

以生乳中懷孕相關醣蛋白濃度進行阿爾拜因山羊 多胎懷孕早期預測⁽¹⁾

陳珮彤⁽²⁾ 楊明桂⁽²⁾ 許佳憲⁽³⁾ 葉亦馨⁽²⁾ 陳怡璇⁽²⁾ 涂柏安⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：113 年 4 月 1 日；接受日期：113 年 5 月 24 日

摘 要

懷孕早期若能確認阿爾拜因山羊的胎羊數量，將有利於飼養人員根據胎羊數量進行對應之飼養管理。本試驗收集 348 頭懷孕阿爾拜因山羊之乳樣，分成懷孕第 33、43、49、57、65、71、78、85 與 94 天進行乳中懷孕相關醣蛋白 (pregnancy associated glycoprotein, PAG) 濃度的分析。試驗羊隻分娩頭數 1、2 及 3 頭以上的分別佔 21、71 及 8%。以接受者操作特徵曲線分析在懷孕不同天數下以乳中 PAG 不同濃度閾值判定多胞胎懷孕羊的曲線下面積。分析結果顯示，在懷孕 49 及 57 天，分別以乳中 PAG 閾值為 1.208 及 2.643 作為多胞胎懷孕羊的判斷，其曲線下面積分別為 0.903 及 1。進一步以典型判別函數分析乳中 PAG 不同濃度閾值及懷孕天數進行多胞胎與單雙胞胎懷孕羊的判定，評估兩者組間差異是否有顯著的差異。結果顯示，自懷孕天數 49 天開始，Wilk's Lambda 值為 0.786，代表懷有多胞胎與單雙胞胎母羊之乳中 PAG 濃度具有顯著差異 ($P < 0.01$)；而當懷孕天數達 57 天，Wilk's Lambda value 為 0.104，表示懷有多胞胎與單雙胞胎母羊之乳中 PAG 濃度具有極顯著差異 ($P < 0.001$)，故懷孕 49 至 57 天時皆可應用乳中 PAG 濃度區分本次分娩為多胞胎與單雙胞胎胎兒。綜上所述，懷孕 49 至 57 天時為使用乳中 PAG 篩選及判定懷孕阿爾拜因山羊為多胞胎與單雙胞胎之最理想時間點。

關鍵詞：阿爾拜因山羊、懷孕相關醣蛋白、胎羊數量。

緒 言

由於能量需求與飼養管理的不同，懷孕母羊會與未懷孕母羊分群飼養。目前懷孕診斷大多使用超音波進行檢測，但使用超音波進行懷孕頭數的判定會受到操作人員的判讀經驗影響 (Han *et al.*, 2012)，因此至今仍未有良好懷孕頭數判定方式。懷孕山羊若為多胞胎 (胎兒數量 ≥ 3) 時，其營養代謝與胎兒發育的需求會與單胞胎與雙胞胎山羊顯著不同，包含能量、蛋白質及礦物質的需求，且會隨著懷孕天數導致能量需求漸增 (El-Sayed *et al.*, 2022; Mongini and Van Saun, 2023)。若能量攝取不足則可能會增加母羊酮症 (ketosis) 與妊娠毒血症 (toxemia) 的發生 (Ji *et al.*, 2023)，故盡早確認母羊的懷孕頭數並給予不同的照護將可以減少疾病的發生 (Dinç *et al.*, 1994)。

懷孕相關醣蛋白 (pregnancy associated glycoprotein, PAG) 屬於不活性的天門冬胺酸蛋白酶家族 (aspartic proteinase) 的一員，為反芻動物之胎盤衍生物，經胎盤滋養層的雙核細胞 (binucleated cells) 所分泌 (Singh *et al.*, 2019a)。Singh *et al.* (2019a) 利用酵素免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測定懷孕巴巴里山羊 (Barbari goats) 血漿山羊妊娠相關醣蛋白 (caprine pregnancy-associated glycoprotein, caPAG) 濃度，結果顯示懷孕 28 天母羊血漿 caPAG 濃度顯著高於未懷孕母羊，表示懷孕與否會影響血漿中 caPAG 濃度。在懷孕天數上，血漿 caPAG 濃度會於懷孕 22 天開始升高、懷孕 45 天達高峰並在分娩後快速下降，於分娩後 14 天達基礎值 (Singh *et al.*, 2019a)。此外，懷有雙胞胎母羊之血漿 PAG 濃度在懷孕 28 天開始顯著高於懷單胞胎的母羊 (Singh *et al.*, 2019a)，且在懷孕中期及末期時測定血漿 caPAG 濃度，懷雙胞胎之母羊濃度約較懷單胞胎母羊高 1.4 – 1.8 倍 (Singh *et al.*, 2019a)。由上述文獻可知，血漿 PAG 濃度會受到懷孕階段及胎數的影響。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2792 號。

