

阿爾拜因山羊生乳中懷孕相關醣蛋白濃度 與分娩頭數之關係⁽¹⁾

楊明桂⁽²⁾ 蘇展樑⁽³⁾ 林宗毅⁽⁴⁾ 涂柏安⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：111 年 5 月 17 日；接受日期：111 年 9 月 23 日

摘 要

母山羊在配種完進行懷孕診斷後，會將懷孕母羊進行分群管理，然而多胞胎（雙胞胎以上）、雙胞胎及單胞胎母羊之營養需求顯著不同，多胞胎母羊在懷孕期間應有特別照護及供應額外營養，以減少懷孕羊隻罹患代謝紊亂及妊娠毒血症（pregnancy toxemia），亦可減少因體弱造成的出生仔羊死亡率。本試驗應用檢測阿爾拜因泌乳羊懷孕各階段乳汁中之懷孕相關醣蛋白（pregnancy-associated glycoprotein, PAG）濃度，並與實際分娩頭數對照，藉以判斷懷孕胎數及懷孕天數或階段之關係。研究結果顯示，試驗期間（懷孕 10 – 94 日）阿爾拜因懷孕母羊生乳之 PAG 濃度顯著受懷孕胎數目（三胞胎、雙胞胎或單胞胎）之影響（ $P < 0.05$ ），懷孕天數則僅於懷孕早期（懷孕 10 – 43 日）及中期（懷孕 49 – 78 日）具顯著性影響（ $P < 0.05$ ）。觀察阿爾拜因山羊懷孕胎數與乳中 PAG 濃度正相關，與其他研究顯示血液中 PAG 濃度與胎兒數目呈正相關之結果一致，且多重線性迴歸分析的結果，在各懷孕階段亦顯示懷孕胎數目較懷孕天數影響乳中 PAG 濃度更大。此項以非侵入性生乳檢測進行多胞胎診斷，可減少動物因驅趕所造成之緊迫，檢測出之結果可提供羊農預先進行懷孕母羊分群及仔羊照護準備，並輔助進行場內三個月內之羊乳生產及飼養規模預測。

關鍵詞：阿爾拜因山羊、懷孕相關醣蛋白、生乳。

緒 言

母畜在配種完進行懷孕診斷後，通常會將有孕及無孕之母畜進行分群管理。然而，Marai and Owen (1987) 研究指出這樣的分群方式對於易懷有多胞胎的綿羊尚不足，前述作者認為懷有多胞胎的綿羊在懷孕後期時應被特別照護及供應額外之營養分。Alkan *et al.* (2019) 認為多胞胎、單胞胎及未孕之綿羊其營養需求顯著不同。此外，多篇研究指出將單胞胎及多胞胎綿羊分群管理，可減少懷孕羊隻罹患代謝紊亂及妊娠毒血症，亦可減少出生羔羊死亡率 (Karen *et al.*, 2006; Yotov, 2007)。因此，將懷有多胞胎、單胞胎及未孕母山羊進行分群管理，並提供不同營養配方之飼糧，確有其必要性。

辨別配種後母山羊是否有孕及懷孕胚胎數量的方法，一般是使用超音波進行孕檢，亦有研究指出胚胎與懷孕母畜卵巢所分泌的內分泌素如懷孕相關醣蛋白（pregnancy-associated glycoprotein, PAG）、助孕素（progesterone, P4）及硫酸雌酮（estrone sulfate, E1S）可作為母畜懷孕與否及胚胎健康程度之標誌，但後兩者是否能用於檢測胚胎數量之準確度及應用性仍存在爭議 (Fukui *et al.*, 1986; Karen *et al.*, 2001; Yotov, 2007)；PAG 是天門冬胺酸家族之一員，由胚胎的滋胚層（trophoblastic placental layer）所分泌，經由血液循環運輸至懷孕母體體液中，因此可藉由檢測母體體液中 PAG 濃度判斷是否有孕或確認胚胎健康程度 (Wooding *et al.*, 2005)。因此，本試驗是以母體 PAG 作為分子標誌以判定懷孕與否及胚胎數目。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2717 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 社團法人中華民國乳業發展協會。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所主任秘書室。

