

NEKE MOGUĆNOSTI DIJAGNOSTIKE GRAVIDNOSTI I NAŠA ISKUSTVA S BIOPSIJOM SLUZNICE VAGINE U OVACA

Z. Makek

Uvod

Pravovremeno otkrivanje gravidnosti u ovaca veoma je važno zbog provođenja razmnožavanja u uzgojima, te radi odvajanja plodnih od jalovih životinja, planiranja prihvata mladunčadi i primjene adekvatne njege i ishrane.

S druge strane dijagnostika gravidnosti pokazuje se kao važan činilac u sistemu mjera za suzbijanje steriliteta. Osim naprijed navedenih razloga otkrivanje gravidnosti smanjuje na minimum mogućnosti klanja gravidnih životinja. Od dijagnostike graviditeta u ovaca očekuje se sigurnost dijagnoze, što ranije otkrivanje graviditeta, mali utrošak vremena za pretragu, što manje pomoćnika, te da nije opasna za ljude i životinje. Uglavnom mora biti jednostavna lako izvodljiva i jeftina.

Pregled literature

Metode dijagnostike gravidnosti u ovaca prema dosadašnjim istraživanjima možemo svrstati u kliničke, fizikalne i laboratorijske.

Od kliničkih metoda najčešća je palpacija ploda preko trbušne stijenke ovce. Oklješa (1957), Drača i Bešlin (1972), Richardson (1972), Herak (1976), Küst i Schaetz (1983) te Miljković (1986) navode da je pomoću ove metode moguće utvrditi graviditet u ovce od 100. do 120. dana gravidnosti.

Kao jednostavnu i laganu metodu Varenika (1952) opisuje digitalnu palpaciju per vaginom kaudalnih uterinih arterija. Oklješa (1957) te Herak (1976) navode da je u gravidnih ovaca arterija punija i rigidnija, valovita toka, jako pulzira i lako se pronalazi. U negravidnih životinja arterija je debljine šivaće igle, slabo ispunjena, malo pokretljiva i slabo pulzira. Digitalna palpacija primjenjuje se od polovine drugog mjeseca gravidnosti. Miljković (1986) spominje da se ovom metodom može utvrditi graviditet u ovaca jedan do dva mjeseca poslije pripusta, a točnost dijagnoze na 60-ti dan graviditeta iznosi 62%, a pri dobroj uvježbanosti i 90%.

Rektoabdominalnu palpaciju pomoću štapa dužine 50 cm, a debljine 1,5 cm opisali su (Hulet 1972; Rommel i Rummer, 1980; Küst i Schaetz, 1983; Scheibe i sur. 1986). Štap se oprezno ugura u rektum ovce koja leži na leđima, 20 do 30 cm ispred zdjeličnog ulaza i uperi prema trbušnoj stijenci. Ako je štap opipljiv preko trbušne stijenke ovca nije gravidna, a ako je u pitanju graviditet maternica sprečava podizanje štapa do trbušne stijenke, pa je teško ili uopće nije opipljiv. Hulet (1972) utvrđuje gravidnost već 43. dan poslije pripusta, a od 65. do 70. dana gravidnosti dijagnoza je stopostotna, a s time se slažu i Rommel i Rummer (1980),

Dr. Zdenko Makek, docent, Veterinarskih fakultet u Zagrebu.

te Küst i Schaetz (1983). Scheibe i sur. (1986) utvrdili su istom metodom graviditet u 79,3% ovaca između 50. i 90. dana. Miljković (1986) opisuje pregled pomoću štapa na ovci koja stoji. Ukoliko se ova metoda dobro uvježba i pravilno primjeni nema opasnosti po graviditet koji se otkriva sa sigurnošću od 97%.

Pretraga ultrazvukom ubraja se u fizikalne metode utvrđivanja gravidnosti. Prvu pretragu ultrazvukom u ovaca izveo je Lindhal (1966) i ustanovio s točnošću od 90 do 95% graviditet od 60. dana u ovce. U novije vrijeme primjenjuju se dva načina dijagnostike gravidnosti ultrazvukom i to preko kože i preko rektuma. Rommel i Rummer (1980) smatraju da je općenito na 80-ti dan graviditeta točnost dijagnoze gravidnosti pomoću ultrazvuka 90 do 100%. Küst i Schaetz (1983) iznose podatke da je točnost dijagnoze ultrazvučnom pretragom preko kože 60-ti do 70-ti dan graviditeta 99%. Scheibe i sur. (1986) navode da je ultrazvučnim ehosonderom točnost dijagnoze između 50. i 90. dana graviditeta 89,3%, a kod pretrage preko kože 60. do 70. dana gestacije 99%. Miljković (1986) tvrdi da je pretragom preko kože dijagnoza ultrazvukom točna do 60% za gravidnost između 40. i 80. dana, a poslije 80. dana sigurnost dijagnoze iznosi 90%. Kod rektalne pretrage (ehografija) između 35. i 55. dana gravidnosti dijagnoza graviditeta točna je 97%. Međutim moguće su pogreške u pozitivnom i negativnom smislu. Herak (1989) navodi da se na ekranu može uočiti kucanje srca i šupljina plodnih mjehura već potkraj prvog mjeseca gravidnosti.