(2) 農業部畜產試驗所北區分所。

(3) 農業部畜產試驗所南區分所。

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

然而，過去文獻多為測定血中 PAG 濃度，但在採集血液屬於侵入性行為，且採集過程中可能會因為保定與入針等問題造成羊隻緊迫 (Gajewski *et al.*, 2008)；乳羊在泌乳期時需每天擠乳，擠乳屬於非侵入性行為，其所造成的緊迫遠較於採血低且尚不需要專業的採血技能及儲存血液的方法。因此，若能在每日例行性擠乳的過程中收集乳樣，測定懷孕山羊生乳 PAG 濃度，可避免因採血所造成的緊迫 (Gajewski *et al.*, 2008)。過去已有許多文獻表明，血中的 PAG 濃度約為生乳中濃度 2.0 倍 (Singh *et al.*, 2019b; Sharma *et al.*, 2020)。因此，使用生乳測定 PAG 濃度應為可行之方式。此外，生乳中 PAG 濃度亦會受到懷孕胎數多寡與懷孕天數影響 (楊等, 2022)。

因此，本試驗將於人工配種後 33 日開始每周採樣一次，於擠乳時進行收集阿爾拜因 (Alpine goats) 懷孕母羊之乳樣，測定其乳中 PAG 濃度，找出乳中 PAG 濃度可用於區別胎數的閾值 (threshold) 並分析最佳判定胎數的時間點，以作為後續懷孕胎數的預測參考。

材料與方法

I. 試驗動物管理與和生乳樣本收集

本試驗使用 348 頭阿爾拜因經產母羊 (3 – 5 胎) 進行發情同期化處理並配種。在執行配種後 45 至 50 日以超音波 (ALOKA Prosound 2, Japan) 進行懷孕檢測，並根據超音波所顯示之胚、胎膜與胎兒判定為懷孕。確認懷孕的羊隻會進行後續試驗，並記錄分娩的仔羊頭數。懷孕期間的採樣時間點參考楊等 (2022) 及 Shahin *et al.* (2013)，本試驗之羊乳樣本自配種後 33 日始採集，每週採集一次直到懷孕 94 天。採集時機點主要於擠乳之前採集 1 mL 的羊乳至無菌離心管中，並將其保存在 4°C 送至農業部畜產試驗所北區分所牛乳檢驗室，於檢驗前將樣本回溫至室溫待測。

II. ELISA 檢測分析生乳樣品 PAG 濃度

生乳 PAG 濃度測定使用懷孕生乳 PAG 檢測套組 (Milk Pregnancy Test Kit, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA)。該套組主要使用 ELISA 進行測定。每盤 96 孔盤有 2 孔陽性控制組 (positive control, PC) 及 2 孔陰性控制組 (negative control, NC)。將 96 孔盤放入 37°C 烘箱內震盪 2 小時均勻培養後，使用分光光度計 (SpectraMax® Absorbance Reader CMax Plus, USA) 以 450 與 630 nm 波長下測定 96 孔盤中生乳樣本的 PAG 吸光值 (optical density, OD)。計算 2 個 PC 及 NC 平均值為 PC mean 及 NC mean，確認 PC mean 減 NC mean 之平均值須大於 0.5，NC mean 須小於 0.2，檢測結果方具有可信度。生乳 PAG 濃度定量計算方式則為使用樣品 OD 值減 NC 平均值，乃 PAG 值，為 Sample-negative value (S-N value)。當 OD 值減 NC 平均值之差值大於 0.25 (包含 0.25) 時為陽性，即判定懷孕，低於 0.25 (不包含 0.25) 則為陰性，即判定未懷孕。