(5) 通訊作者，E-mail: tpa@mail.tlri.gov.tw。

檢測懷孕山羊母體中 PAG 濃度，主要有兩種方式，分別為放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 及酵素免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，前者由於操作成本較高且須特殊防護措施，因此逐漸被後者取代。若依樣本種類區分，可分為生乳及血液 2 種，Singh *et al.* (2019a) 若皆以同樣的商用 ELISA 試劑檢測，其血液中 PAG 濃度約為乳中 2 倍，然而其準確度略低於全脂羊乳 (93.3% vs. 94.4%)。爰此，為配合乳山羊在泌乳期每日擠乳作業，及減少不必要的驅趕動物或限制動物自由行動所造成的緊迫，本試驗收集每日擠乳作業乳樣作為本試驗的樣本來源。

臺灣酪農目前飼養阿爾拜因 (Alpine) 山羊比例佔總飼養乳山羊頭數 70% 以上 (黃, 2008)，因此本試驗使用 ELISA 之方式檢測阿爾拜因山羊生乳中 PAG 濃度，並分析最佳驗孕時間及探討配種後天數、胚胎數量與生乳中 PAG 濃度之相關性。

材料與方法

I. 試驗動物和繁殖狀態的判定

本試驗之動物飼養於臺灣南部的乳羊場，試驗動物為阿爾拜因經產母羊 (3 胎至 5 胎) 分為 2 批次共 348 頭，發情同期化後進行人工授精。配種後使用超音波 (ALOKA Prosound 2, Japan) 驗孕，驗孕時間參考 Karadaev (2015) 研究結果，於配種後 45 至 50 日進行驗孕，其標的為超音波儀螢幕上顯示之胚、胎膜或胎兒時，則判定為懷孕及辨別懷胎數目。同時請飼主提供羊隻生產與繁殖相關資料，包含品種、胎次及人工授精時間等紀錄。以經腹部超音波確認有孕的羊隻再持續進行本試驗，試驗母羊分娩後亦請場主紀錄分娩羔羊頭數。

II. 樣本收集

乳羊生乳樣本採樣時間為人工授精後 10 日開始採集，每週採集生乳一次，至懷孕約 94 天結束。採樣方式為採集擠乳前之乳樣至 1 mL 的無菌離心管內，採樣完成後以冷藏配送至新竹分所牛乳檢驗室，並於 3 日內完成分析，生乳樣本於化驗時於須先於室溫下回溫。

III. 生乳樣品檢測與判定方法

生乳中 PAG 濃度數據依懷孕種類分為單胞胎、雙胞胎及三胞胎，配種後天數區分為懷孕早期 (懷孕第 10 至 43 天)、懷孕中期 (懷孕第 49 至 78 天) 及懷孕後期 (懷孕第 85 至 94 天)。生乳 PAG 檢測使用定量生乳 PAG ELISA 檢驗套組 (Milk Pregnancy Test Kit, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA)。每一盤 96 格樣品盤各包含 2 個陽性控制組及陰性控制組。反應結束後依據製造商指示使用專用的分光光度計 (SpectraMax® Absorbance Reader CMax Plus, USA) 分別以 450 與 630 nm 波長濾光片讀取生乳樣本中 PAG 吸光值。定量結果是以樣品光學密度 (optical density, OD) 值減陰性控制組平均值，以 PAG (sample-negative) 值表示之；當相減值超過 0.25 判定為陽性即為懷孕，小於 0.25 則判定為陰性即為未懷孕。

IV. 統計分析

以 SAS 統計軟體中線性混合模型 (SAS, 2014) 進行分析，懷孕種類及懷孕時間 (懷孕天數或懷孕階段) 作為固定因子，懷孕種類 × 懷孕時間交感因子，採樣時間為重複效應，懷孕母羊個體為隨機效應。以 Bonferroni 事後校正進行各懷孕階段 PAG 濃度的多重均值比較，相關數字以平均 ± 標準誤差表示。當 $P < 0.05$ 時則代表具有顯著差異， $P < 0.001$ 時則代表具有極顯著差異。

出生窩仔數、懷孕天數及乳中 PAG 濃度繁殖變因之間相關性以皮爾森積差相關分析 (Pearson correlation) 進行。多重線性迴歸分析 (multivariate linear regression analysis) 用於確認出生產仔數及懷孕天數等個別因子對於乳中 PAG 濃度的影響程度及顯著性。

結 果

I. 阿爾拜因母羊懷孕期間生乳中 PAG 濃度變化

本試驗收集 348 頭懷孕之阿爾拜因山羊懷孕期間 (10 – 94 日) 之生乳樣本，其生乳 PAG 濃度是使用商業套組以酵素免疫分析法進行檢測，並將結果與經腹部超音波 (transabdominal ultrasound) 及分娩頭數相互對照。懷孕期間不同階段之生乳 PAG 平均濃度值如表 1，在懷孕早期 (10 – 43 日) 348 頭懷孕之生乳 PAG 平均濃度值