Rendgenografijom može se utvrditi kostur fetusa ili pojedine kosti, koje su osificirale kao i broj fetusa. Kralj (1952) rendgenografski postavlja dijagnozu graviditeta u ovce s 62. dana od pripusta. Wintzer (1976) navodi točnost dijagnoze s 90. dana graviditeta, a Küst i Schaetz (1983) napominju da se kod nestriženih ovaca može rendgenografski postaviti dijagnozu graviditeta 65-ti dan gestacije, a kod ostriženih već 55-ti dan graviditeta, ali također smatraju da rendgenografskom pretragom treba pregledavati samo kod medicinske opravdanosti, jer rutinske pretrage s obzirom na zračenje nisu bezopasne za plod.

Određivanje nivoa progesterona u krvnom serumu ovce služi kao jedno od laboratorijskih metoda za utvrđivanje gravidnosti. Rommel i Rummer (1980) smatraju da se radioimunološkim testom (RIA) može postići točnost dijagnoze gravidnosti u ovce s 80 do 95%, ali mišljenja su da je prva vrijednost dijagnoze ipak 60 do 70%. Küst i Schaetz (1983) navode da je u negravidnih ovaca nivo progesterona u krvnom serumu najviši između 10. i 14. dana i iznosi 3 do 4 ng/ml, a onda 15. do 16. dana opada na 0,1 ng/ml. Međutim kod gravidnih ovaca poraste još za 0,5 ng/ml 17. do 20. dana od pripusta. Točnost dijagnoze u negravidnih ovaca je stopostotna, a u gravidnih iznosi 78 do 80%. Također su primijetili da kod blizanaca i više plodova vrijednost progesterona raste tako da kod gravidne ovce s tri ploda 100-ti dan graviditeta iznosi 6 i 9 ng/ml. Miljković (1986) navodi da je RIA test pouzdan 82 do 84% u prvom mjesecu gravidnosti.

Jedna od laboratorijskih metoda dokazivanja gravidnosti u ovaca je i biopsija sluznice vagine. Radev i sur. (1960) utvrdili su da se sigurna dijagnoza gravidnosti biopsijom vaginalne sluznice u ovaca može postaviti

od kraja prvog mjeseca gravidnosti pa sve do 15. do 20. dana prije poroda. Richardson (1972) pomoću ove metode utvrđuje gravidnost u ovaca već od 40. dana gestacije sa sigurnošću od 89%, a nakon 80. dana gravidnosti 100%.

S obzirom na podatke iz literature postavili smo si zadatak da ispitamo efikasnost biopsije vaginalne sluznice u dijagnostici graviditeta u ovaca.

Materijal i metode

Biopsiju vaginalne sluznice izvodili smo na autohtonim pasminama ovaca koje su bile u dobi od 2 do 5 godina. U ispitivanju bilo je ukupno 108 ovaca. Ovce i ovnovi bili su zajedno u stadu tako da nismo imali evidenciju pripusta svake pojedine ovce nego samo evidenciju poroda. Zbog toga smo odrediti dan gravidnosti na dan biopsije ovaca na taj način da smo od trajanja graviditeta (150) dana oduzeli interval od našeg pregleda do janjenja. Ovce su bile gravidne od 3 do 150 dana. U našem radu primjenili smo 2 načina biopsiranja.

1. Biopsiranja sluznice vagine pomoću savijenih škara Radev i sur. (1960). Metoda je primjenjena na 71 ovci. Kirurškom pincetom uhvatili smo sluznicu vagine na lijevoj ili desnoj stijenci 3 do 4 cm iznad vanjskog otvora uretre. Tako fiksiranu sluznicu odrezali smo savijenim škarama. Odsječci sluznice bili su veličine 1 x 0,5 cm i odmah poslije uzimanja stavljeni su u označenu epruvetu s 10% formalina.