III. 統計分析

統計分析採用 JMP 軟體 (SAS Institute Inc., Cary, NC) (SAS, 2014) 執行。本研究使用 SAS 分析不同懷孕天數的阿爾拜因山羊生乳中 PAG 濃度以接受者操作特性 (receiver operating characteristic, ROC) 分析建立多胎性預測模型，並以曲線下面積 (area under the curve, AUC) 用於找出對於阿爾拜因多胎性準確度最高的預測最佳時間點，判斷最佳切點則根據 Youden index = 敏感性 (sensitivity) + 特異性 (specificity) – 1 的最大值進行判定，後續以判別函數進一步基於各變量之線性組合評估典型判別函數 (canonical discriminant analysis, CDA) 係數，進一步確認不同採樣時間點 (懷孕第 33、43、49、57、65、71、78、85 與 94 天) 之間區分精確度。計算 Wilk's Lambda 值以評估多胎性對不同懷孕天數山羊生乳中 PAG 濃度的整體顯著性；當 Wilk's Lambda 值顯著小於 1 時，可以認定為多胎性對不同懷孕天數山羊生乳中 PAG 濃度有顯著影響。

結 果

I. 以 ROC curve 分析阿爾拜因母羊乳中 PAG 不同閾值及懷孕天數判定多胞胎懷孕羊

本試驗收集 348 頭懷孕阿爾拜因山羊之乳樣，原預計自人工受精後 10 日始收集以檢測早期懷孕，惟未能分辨懷孕與否，因此改在第一個高峰點 (33 天) 開始採樣。乳中 PAG 濃度分成懷孕早期 (33 – 43 日)、懷孕中期 (49 – 78 天) 及懷孕末期 (85 – 94 天) 進行分析。為了能在懷孕早期即有效確認阿爾拜因山羊的懷孕頭數，以利飼養人員根據懷孕頭數進行對應之飼養管理。以 ROC curve 在懷孕不同天數下以乳中 PAG 不同濃度閾值判定多胞胎懷孕羊的敏感性、特異性及 AUC 值如表 1，其中敏感性為真陽性率，1- 特異性則代表假陽性率，AUC 值則介於 0 至 1，值越大代表所使用的 PAG 濃度閾值進行判定的準確度越高。本試驗懷孕阿爾拜因山羊分娩頭

數 1、2 及 3 頭以上的分別佔 21、71 及 8%。在 ROC curve 分析中，AUC 大於 0.9 即代表此判定準確度高，本試驗進一步以 Youden index 作為最佳切點之判定指標，Youden index 計算時是以敏感性與特異性百分比之和減 1，其值範圍介於 -1 至 1，越接近 1 代表預測模型敏感性及特異性高，反之越接近 0 則表示預測模型預測能力低，結果顯示懷孕第 33、43 及 49 天 Youden index 分別為 0.677、0.806、0.806，懷孕第 57、65、71、78、85 及 94 天，Youden index 之值皆為 1，顯示使用乳中 PAG 篩選懷有多胞胎的母羊最佳之時間亦在懷孕第 49 至 57 天。

表 1. 以接收者操作特徵曲線分析阿爾拜因山羊羊乳中懷孕相關醣蛋白不同濃度閾值及懷孕天數下，判定多胞胎懷孕羊的敏感性、特異性及曲線下面積

Table 1. Result of ROC curve analysis [Se, Sp and AUC] of milk pregnancy-associated glycoprotein (PAG) ELISA assessment for determination of multiple (> 2) fetuses based on different threshold values of PAG concentration at different days of gestation in Alpine goats

Days of pregnancy	PAG threshold values (S-N value)*	Se (%)	Sp (%)	AUC and P value	95% Confidence interval	
					Lower bound	Upper bound
33	0.300	100.0	67.7	0.720 (P = 0.006)	0.563	0.878
43	0.446	100.0	80.6	0.828 (P < 0.001)	0.696	0.960
49	1.208	100.0	80.6	0.903 (P < 0.001)	0.785	1.000
57	2.643	100.0	100.0	1.000 (P < 0.001)	1.000	1.000
65	3.326	100.0	100.0	1.000 (P < 0.001)	1.000	1.000
71	3.421	100.0	100.0	1.000 (P < 0.001)	1.000	1.000
78	3.756	100.0	100.0	1.000 (P < 0.001)	1.000	1.000
85	2.126	100.0	100.0	1.000 (P < 0.001)	1.000	1.000
94	3.146	100.0	100.0	1.000 (P < 0.001)	1.000	1.000