為 0.280 ± 0.331 ，最大值為 2.376，最小值為 -0.016；懷孕中期 (49 – 78 日) 348 頭懷孕之生乳 PAG 平均濃度值為 1.029 ± 0.824 ，最大值為 3.868，最小值為 0.178；懷孕後期因 2 頭羊發生流產，因此 346 頭持續懷孕之生乳 PAG 濃度值為 1.010 ± 0.675 ，最大值為 3.435，最小值為 0.421。

表 1. 阿爾拜因山羊不同懷孕階段乳中懷孕相關醣蛋白

Table 1. The concentration of milk pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentrations in the gestation stages of Alpine goat

| Pregnancy period | Number of animals | PAG concentration (S-N value)* | | |
|------------------|-------------------|--------------------------------|---------|---------|
| | | Mean \pm Std.deviation | Minimum | Maximum |
| Early pregnancy | 170 | 0.280 ± 0.331 | -0.016 | 2.376 |
| Middle pregnancy | 170 | 1.029 ± 0.824 | 0.178 | 3.868 |
| Late pregnancy | 168 | 1.010 ± 0.675 | 0.421 | 3.435 |

*S-N value: Sample - negative value.

II. 懷孕期間懷孕胎數與生乳 PAG 濃度之關係

三胞胎、雙胞胎及單胞胎母羊懷孕期間生乳 PAG 濃度之變化如圖 1 所示。懷孕三胞胎、雙胞胎及單胞胎之阿爾拜因山羊，其生乳 PAG 濃度於第 33 日開始上升，自第 49 日起懷孕三胎母羊顯著高於另外兩組，並分別於第 71 及 78 天達到最高值。在懷孕早期 (懷孕 10 – 43 日) 生乳 PAG 濃度呈現逐漸上升之趨勢，且顯著受懷胎數目 ($P < 0.05$) 及懷孕天數 ($P < 0.05$) 之影響，懷三胞胎與雙胞胎者生乳 PAG 濃度高於單胞胎者 (0.319 ± 0.100 vs. 0.319 ± 0.035 vs. 0.132 ± 0.065)，生乳 PAG 濃度與懷胎數目 \times 懷孕天數並無顯著之交感效應 ($P > 0.05$)。

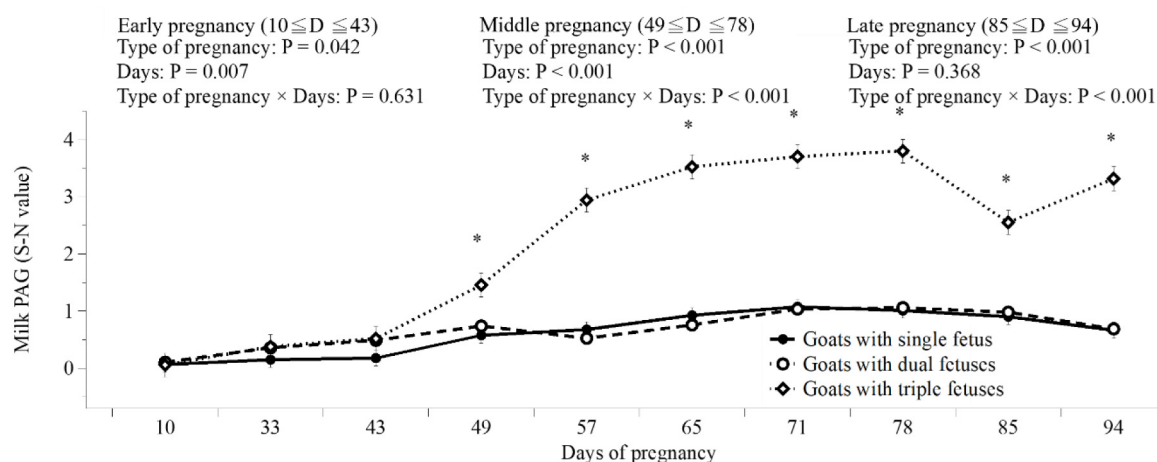


圖 1. 阿爾拜因山羊於懷孕早期、中期及後期，以酵素結合免疫吸附分析法分析單胞胎、雙胞胎與三胞胎母羊生乳中懷孕相關醣蛋白之平均濃度，三胞胎母羊乳中 PAG 濃度顯著高於其他單胞胎與雙胞胎母羊 ($*P < 0.05$)。懷孕早期為懷孕第 10 至 43 天；懷孕中期為懷孕第 49 至 78 天；懷孕後期為懷孕第 85 至 94 天。

Fig. 1. Dynamic profiles of concentrations of milk pregnancy-associated glycoprotein (PAG) quantified using an ELISA in single fetus, dual fetuses, and triple fetuses bearing Alpine goat does during early, middle, and late pregnancy. Early pregnancy represents gestation stage from 10 to 43 days of gestation; middle pregnancy is the 49 to 78 days of gestation; late pregnancy is the 85 to 94 days of gestation. Type of pregnancy indicates single, dual, or triple fetuses. $*P < 0.05$ indicates significant higher milk PAG concentration in triple fetuses bearing goat does at each time.