2. Biopsija sluznice vagine pomoću instrumenta model po Done i Herdu za biopsiju sluznice vagine u krmača (Richardson 1972). Metoda je primjenjena u 37 ovaca. Kod ovce koja je stajala uvukli smo sterilni instrument za biopsiju u vaginu po dorzalnoj stijenci dok nismo osjetili cerviks. Oštricu za rezanje čvrsto smo pritislili uz sluznicu vagine, unutrašnju šipku instrumenta rotirali smo dok djelić sluznice nije upao u udubljenje, a zatim smo okrenuli instrument za 180° i odrezali komadić sluznice (najmanje 4 x 1 mm). Biopsijom dobiveni dio sluznice stavili smo u 10% formalin.

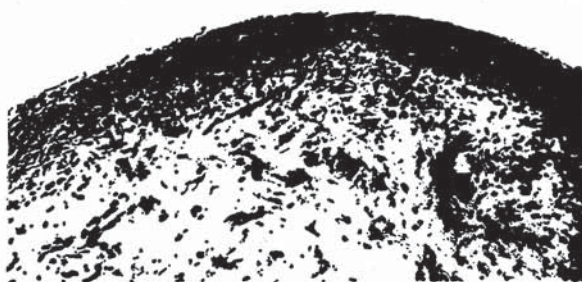
Prilikom prvog i drugog načina uzimanja biopsata nije bilo krvarenja, vaginalna sluznica zacijelila je bez znakova vaginitisa, a također nije bilo zabilježeno uginuće ploda ili pobačaj.

Histološka obrada: Uzorak biopsirane sluznice vagine fiksirali smo u 10% formalinu najmanje 12 sati. Poslije toga biopsat smo pažljivo izvadili iz formalina i isprali u vodovodnoj vodi tijekom 1 do 3 minute i zamrznuli uz pomoć CO₂. Uzorak smo rezali na mikrotomu sa stolićem za smrzavanje, a rezovi su bili debljine 5 μ . Tako pripravljen uzorak stavljali smo u 75% alkohola kroz 10 minuta. Iz alkohola uzorak smo uronili u hemalaun u trajanju 5 minuta, pa onda u vodovodnu vodu 10 minuta. Poslije toga komadići su stavljeni u 1% eozin 1 do 5 sekundi pa su opet isprani vodovodnom vodom kroz 10 minuta. Tako isprani uzorci stavljeni su u 75,96 i 100% alkohol za redom po 5 minuta u svakoj naprijed navedenoj koncentraciji alkohola. Na ovaj način pripremljeni uzorak stavljali smo na predmetno stakalce, fiksirali Canada balzomom i pokrili pokrovnicom. Preparati su bili ocjenjeni mikroskopski kod povećanja 250 puta.

Rezultati istraživanja i diskusija

Histološka slika sluznice vagine u gravidne ovce

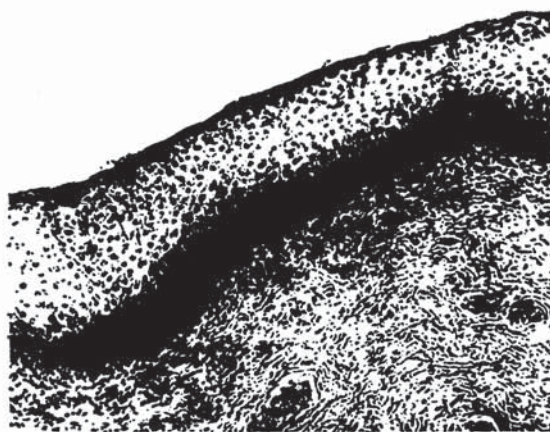
Epitel je višeslojan. Pažnju treba obratiti na površini epitelni sloj koji se sastoji od kockastih i prizmatičnih stanica sa svijetlom protoplazmom, kuglastim i svijetlim jezgrama u kojima je kromatinska struktura jasno izražena. Dublje epitelne slojeve čine poligonalne stanice s kuglastim i svijetlim jezgrama u kojima je kromatinska struktura jasnije izražena. U epitelnim slojevima i u propriji ima obično mnogo leukocita. (slika 1.)



Slika 1.

Histološka slika sluznice vagine u negravidne ovce

Epitel je višeslojan. Pažnju treba obratiti na površinu sloja koji se sastoji od plosnatih stanica sa stisnutim i jako obojenim jezgrama u kojima se ne vidi kromatinska struktura. Dublji epitelni slojevi uglavnom se sastoje od poligonalnih stanica s kuglastim i svijetlim jezgrama u kojima je kromatinska struktura jasno izražena. Leukocitarnih elemenata (limfociti i segmentirani neutralni granulociti) ima malo a nalaze se u dubljim slojevima propije. (slika 2.)