* S-N value : Sample-negative value

Se: Sensitivity

Sp: Specificity

AUC: Area under curve

II. CDA 分析阿爾拜因母羊乳中 PAG 不同閾值及懷孕天數區分多胞胎及單雙胞胎懷孕羊

為評估多胎性或單雙胞胎對不同懷孕天數阿爾拜因山羊乳中 PAG 濃度組間效應，進一步以 CDA 進行乳中 PAG 不同濃度閾值及懷孕天數進行多胞胎與單雙胞胎懷孕羊的判定，評估兩者組間差異是否有顯著的差異。CDA 分析是以 Wilk's Lambda value 進行判定，其值範圍介於 0 至 1，越接近 0 代表組間影響越大，反之越接近 1，則組間影響越小。CDA 分析結果如表 2，結果顯示自懷孕天數 49 天開始，Wilk's Lambda value 為 0.786，代表懷有多胞胎與單雙胞胎母羊之生乳中 PAG 濃度具有顯著差異 (P < 0.01)；而當懷孕天數達 57 天，Wilk's Lambda value 為 0.104，表示懷有多胞胎與單雙胞胎母羊之乳中 PAG 濃度具有極顯著差異 (P < 0.001)，顯示懷孕 49 至 57 天皆可有效地利用乳中 PAG 濃度區分多胞胎及單雙胞胎懷孕羊。

討 論

當母體懷孕時，會出現免疫耐受 (immune tolerance)，即母體的免疫系統會辨別胎兒及胎盤中的抗原，避免產生過度的免疫反應 (Bainbridge, 2000; Abu-Raya *et al.*, 2020)。目前反芻動物約有 100 多種 PAG，主要都由胎盤所分泌 (Xie *et al.*, 1997)。在 Wooding *et al.* (2005) 的研究中顯示，PAG 分布在單核滋養層細胞 (mononucleate trophoblast cells) 頂端微絨毛表面分布及雙核滋養層細胞。因此，PAG 在懷孕時扮演著重要的角色，其可調節母體的免疫屏障及維持免疫平衡 (Wooding *et al.*, 2005)。而當母體懷有多胞胎時，因胎兒與胎盤數量增加之緣故，母體所經歷的免疫挑戰可能更大 (Dotters-Katz *et al.*, 2015)。

母羊早期懷孕診斷可針對飼養管理及產乳量等問題給予照護，尤其以多胞胎懷孕羊更需要精準的飼養管理。懷有多胞胎的羊若無法攝取充足的能量達到代謝需求，羊隻體內會開始進行體脂肪分解，多胞胎懷孕羊血液中非酯化脂肪酸 (non-esterified fatty acid, NEFA) 與 β - 羥基丁酸 (β -hydroxybutyrate, BHBA) 濃度在分娩前 5 週顯著高於單胞胎懷孕羊，分別為單胞胎懷孕羊的 2.1 與 3.7 倍 (Moallem *et al.*, 2012)。過量的 NEFA 與 BHBA 會於肝臟中代謝成酮

表 2. 判別函數分析以酵素結合免疫吸附分析法測量阿爾拜因山羊乳中懷孕相關糖蛋白不同濃度閾值及懷孕天數進行多胞胎與單及雙胞胎懷孕羊之判定結果

Table 2. Canonical discriminant analysis results for discrimination of single or twin fetuses from multiple (> 2) fetuses with milk pregnancy-associated glycoprotein (PAG) enzyme-linked immunosorbent assay assessment at different days of pregnancy in Alpine goats

Canonical discriminant function coefficients	Days of pregnancy									
	33	43	49	57	65	71	78	85	94	
Wilks' Lamda value	0.993	0.996	0.786**	0.104***	0.179***	0.255***	0.317***	0.278***	0.068***	
Unstandardized coefficients	4.110	2.276	2.369	4.213	2.689	2.198	1.826	3.469	4.802	
Group centroids	-0.025	-0.020	-0.157	-0.885	-0.647	-0.515	-0.443	-0.486	-1.115	
Eigenvalue	0.253	0.208	1.627	9.150	6.684	5.324	4.581	5.022	11.526	
% of variance	0.007	0.004	0.272	8.608	4.594	2.915	2.158	2.593	13.659	
Canonical correlations	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	0.081	0.067	0.463	0.947	0.906	0.863	0.827	0.850	0.965	