懷孕中期 (懷孕 49 – 78 日) 生乳 PAG 濃度仍然呈上升之趨勢，至懷孕第 78 日達最高值，且其極顯著受懷胎數目 ($P < 0.001$) 及懷孕天數 ($P < 0.05$) 之影響，其中懷有三胞胎母羊生乳 PAG 濃度分別顯著高於雙胞胎與單胞胎母羊 (3.085 ± 0.109 vs. 0.824 ± 0.039 vs. 0.853 ± 0.071 , $P < 0.05$)，生乳 PAG 濃度與懷胎數目及懷孕天數具有極顯著之交感效應 ($P < 0.001$)；懷孕後期 (85 – 94 日) 生乳 PAG 濃度呈現上升之趨勢，且極顯著受懷胎數目之影響 ($P < 0.001$)，其中懷有三胞胎母羊生乳 PAG 濃度顯著高於雙胞胎與單胞胎母羊 (2.934 ± 0.104 vs. 0.835 ± 0.037 ; 0.784 ± 0.068 , $P < 0.05$)，生乳 PAG 濃度與懷胎數目及懷孕天數具有極顯著之交感效應 ($P < 0.001$)。

整個懷孕期間之阿爾拜因山羊乳中 PAG 濃度與胚胎數目及懷孕天數，詳如表 2。結果顯示，胚胎數目及懷孕天數與阿爾拜因山羊乳中 PAG 濃度皆為正相關 ($r = 0.404$ vs. 0.445 , $P < 0.001$)。

表 2. 阿爾拜因山羊乳中懷孕相關醣蛋白濃度與胚胎數目及懷孕天數的相關係數

Table 2. Correlation coefficients of milk pregnancy-associated glycoprotein (PAG) with fetal number and gestation length during pregnancy in Alpine goats

| Pregnancy stage | Variable | Correlation coefficient | P value |
|------------------|------------------|-------------------------|---------|
| Early pregnancy | Fetal number | 0.195 | 0.050 |
| | Gestation length | 0.421 | < 0.001 |
| Middle pregnancy | Fetal number | 0.500 | < 0.001 |
| | Gestation length | 0.266 | < 0.001 |
| Late pregnancy | Fetal number | 0.610 | < 0.001 |
| | Gestation length | -0.140 | 0.254 |
| Whole period | Fetal number | 0.404 | < 0.001 |
| | Gestation length | 0.445 | < 0.001 |

* Early pregnancy = 10 to 43 days of gestation; Middle pregnancy = 49 to 78 days of gestation; Late pregnancy = 85 to 94 days of gestation.

III. 多重線性迴歸分析阿爾拜因山羊乳中 PAG 濃度與懷孕胎數及懷孕天數的關係

以多重線性迴歸分析阿爾拜因山羊乳中 PAG 濃度與胎兒數目及懷孕天數的關係 (表 3)，比較不同階段乳中 PAG 濃度未標準化迴歸係數 (unstandardized coefficient) 及標準化迴歸係數 (standardized β coefficient)，結果顯示於懷孕中期與後期時，胎兒數目為預測羊乳中 PAG 濃度之較佳參數；而在懷孕早期相對於懷孕中期及懷孕後期，懷孕天數為預測羊乳中 PAG 濃度之較佳參數。

表 3. 多重線性迴歸分析阿爾拜因山羊乳中懷孕相關醣蛋白濃度與胎兒數目及懷孕天數的關係

Table 3. Multiple linear regression analyses results for the relationship of milk pregnancy-associated glycoprotein (PAG) with fetal number during pregnancy and gestation length in Alpine goats

| Pregnancy stage | Dependent variable | Unstandardized coefficient | Standardized β coefficient | P-value | Adjusted R^2 |
|------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------------|---------|----------------|
| Early pregnancy | Fetal number | 0.121 | 0.195 | 0.031 | 0.215 |
| | Gestation length | 0.010 | 0.421 | < 0.001 | |
| Middle pregnancy | Fetal number | 0.776 | 0.500 | < 0.001 | 0.321 |
| | Gestation length | 0.021 | 0.266 | < 0.001 | |
| Late pregnancy | Fetal number | 0.772 | 0.610 | < 0.001 | 0.392 |
| | Gestation length | -0.021 | -0.140 | 0.152 | |

* Early pregnancy = 10 to 43 days of gestation; Middle pregnancy = 49 to 78 days of gestation; Late pregnancy = 85 to 94 days of gestation.