Slika 2.

U našem radu istražili smo metodu biopsije sluznice vagine iz vestibuluma koje navode Radev i sur. (1960). Biopsirali smo 71 ovcu i dobili slijedeće rezultate: od 67 do 130 dana poslije pripusta utvrdili smo gravidnost u 80,9% ovaca. U 4 ovce iz tog razdoblja koje su bile gravidne 85, 97, 107, i 124 dana nismo mogli postaviti točnu histološku dijagnozu. Najraniju dijagnozu gravidnosti postavili smo 20-ti dan graviditeta, a najkasnije 134-ti dan. U negravidnih ovaca utvrdili smo točnu dijagnozu u 100% slučajeva. Richardson (1972) biopsirao je sluznicu vagine u području oko cerviksa u 45 ovaca. Uzorke sluznice uzimao je svakog tjedna od siječnja do travnja, a od svibnja na dalje svaka 2 tjedna. Navodi da se pomoću ove metode gravidnosti može utvrditi od 40. dana trudnoće 89%, a nakon 80. dana gravidnosti u 100%. slučajeva.

Ispitali smo istu metodu u 37 ovaca s tom razlikom da je izvedena samo jedna biopsija. Od 23 gravidne ovce koje smo biopsirali od 71. do 121. dana gravidnosti u 10 (82,6%) ovaca histološki smo utvrdili graviditet, a u 4 ovce, koje su bile gravidne 89, 94, 103. i 105. dana postavili smo dijagnozu vjerojatne gravidnosti. U svih 14 negravidnih ovaca histološki smo postavili stopostotno točnu dijagnozu.

U ovaca koje su bile histološki sumnjive na graviditet i u onih negravidnih ponovili smo biopsiju nakon 29. dana. Pomoću histološke pretrage ustanovili smo da su one vjerojatno gravidne iz prve pretrage doista gravidne, a kod onih negravidnih potvrđena je ista dijagnoza.

Prvom i drugom metodom dobili smo gotovo iste rezultate. Metodom po Radevu i sur. 80,9% točnosti dijagnoze za ovce gravidne između 67. i 130. dana, a metodom po Richardsonu 82,6% točnih dijagnoza za ovce gravidne od 78. do 121. dan.

Prije gore navedenih razdoblja nakon pripusta to jest između 1. i 66. dana po pripustu rezultati s obzirom na gravidnost mnogo su slabiji. Tako smo metodom po Radevu i sur. utvrdili gravidnost u tom razdoblju samo u 3 ovce i to 20., 45. i 55. dana graviditeta od ukupno pregledanih 15 gravidnih ovaca.

Još slabije rezultate imali smo nakon 134. dana po pripustu, tako da od 12 gravidnih životinja između 136. i 150. dana niti u jedne nismo histološki utvrdili graviditet, što se ne slaže s navodima Radeva i sur. (1960.) koji tvrde da se dijagnoza gravidnosti biopsijom sluznice vagine u ovaca može postaviti već od kraja prvog mjeseca gravidnosti pa sve do 15. do 20. dana prije poroda. Küst i Schaetz (1983) također spominju mogućnost dijagnoze gravidnosti biopsijom sluznice vagine od 30. do 130. dana poslije pripusta s točnošću od 95%, a Miljković (1986) smatra da je to metoda pouzdana u prosjeku od 80% što se slaže i s našim istraživanjima.

Zaključci

1. Metodom biopsije vaginalne sluznice može se dobiti točna dijagnoza s obzirom na gravidnost ako ovce biopsiramo između 66. i 134. dana nakon pripusta ili osjemenjivanja. Prije ili poslije toga intervala rezultati su slabi ili uopće nije moguće utvrditi graviditet, jer je u tim intervalima histološki nalaz sličan kod gravidnih i negravidnih ovaca.

2. U praksi bi biopsiju vaginalne sluznice trebali izvoditi u stadima u kojima se vodi evidencija pripusta i ovce su označene, te u stadima u kojima smo sinkronizirali ili inducirali estrus. U takvim stadima mogli bi uzimati materijal za pregled između 60. do 130. dana.

3. U stadima u kojima se ne vodi evidencija pripusta trebali bi jedan mjesec po završetku sezone pripusta izvršiti prvu a za daljnjih mjesec dana drugu biopsiju sluznice vagine, kod ovaca koje prvom pretragom nismo našli gravidnom. Ako sezona pripusta nije bila dulja od 60. dana ovakvim načinom bi praktički mogli postaviti točnu dijagnozu u svih ovaca s dvije pretrage.