** indicates a significant difference (P < 0.01).

*** indicates a highly significant difference (P < 0.001).

體，增加懷孕羊妊娠毒血症的發生率 (Ji *et al.*, 2023)。PAG 為不活化的天門冬胺酸家族成員之一，已經有許多研究指出其可做為反芻動物早期懷孕診斷的指標，甚至是胎兒數目的預測 (Hussein *et al.*, 2017)。因此，若能透過測定乳中 PAG 濃度在懷孕時的濃度變化，儘早區分胎兒數目，有助於在懷孕早期改善多胞胎懷孕羊的營養狀態，減少酮症與妊娠毒血症等疾病的發生。

本試驗利用 ROC curve 分析生乳中 PAG 不同濃度的閾值及懷孕天數下判定多胞胎懷孕羊的敏感性、特異性及曲線下面積。結果顯示懷孕 33 及 43 天的敏感性皆為 100%，但特異性僅為 67.7 及 80.6%，AUC 分別為 0.720 及 0.828，此結果顯示懷孕 33 及 43 天篩選多胞胎懷孕羊的準確度不足，可能會誤判定單雙胞胎懷孕羊為多胞胎懷孕羊。懷孕 49 天生乳中 PAG 濃度閾值為 1.208 時，敏感性 100%、特異性 80.65% 且 AUC 為 0.903；而懷孕至 57 天時 PAG 濃度閾值為 2.643，敏感性與特異性皆為 100% 且 AUC 為 1。上述結果顯示懷孕至 57 天時可高度準確地篩選出多胞胎懷孕羊。在楊等 (2022) 的研究中顯示，多胞胎懷孕羊的乳中 PAG 濃度會在懷孕 49 天時開始顯著高於單雙胞胎的濃度直到懷孕 94 天。而在本試驗中，懷孕 49 天時對於乳中 PAG 濃度的判定已具有一定程度的準確度 (80.65%)，與楊等 (2022) 實驗結果相符。另外，相似的結果在 Singh *et al.* (2019a) 研究中顯示，當懷孕天數超過 45 天且血中 PAG 閾值為 0.830 時，其敏感性 88.9%、特異性 70.4% 且 AUC 為 0.897，表示此閾值對於區別單雙胞胎為合適的。在本試驗中的乳中 PAG 閾值 1.208 雖高於 Singh *et al.* (2019a) 的數值 0.830，但推測可能因 Singh *et al.* 所計算之閾值為血中 PAG 濃度且為區分單胞胎與雙胞胎懷孕羊。此外，Singh *et al.* (2019a) 的研究所測定的目標物種為印度巴巴里山羊，與本試驗的阿爾拜因山羊不同。研究指出，懷孕 60 天時 Lacaune 乳羊的 PAG 濃度約高於 Sarda 乳羊 60%。因此推論山羊品種可能也是影響 PAG 濃度的因素之一 (De Carolis *et al.*, 2020)。另外，本試驗為測定生乳中 PAG 濃度，其閾值 1.208 是用於區分單雙胞胎與多胞胎懷孕羊。此外，部分研究表明，血中的 PAG 濃度約為乳中之 1.9 – 2.0 倍 (Singh *et al.*, 2019b)，換算血中閾值 0.830 為乳中閾值約 0.415，該數值與楊等 (2022) 研究顯示懷孕 49 天時單雙胞胎乳中 PAG 濃度相似，因此推測胎數可能是主要 PAG 濃度閾值較高的原因。值得注意的是，Singh *et al.* (2019a) 用於區分胎兒數量的時間點為懷孕 45 天之後，亦與楊等 (2022) 指出懷孕中期之 PAG 濃度會與懷孕頭數有關，因此可作為本試驗之判定時間點 (懷孕 49 至 57 天) 之佐證。