討 論

乳羊配種後若要進行懷孕檢測或懷孕胚胎數量判定，大部分是使用經腹部超音波。然而，Jones *et al.* (2016) 報告指出，在懷孕第 45 天使用經腹部超音波進行胚胎數量檢測時，其準確率隨著胚胎數量提高而降低，單胞胎至三胞胎準確率分別為 100、87 及 31%。近年來，已有多篇試驗研究報告證實 PAG 濃度可做為牛、綿羊及山羊懷孕與否之分子標誌 (Karen *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004; Byrem *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2017)，亦有部分研究使用 PAG 濃度來預估胚胎數量。若能於配種後儘速得知是否懷孕，以及於懷孕初期進行胎兒數目的預測，可改善山羊的繁殖效率、懷孕率並減少胎距，且能依據胎兒數目調整待產母羊及新生仔羊的照護管理措施，並提升育成率。

I. 阿爾拜因母羊懷孕期間生乳中 PAG 濃度變化

本試驗以酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 檢測懷孕阿爾拜因山羊生乳中 PAG 濃度，於懷孕 33 天至 94

天乳中 PAG 的濃度範圍為 0.297 – 3.868，顯著高於一般用於判定乳用反芻動物的 0.25 懷孕標準。其他篇作者研究發現，以 ELISA 方式檢測山羊全脂乳 (whole milk) 及脫脂乳 (skim milk) 中 PAG 濃度，在試驗期間 (懷孕第 28 至 53 日) 平均濃度分別為 1.16 ± 0.13 及 1.23 ± 0.13 ，且未孕羊隻皆未達 0.25 懷孕標準 (Singh *et al.*, 2019a) 顯示此法能作為熱帶地區阿爾拜因山羊的懷孕檢測方法，並至少於配種後 33 天提供正確驗孕結果，此亦與 Singh *et al.* (2020) 結果相近，該篇試驗結果顯示可獲得正確驗孕結果之時段最早為配種後 37 天。

II. 懷孕期間懷孕胎數與生乳 PAG 濃度之關係

本試驗研究結果顯示懷孕單胞胎、雙胞胎與三胞胎阿爾拜因山羊其乳中 PAG 之濃度於第 33 日開始上升，自第 49 日起懷孕三胎母羊顯著高於另外兩組，並分別於第 71 及 78 天達到最高值。Singh *et al.* (2019b) 試驗發現母山羊血漿中 PAG 濃度亦自懷孕第 28 天起上升，最高值出現在懷孕第 51 日。但也有研究顯示不同品種山羊的血中 PAG 濃度最高值出現在配種後 48.6 ± 5.0 天，並維持至懷孕第 12 週 (González *et al.*, 2000)；其他研究發現綿羊血中 PAG 濃度自懷孕第 28 天起上升，且最高值出現在第 62 天 (Rovani *et al.*, 2016)。不同山羊或綿羊品種之間 PAG 最高值也有可能不同，本研究最高值為 3.868，較 Singh *et al.* (2019a) 2.83 為高，推測山羊或綿羊之間受到品種、胎次以及乳量的影響，其血中以及乳中 PAG 濃度會出現差異。滋胚層細胞中雙核細胞佔約 20%，其負責製造分泌懷孕期母體循環所需的賀爾蒙及其他產物 (Schlafer *et al.*, 2000)；這些位於胎盤的雙核細胞為母體中 PAG 的主要來源，在懷孕期中最早可於第 18 天被觀察到並於第 19 – 23 天起快速增加 (Wango *et al.*, 1990)，因此一般預期血液 PAG 最早可於懷孕第 26 天後被偵測到，因此本研究觀察到懷孕第 33 天起可被有效定量，亦符合相關研究中觀察到胎盤雙核細胞於懷孕早期階段發育時間點。