LITERATURA

1. Drača, P., R. Bešlin (1963): Dijagnosticiranje graviditeta u ovaca, sa posebnim osvrtom na sadržaj mamarnih kompleksa, palpaciju abdomena. *Acta Veterinaria* 13 (2) 21—25.
2. Herak, M. (1976): Veterinarski priručnik. Treće izdanje 179—180. Poslovno udruženje Veterinarskih stanica Zagreb.
3. Herak, M. (1989): Veterinarski priručnik. Četvrto izdanje 213 Jumeana Zagreb.
4. Hulet, C. V. (1972): A rectal-abdominal palpation technique for diagnosing pregnancy in the ewe. *J. Anim. Sci* 35, 814—819.
5. Kralj, J. (1952): Rentgenska dijagnostika gravidnost kod ovce. *Veterinaria* 1 (3—4) 240—254.
6. Küst, D., F. Schaetz (1983): Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren. Veb Gustav Fischer Verlag Jena.
7. Lindahl, I. (1966): Detection of pregnancy in sheep by means of ultrasound. *Nature* 212, 642—643.
8. Miljković, V. (1986): Reprodukcijska i veštačko osemenjivanje ovaca i koza. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd.
9. Oklješa, B. (1957): Porodiljstvo domaćih životinja. Poljoprivredno nakladni zavod, Zagreb.
10. Radev, G., A. Todorov, D. Danov (1960): Histovaginale Methode zur Bestimmung der Trächtigkeit bei Schafen. *Zuchthygiene, Fortpflanzungsstörungen und Besamung der Haustiere*, 4, 149—161.
11. Richardson, C. (1972): Diagnosis of pregnancy in the ewe by vaginal biopsy. *Br. vet J.* 128, 316—330.
12. Richardson, C. (1972): Pregnancy diagnosis in the ewe: A Review *Vet Rec.* 90 (10) 264—275.
13. Rommel, W., H. J. Rummer (1980): Zur Trächtigkeitsfeststellung beim Schaf. *Mh. Vet. Med.* 35. 428—432.
14. Scheibe, K. M., Gabriele Emeling, Lisa Marshall (1986): Vergleichende Untersuchung zur Trächtigkeitsdiagnose beim Schaf. *Mh. Vet. Med.* 41 158—164.
15. Varenika, N. (1952): Prilog kliničkoj dijagnozi ovaca i koza. *Acta veterinaria* 2, 3—12.
16. Wintzer, H. J. (1964): Zum Trächtignachweis beim Schwein und Schaf mit Hilfe der Rötgenuntersuchung. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 71. 153—156.

NEKE MOGUĆNOSTI DIJAGNOSTIKE GRAVIDNOSTI I NAŠA ISKUSTVA S BIOPSIJOM SLUZNICE VAGINE U OVACA

Sažetak

Pravovremeno otkrivanje gravidnosti u ovaca veoma je važno zbog provođenja tehnologije na farmi, a radi odvajanja plodnih od jalovih životinja, planiranje prihvata mladunčadi i primjene adekvatne njege i ishrane. S druge strane dijagnostika gravidnosti pokazuje se kao važan činilac u sistemu mjera za suzbijanje steriliteta.

Biopsija vaginalne sluznice izvedena je na ukupno 108 ovaca i to pomoću škara ili instrumenata za biopsiju. Biopsirani dijelovi sluznice fiksirani su u 10% formalinu najmanje 12 sati, a zatim izrezani na mikrotomu, te obojeni hemalaunom i eozinom. Preparati su mikroskopski pregledani pod povećanjem od 250 puta.

Histološkom pretragom 108 uzoraka biopsirane sluznice vagine utvrđena je najranija gravidnost od 20. dana, a najkasnija s 134. dana graviditeta.

SOME POSSIBILITIES OF PREGNANCY DIAGNOSIS AND OUR EXPERIENCES WITH VAGINAL MUCOSA BIOPSY BY SHEEP

Summary

The timely pregnancy detection in sheep is very important in order to carry out the technology on the farm, to separate fertile and barren animals, to plan the acceptance of youngsters and the application of proper care and nutrition. On the other side, the diagnosis of pregnancy is an important factor in the system of sterility eradication measures.

The vaginal mucosa biopsy has been carried out on 108 sheep in total, and that by means of scissors or biopsy instruments. The parts subjected to biopsy have been fixed in 10% formalin for at least 12 hours, then microtom cut and haemalum and eosin dyed. The preparations were subjected to 250 time magnified microscopic test.

By the hystolic test of 108 samples of biopsed vaginal mucosa the earliest pregnancy of 20 days and the latest of 134 days has been found.