本試驗利用 COA 測定不同懷孕天數乳中 PAG 濃度，進行單雙胞胎與多胞胎的判定。由結果可知，懷孕 49 天時 Wilk's Lambda value 為 0.786，表示單雙胞胎懷孕羊與多胞胎懷孕羊的乳中 PAG 濃度具有顯著差異 ($P < 0.01$)。當懷孕 57 天時 Wilk's Lambda value 為 0.104，此時則代表單雙胞胎懷孕羊與多胞胎懷孕羊的乳中 PAG 濃度具有極顯著差異 ($P < 0.001$)，表示乳中 PAG 濃度在懷孕 49 – 57 天即可開始區別胎兒數量，本試驗亦應用 Youden index 判定最佳檢測時間切點亦在懷孕第 49 – 57 之間。另有其他表明，懷孕 45 天時血清中 PAG 濃度在不同懷孕胎數上具有顯著差異，其濃度分別是三胞胎懷孕羊為 58.23 ± 2.64 、雙胞胎懷孕羊為 48.55 ± 2.86 及單胞胎懷孕羊為 34.77 ± 1.53 ng/mL，即懷孕 45 天時可利用 PAG 濃度區分胎兒數量 (Hussein *et al.*, 2017)。同樣地，在其他研究中具有相似的結果，懷孕 49 天時多胞胎懷孕羊的乳中 PAG 濃度顯著高於單雙胞胎懷孕羊，然而，單胞胎與雙胞胎懷孕羊乳中 PAG 濃度在 49 天無顯著差異 (楊等, 2022)，推測可能與單雙胞胎懷孕羊之能量需求差異甚小所致。在 Hussein *et al.* (2017) 的研究中使用血清測定懷孕羊 PAG 濃度，而在楊等 (2022) 則是使用懷孕羊的乳樣進行測定。兩篇文獻測定的目標物雖不同，但血液與乳中 PAG 濃度兩者具有高度正相關 ($\beta_1 = 0.6918$ 且 $R^2 = 0.64$) (Singh *et al.* 2019a)，且兩者在懷孕 32 天之後測定懷孕之準確度皆可達 92 及 89%；同時，根據上述兩篇文獻可知應用血中與乳中 PAG 濃度判定胎數的時間點相當接近，故使用生乳 PAG 濃度應可在懷孕 49 – 57 天判定是否為多胞胎懷孕。

結 論

由本試驗結果可知，當懷孕 49 天時已可藉乳中 PAG 濃度篩選多胞胎懷孕羊，且當懷孕 57 天時可藉乳中 PAG 濃度區別單雙胞胎與多胞胎懷孕羊。因此，懷孕 49 至 57 天時為使用乳中 PAG 篩選及判定懷孕阿爾拜因山羊懷孕頭數之最理想時間點。此結果將可提供羊農盡早得知羊隻的懷孕胎數，並給予精準的飼養管理，期望改善母羊代謝性疾病的發生。

致 謝

本研究承農業部之研究經費【111 農科 – 2.1.2 – 畜 – L1(4)】，由社團法人中華民國乳業協會檢驗組同仁鄭楹諶與張勝保先生、北區分所牛乳檢驗室羅瑩與宋春蓮小姐提供試驗方面之協助，使試驗得以順利完成，特此誌謝。

參考文獻

- 楊明桂、蘇展樑、林宗毅、涂柏安。2022。阿爾拜因山羊生乳中懷孕相關糖蛋白濃度與分娩頭數之關係。畜產研究 55 : 213-220。
- Abu-Raya, B., C. Michalski, M. Sadarangani, and P. M. Lavoie. 2020. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front. Immunol.* 11: 575197.
- Bainbridge, D. R. J. 2000. Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. *Rev. Reprod.* 5: 67-74.
- De Carolis, M., O. Barbato, G. Acuti, M. Tralbalza-Marinucci, N. Melo 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.
- Diñç, D. A., İ. Taşal, H. Erdem, A. Semacan, and S. Aral. 1994. Koyunlarda transabdominal ultrasonografi ile yavru sayımı. *Vet. Bil. Derg.* 10: 81-83.
- Dotters-Katz, S. K., E. Patel, C. A. Grotegut, and R. P. Heine. 2015. Acute infectious morbidity in multiple gestation. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2015: 1-6.
- El-Sayed, O., M. M. M. Kandiel, K. Gh. M. Mahmoud, M. E. A. Abou-El-Roos, and S. Ibrahim. 2022. Changes in alpha-fetoprotein, phosphorus, calcium, and metabolic hormones in goats had singleton, twin, and triplet pregnancy. *Egypt. J. Vet. Sci.* 53: 15-23
- Gajewski, Z., N. Melo de Sousa, J.-F. Beckers, B. Pawlinski, M. Olszewska, R. Thun, and M. Kleczkowski. 2008. Concentration of bovine pregnancy associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows. *J. Physiol. Pharmacol.* 59: 55-64.
- Han, R. X., H. R. Kim, Y. F. Diao, M. G. Lee, and Di. Jin. 2012. Detection of early pregnancy-specific proteins in Holstein milk. *J. Proteomics.* 75: 3221-3229.
- Hussein, M., E. Wael, A. Deghedy, A. El-Desouky, and A. Ramoun. 2017. Serum concentration of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) as a predictor for embryonic/fetal losses and fetal numbers in cross-bred ewes. *J. Life Sci.* 14: 106-111.
- Ji, X., N. Liu, Y. Wang, K. Ding, S. Huang, and C. Zhang. 2023. Pregnancy toxemia in ewes: A review of molecular metabolic mechanisms and management strategies. *Metabolites* 13: 149.
- Moallem, U., A. Rozov, E. Gootwine, and H. Honig. 2012. Plasma concentrations of key metabolites and insulin in late-pregnant ewes carrying 1 to 5 fetuses. *J. Anim. Sci.* 90: 318-324.
- Mongini, A. and R. J. Van Saun. 2023. Pregnancy toxemia in sheep and goats. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 39: 275-291.
- SAS. 2014. SAS user guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC., USA.
- Shanin, M., M. Friedrich, M. Gauly, J. F. Beckers, and W. Holtz. 2013. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera. 113: 141-144.
- Sharma, N., S. P. Singh, and A. Bharadwaj. 2020. Changes in milk and plasma progesterone and pregnancy-associated glycoprotein and their relationships with the foetal number during early pregnancy in Jakhra goats. *Indian J. Anim. Res.* 90: 1589-1593.
- Singh, S. P., N. Ramachandran, N. Sharma, A. K. Goela, K. Gururajb, and S. D. Kharchea. 2019a. 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., R. Natesan, N. Sharma, A. K. Goel, M. K. Singh, and S. D. Kharche. 2019b. Pregnancy-associated glycoprotein profile in milk and its relationship with the circulating level during early pregnancy in goats. *Small Rumin. Res.* 173: 81-87.
- 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.
- Xie, S., J. Green, J. B. Bixby, B. Szafranska, J. C. DeMartini, S. Hecht, and R. M. Roberts. 1997. The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 12809-12816.