III. 生乳 PAG 濃度與懷孕胎數及懷孕天數之關係

有許多因素可能影響山羊懷孕期中 PAG 的濃度，本研究發現懷孕三胞胎的阿爾拜因山羊，其乳中 PAG 濃度顯著的較雙胎與單胎者高，並最早可於懷孕第 44 天起出現差異並持續至 94 天以上。其他研究發現山羊 (Batalha *et al.*, 2001)、牛 (Szelényi *et al.*, 2015) 及綿羊 (Ledezma-Torres *et al.*, 2006) 之雙胞胎較單胞胎血中 PAG 濃度於懷孕初期及懷孕中期更高；也有其他研究顯示雙胞胎較單胞胎血中 PAG 濃度的差異僅出現在懷孕中期及懷孕後期高 (Sousa *et al.*, 1999; Szelényi *et al.*, 2015)；亦有研究顯示雙胞胎與單胞胎母羊血中 PAG 濃度僅在分娩前 4 週具有顯著差異 (Robert *et al.*, 2017)。Singh *et al.* (2019b) 試驗結果則顯示雙胞胎較單胞胎母羊血液中 PAG 濃度最早可於懷孕第 28 天起出現差異並持續至 93 天為止，且其懷孕前期 (懷孕第 26 天至 51 天) 及中期 (懷孕第 58 天至 114 天) 血液中 PAG 濃度亦僅受懷孕胚胎數目 ($P < 0.001$) 及懷孕天數 ($P = 0.012$) 之影響 (Singh *et al.*, 2019b)，此與本研究觀察較為接近。造成此現象的原因可能跟胎盤及相關組織應對胎兒數上升的總重量增加，進而提升雙核細胞的總數量，導致分泌較多量之 PAG 有關 (Ranilla *et al.*, 1997)，這也可以解釋出生胎兒數與血液中 PAG 濃度呈現正相關 (Echternkamp *et al.*, 2006)。

然而，本試驗結果顯示，雙胞胎及單胞胎阿爾拜因母羊生乳中 PAG 濃度並無顯著性差異。其他篇作者以放射免疫分析法檢測 Sarda 及 Lacaune 綿羊血液中 PAG 濃度，結果顯示雙胞胎與單胞胎之 Sarda 及 Lacaune 綿羊懷孕期間血液中 PAG 濃度無顯著之差異性 (Carolus *et al.*, 2020)，與本試驗結果較為相似，推測除了可能與檢測 PAG 的抗原決定區域 (epitope) 差異有關 (Barbato *et al.*, 2013) 之外，檢測來自於血液中或乳中的 PAG，可能會由於每日乳量變化影響 PAG 的相對濃度。

結 論

本試驗研究結果顯示，試驗期間 (懷孕 10 至 94 日) 阿爾拜因懷孕母羊生乳中 PAG 濃度顯著受懷胎數目之影響 ($P < 0.05$)，懷孕期間則僅在懷孕早期 (懷孕 10 – 43 日) 及中期 (懷孕 49 – 78 日) 影響具顯著性 ($P < 0.05$)。本研究觀察阿爾拜因山羊懷孕胎數與乳中 PAG 濃度正相關，與其他研究顯示血液中 PAG 濃度與胎兒數目呈正相關一致，且多重線性迴歸分析的結果在各懷孕階段亦顯示懷胎數目較懷孕天數影響乳中 PAG 濃度更大。綜合以上分析，此項非侵入性生乳檢測進行多胞胎診斷，可減少動物因驅趕所造成之緊迫，檢測出之結果可提供羊農預先進行懷孕母羊分群及仔羊照護準備，並輔助進行場內三個月內之羊乳生產及飼養規模預測。

