90% feletti) 2 alatti termékenyítés tartozik. A vemhesüléshez szükséges termékenyítések számát az előző ellés óta eltelt napok száma szerint 30 napos időintervallumokban 8 csoportra bontottuk, amelyek az **ábrán** láthatók. A vemhesüléshez szükséges termékenyítések száma csoportonként változó, az előző elléstől eltelt napok számával párhuzamosan növekszik.

3. A teszt megbízhatósági vizsgálata

Fals negatív diagnózist nem kaptunk a vizsgálat során, a teszt érzékenysége 100% volt (**4. táblázat**). A fals pozitív diagnózisok aránya 5,95% volt 89,1%-os specifitás mellett. Vizsgálatunkban magas pozitív (88,4%) és 100%-os negatív előrejelzési értéket kaptunk.

Megvitatás

A PSPB-teszt az előző ellés után csak a 90. naptól használható

A vizsgálatba vont állatok mindegyikénél feltétel volt, hogy az előző elléstől az újra-
vemhesítésig legalább 60 nap teljen el, és a vemhességvizsgálatra 30 nappal a termé-
kenyítés után kerüljön sor. A PSPB az ellés után is viszonylag hosszú ideig megmarad
a keringésben, felezési ideje a keringésben több mint két nap, és a vérből csak
80–100 nappal az ellés után tűnik el teljesen. Ez az oka annak, hogy egy új vemhes-
ség kimutatása a vérből ellés után könnyen adhat tévesen pozitív eredményt, ha a ter-
mékenyítés az előző ellés után 60 napon belül történt és a vemhességvizsgálatra pe-
dig a termékenyítéstől számított 30 napon belül kerül sor. A tesztet tehát csak a gesz-
tációs periódus 28–30. napjától lehet használni, ami a gyakorlatban annyit jelent,
hogy az előző elléstől számítva, már legalább 90 napnak el kell telnie (4).

1. Összehasonlító vizsgálat

Összehasonlító vizsgálatunk során 100%-os egyezést találtunk a 69 állat UH-
echográfus diagnózisa és a PSPB-teszt eredménye között. SZENCI és mtsai (6) ered-
ményei is alátámasztják, hogy a PSPB kimutatásán alapuló vemhességvizsgálat te-
nyészet szintjén csak a vemhesülés utáni 29–30. naptól használható, mivel vizsgá-
lataik során az ellés utáni 26–27. napon a fals negatív diagnózisok aránya 11,6%
volt, ezt követően pedig az UH-echográfus és a vemhességi fehérjéken alapuló
vemhességvizsgálati módszerek között szignifikáns eltérést nem tapasztaltak (6).
Eredményeink alapján a teszt alkalmasnak tűnik a szarvasmarha korai vemhesség-
diagnosztikájára. Az összehasonlító vizsgálat pozitív eredménye után ezért dön-
töttünk az üzemi kipróbálás mellett.

2. Üzemi vizsgálatok

A teszt az üresen maradt tehének felderítésére megfelelő

Az üzemi vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a PSPB-teszt megfelelő megbíz-
hatósággal használható a termékenyítés után üresen maradt tehének felderítésé-
re, amit a vizsgálat során kapott alacsony fals negatív diagnózisok száma
(40/1742), a negatív előrejelzés magas értéke (94,1%) támaszt alá. Az érzékeny-
ségi érték magas (95,1%) volt. Megbízhatósága megegyezik az irodalomban kö-
zölt adatokkal, mely szerint a termékenyítés utáni 29–30. napon 92%, ami a
33–35. napra 98,1%-ra emelkedik (6).

Az üzemek eredményei közötti eltérésre pontos magyarázattal nem szolgálha-
tunk, feltűnő volt azonban, hogy azokban az üzemekben bizonyult megbízha-
tóbbnak a teszt, ahol a szaporodásbiológiai eredmények az átlagosnál lényegesen
jobbak voltak, azaz pontos, rendszeres munka volt feltételezhető.