Early detection of multifetal pregnancies in Alpine goats using pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentrations in milk ⁽¹⁾

Yueh-Tung Chen ⁽²⁾ Ming-Kuew Yang ⁽²⁾ Jia-Sian Shiu ⁽³⁾ Yi-Hsin Yeh ⁽²⁾
Yi-Hsuan Chen ⁽²⁾ and Po-An Tu ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: Apr. 1, 2024; Accepted: May 24, 2024

Abstract

Being able to confirm the number of fetuses in Alpine goats during early pregnancy will be beneficial for breeders to conduct appropriate feeding management based on the number of fetuses. Therefore, the purpose of this experiment was to determine the feasibility of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in milk to predict multiple pregnancies in goats. 348 milk samples from Alpines goats with 33, 43, 49, 57, 65, 71, 78, 85, and 94 days of pregnancy for PAG concentration analysis. The proportion of Alpines goats with litter sizes of 1, 2, and 3 or more heads were 21, 71, and 8%, respectively. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to assess the area under the curve (AUC) of different thresholds of PAG concentration in milk at different days of pregnancy for multiple fetuses. The results showed that at day 49 and days 57 of pregnancy, the milk PAG threshold of 1.208 and 2.643 were used to determine pregnant goats with multiple fetuses, which area under the curve (AUC) were 0.903 and 1 respectively. Further analysis using Canonical Discriminant Analysis (CDA) on different thresholds of milk PAG concentration and days of pregnancy for discriminating between goats with multiple and single/twin fetuses were adopted to assess any significant difference between the two. The results showed that starting from day 49, Wilk's Lambda value was 0.786, indicating significant difference in PAG concentration of milk from goats with multiple fetuses and single/twin fetus ($P < 0.01$). When the days of pregnancy reached 57 days, Wilk's Lambda value was 0.104, indicating highly significant difference in PAG concentration of milk from goats with multiple fetuses and single/twin fetus ($P < 0.001$). Therefore, milk PAG concentration could effectively differentiate between multiple and single/twin pregnancy from day 49 to 57 of pregnancy. In conclusion, days 49 to 57 of pregnancy are the ideal time for milk PAG concentration to detect and determine multifetal pregnancy in pregnant Alpine goats.

Key words: Alpine goats, Pregnancy-associated glycoprotein, Number of fetuses.

(1) Contribution No. 2792 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Northern Region Branch, MOA-TLRI, Miaoli 36843, Taiwan, R. O. C.

(3) Southern Region Branch, MOA-TLRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

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