致 謝

本研究承行政院農業委員會提供研究經費【110 農科 -2.1.2- 畜 -L1(5)】，由社團法人中華民國乳業協會檢驗組

同仁鄭楹謚、新竹分所邱怡萍、宋春蓮提供試驗協助，得以順利完成，特此申謝。

參考文獻

- 黃政齊。2008。畜牧要覽草食家畜篇。中國畜牧學會，臺南市，第 79-89 頁。
- Alkan, H., M. B. Kivrak, F. Satilmis, M. A. Tekindal, and D. A. Dinc. 2019. Detection of twin pregnancies in ewes by pregnancy-associated glycoprotein assay and transabdominal ultrasonography. *Domest. Anim. Endocrinol.* doi: domaniend. 2019.106399.
- Barbato, O., N. M. de Sousa, V. L. Barile, C. Canali, and J. F. Beckers. 2013. Purification of pregnancy associated glycoproteins from late pregnancy *Bubalus bubalis* placentas and development of a radioimmunoassay for pregnancy diagnosis in water buffalo females. *BMC Vet. Res.* 9: 89-101.
- Batalha, E. S., J. Sulon, J. R. Figueiredo, J. F. Beckers, G. A. Martins, and L. D. M. Silva. 2001. Relationship between maternal concentrations of caprine pregnancy-associated glycoprotein in Alpine goats and the number of fetuses using a homologous radioimmunoassay. *Small Ruminant Res.* 42: 105-109.
- Byrem, T. M., K. Velek, and H. L. Pearse. 2012. The detection of pregnancy associated glycoproteins (PAG) in routine milk recording samples as an indicator of pregnancy in dairy cattle. *Glob. Stand. Livest. Data.* ICAR, Rome, Italy.
- Carolis, M. D., O. Barbato, G. Acuti, M. Tabalza-Marinucci, N. M. de Sousa, C. Canali, and L. Moscati. 2020. Plasmatic profile of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during gestation and postpartum in sarda and lacune sheep determined with two radioimmunoassay systems. *Animals* 10: 1502-1514.
- Chaves, C. M. S., R. L. D. Costa, K. M. R. Duarte, D. C. Machado, C. C. P. Paz, and R. T. Beltrame. 2017. Visual ELISA for detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in ewe serum. *Theriogenology* 97: 78-82.
- Echternkamp, S. E., K. A. Vonnahme, J. A. Green, and S. P. Ford. 2006. Increased vascular endothelial growth factor and pregnancy-associated glycoproteins, but not insulin-like growth factor-I, in maternal blood of cows gestating twin fetuses. *J. Anim. Sci.* 84: 2057-2064.
- Fukui, Y., M. Kobayashi, M. Tsubaki, M. Tetsuka, K. Shimoda, and H. Ono. 1986 Comparison of two ultrasonic methods for multiple pregnancy diagnosis in sheep and indicators of multiple pregnant ewes in the blood. *Anim. Reprod. Sci.* 11: 25-33.
- González, F., J. Sulon, J. Garbayo, M. Batista, F. Cabrera, P. Calero, A. Gracia, and J. Beckers. 2000. secretory profiles of pregnancy-associated glycoproteins at different stages of pregnancy in the goat. *Reprod. Domest. Anim.* 35: 79-82.
- González, F., F. Cabrera, M. Batista, N. Rodríguez, D. Álamo, J. Sulon, J. F. Beckers, and A. Gracia. 2004. A comparison of diagnosis of pregnancy in the goat via transrectalultrasound scanning, progesterone, and pregnancy-associated glycoprotein assays. *Theriogenology* 62: 1108-1115.
- Jones, A. K., R. E. Gately, K. K. McFadden, S. A. Zinn, K. E. Govoni, and S. A. Reed. 2016. Transabdominal ultrasound for detection of pregnancy, fetal and placental landmarks, and fetal age before Day 45 of gestation in the sheep. *Theriogenology* 85: 939-945.
- Karadaev, M. 2015. Pregnancy diagnosis techniques in goats - a review. *Bulg. J. Vet. Med.* 18: 183-193.
- Karen, A., P. Kovács, J. F. Beckers, and O. Szenci. 2001. Pregnancy diagnosis in sheep: Review of the most practical methods. *Acta. Vet. Brno.* 70: 115-126.
- Karen, A., J. F. Beckers, J. Sulon, N. M. De Sousa, K. Szabados, J. Reczigel, and O. Szenci. 2003. Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology* 59: 1941-1948.
- Karen, A., B. E. Amiri, J. F. Beckers, J. Sulon, M. A. M. Taverne, and O. Szenci. 2006. Comparison of accuracy of transabdominal ultrasonography, progesterone and pregnancy-associated glycoproteins tests for discrimination between single and multiple pregnancy in sheep. *Theriogenology* 66: 314-322.
- Ledezma-Torres, R. A., J. F. Beckers, and W. Holtz. 2006. Assessment of plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in sheep with a heterologous (anticaPAG55+59) RIA and its potential for diagnosing pregnancy. *Theriogenology* 66: 906-912.
- Marai, I. F. M. and J. B. Owen. 1987. New techniques in sheep production. 1st ed. Butterworth-Heinemann. London, U. K.
- Ranilla, M. J., J. Sulon, A. R. Mantecón, J. F. Beckers, and M. D. Carro. 1997. Plasma pregnancy associated glycoprotein