A kísérletünkben tapasztalt alacsony (68,6%) specificitásértéket a fals pozitív di-
agnózisok nagy száma okozta. A fals pozitív diagnózisok viszonylag nagy száma fő-
ként a korai embriómortalitásra vezethető vissza, ugyanakkor nem lehet figyelmen
kívül hagyni az esetleges mintacseréket a telepeken, valamint a palpációs vemhes-
ségvizsgálat tévedéseit sem. Sokan már a termékenyítést követő 35–42. nap között
is képesek rectalis tapintással az üres tehének kiszűrésére. Saját – ötven, véletlen-
szerűen kiválasztott üzemre vonatkozó – felmérésünk szerint a 42. nap körüli rec-
talis vemhességvizsgálat ma sajnos nem jellemző a magyarországi tehenészetekre,
az eltolódott a 60. nap környékére (sőt sok üzemben csak 90. napra vizsgálnak).
Ennek hátterében a gyakorlatlanság mellett valószínűleg még a korai palpacio
okozta veszteségektől (akár 4–10% is lehet) (1) való félelem is állhat.

A pontatlan diagnózisok okainak kiderítésére végeztük el kontrollált körülmé-
nyek között (UH-echográfiás vizsgálattal utólagosan ellenőrizve) újabb üzemi vizs-
gálatunkat.

A téves pozitív eredmény a korai embrióelhalás következménye lehet

3. A teszt megbízhatósági vizsgálata

A 336 tehén vemhességvizsgálata során (4. táblázat) nem volt fals negatív vizsgá-
lati eredményünk. Ez a tény megerősítette korábbi gyanúnkat, miszerint az üzemi
vizsgálat során tapasztalt viszonylag nagyszámú fals negatív (5,9%) eset valószí-
nűleg mintacserére volt visszavezethető. Amennyiben ezt elfogadjuk, akkor fel kell

tételezzük azt is, hogy ugyanennyivel nőtt a fals pozitív esetek száma is, tehát az eredetileg 27,4% fals pozitív esetszám 23,7%-ra csökken. Ez már megközelíti az irodalmi adatok alapján feltételezhető embrióvesztés, ill. az esetleges téves palpációs diagnózisok mértékét.

Összefoglalva megállapítható, hogy a PSPB kimutatásán alapuló Biopryn® ELISA vemhességi teszt jó eredménnyel használható szarvasmarha-állományokban akár üzemi körülmények között is. Használatával a termékenyítést követő 30 nappal az üresen maradt tehenek 100%-os biztonsággal kiszűrhetők. Az eredmények pontossága jelentősen függ a mintavétel és a mintaküldés pontosságától. Eredményeink alapján a teszt alkalmas lehet a korai embrionális veszteségek mértékének előrejelzésére is. Az erre vonatkozó vizsgálatokat kontrollált körülmények között (UH-echográfiával több alkalommal ellenőrzött állományokban) a közelmúltban megkezdtük.

IRODALOM

1. ALEXANDER, B. M. – JOHNSON, M. S. et al.: Embryonic loss from 30–60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology*, 1995. 43. 551–556.
2. MÉSZÁROS GY.: A gazdaságos tejtermelés és a teljesítményvizsgálat összefüggései. Nemzetközi Szarvasmarha-tenyésztési Tanácskozás (előadás). Farmer Expo. Debrecen, 2003.
3. SASSER, R. G. – RUDER, C. A. et al.: Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.*, 1986. 35. 936–942.
4. SASSER, R. G. – CROCK, J. – RUDER, C. A.: Characteristics of pregnancy-specific protein B in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 1989. 37. 109–113.
5. SASSER, R. G.: User's Manual of the Biopryn Test. Biotracking LLC, 2003.
6. SZENCI, O. – BECKERS, J. F. – HUMBOLT, P. – SULON, J. – SASSER, R. G. – TAVERNE, M. A. M. – VARGA, J. – BALTUSER, R. – SCHEKK, GY.: Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein b, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 1998. 50. 77–88.
7. SZENCI, O. – BECKERS, J. F. – SULON, J. – BEVERS, M. M. – BÖRZSÖNYI, L. – FODOR, L. – KOVÁCS, F. – TAVERNE, M. A. M.: Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy-associated glycoprotein 1 in heifers. *Vet. J.*, 2003. 3. 307–313.

Közlésre érk.: 2004. jan. 5.