- and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Ruminant Res.* 24: 125-131.
- Roberts, J. N., K. J. May, and A. Veiga-Lopez. 2017. Time-dependent changes in pregnancy associated glycoproteins and progesterone in commercial crossbred sheep. *Theriogenology* 89: 271-279.
- Rovani, M. T., A. S. Cezar, M. L. Rigo, B. G. Gasperin, J. E. da N. Júnior, F. D. Torres, P. B. D. Gonçalves, R. Ferreira, M. T. Rovani, A. S. Cezar, M. L. Rigo, B. G. Gasperin, J. E. da N. Júnior, F. D. Torres, P. B. D. Gonçalves, and R. Ferreira. 2016. Evaluation of a bovine pregnancy-associated glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay kit for serological diagnosis of pregnancy in sheep. *Ciência Rural.* 46: 362-367.
- SAS. 2014. SAS user guide: Statistics, SAS Inst., Cary, NC., USA.
- Schlafer, D. H., P. J. Fisher, and C. J. Davies. 2000. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 145-160.
- Singh, S. P., R. Natesan, N. Sharma, A. K. Goel, M. K. Singh and S. D. Kharche. 2019a. Pregnancy-associated glycoprotein profile in milk and its relationship with the circulating level during early pregnancy in goats. *Small Ruminant Res.* 173: 81-87.
- Singh, S. P., N. Ramachandran, N. Sharma, A. K. Goela, K. Gururajb, and S. D. Kharche. 2019b. Temporal changes in plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein, progesterone and estrone sulfate associated with fetal number during early- and mid-pregnancy in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 205: 115-125.
- Singh, S. P., N. Ramachandran, N. Sharma, A. K. Goel, M. K. Singh, and S. D. Kharche. 2020. Assessment of pregnancy-associated glycoprotein profile in milk for early pregnancy diagnosis in goats. *Asian Austral. J. Anim.* 34: 26-35.
- Sousa, N. M., J. M. Garbayo, J. R. Figueiredo, J. Sulon, P. B. D. Gonçalves, and J. F. Beckers. 1999. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and postpartum in native goats from the north-east of Brazil. *Small Ruminant Res.* 32: 137-147.
- Szelényi, Z., A. Répási, N. M. de Sousa, J. F. Beckers, and O. Szenci. 2015. Accuracy of diagnosing double corpora lutea and twin pregnancy by measuring serum progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 in the first trimester of gestation in dairy cows. *Theriogenology* 84: 76-81.
- Wango, E. O., F. B. P. Wooding, and R. B. Heap. 1990. The role of trophoblast binucleate cells in implantation in the goat: A quantitative study. *Placenta* 11: 381-394.
- Wooding, F. B., R. M. Roberts, and J. A. Green. 2005. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta* 26: 807-827.
- Yotov, S. 2007. Determination of the number of fetuses in sheep by means of blood progesterone assay and ultrasonography. *Bulg. J. Vet. Med.* 10: 185-193.

The relationship between fetal number and pregnancy-associated glycoprotein in milk of Alpine goat ⁽¹⁾

Ming-Kuei Yang ⁽²⁾ Chan-Liang Su ⁽³⁾ Chung-Yi Lin ⁽⁴⁾ and Po-An Tu ⁽²⁾⁽⁵⁾

Received: May 17, 2022; Accepted: Sep. 23, 2022

Abstract

Grouping management is a common practice of applying pregnancy test to separate the pregnant goats from not pregnant ones after breeding. The nutritional need is significantly different among goats with single, twin, and multiple fetuses. Pregnant goats with multiple fetuses require special attention and nutrients to avoid metabolic disorder, pregnancy toxemia, thereby to reduce the mortality of weak lambs. We analyzed the pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in goat milk with different fetal number, pregnancy days, and pregnancy stages. The result showed that goats with different fetal number were significantly different in milk PAG concentration ($P < 0.05$), from 10 to 94 days of pregnancy. PAG concentration was significantly different in early (10 to 43 days) and middle (49 to 78 days) pregnancy ($P < 0.05$). Milk PAG concentration was positively correlated with fetal number. Multiple linear regression suggested that fetal number was a more precise predictor than gestation length for milk PAG concentration, while predicting fetal number using milk PAG concentration in middle and late pregnancy could be plausible. This non-invasive and stress free method could be used for care preparations for both pregnant goats and lambs, and also used for goat milk production and herd size estimation in the field.

Key words: Alpine goat, Pregnancy-associated glycoprotein, Raw milk.

(1) Contribution No. 2717 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

(3) Dairy Association Taiwan, R. O. C., Taipei 10644, Taiwan, R. O. C.

(4) Chief Secretary Office, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: tpa@mail.tlri.gov.tw.