

젖소의 번식장애 및 비임신진단을 위한 Milk Progesterone 측정 EIA-kit의 이용에 관한 연구

鄭炳鉉 · 李炳翰 · 姜英善 · 金眞榮 · 南亨英 · 李康烈 · 黃允植* · 楊光憲* · 鄭吉生

건국대학교 축산대학 · 두산기술원*

(1994년 10월 27일 접수)

Studies on use of milk progesterone EIA-kit for diagnosis of reproductive disorders and non-pregnancy in dairy cows

Byung-hyun Chung, Byeong-han Lee, Young-sun Kang, Jin-young Kim, Hyoung-young
Nam, Kang-yeol Lee, Yoon-sik Hwang*, Kwang-hun Yang*, Kil-saeng Chung

*College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University
Doosan Technical Center**

(Received Oct 27, 1994)

Abstract : This study was carried out to investigate the effect, range of practice, and propriety for diagnosis of early non-pregnancies and reproductive disorders by dairy cows' milk progesterone analysis used EIA-kit of home products.

The results were summarized as follows :

1. During 2 to 6 months after artificial insemination, the results of milk progesterone measurement by Home-kit and Auto ELISA reader-kit with pregnant dairy cows(152 heads) certified by rectal palpation were revealed, in Home-kit, 145 heads(95.4%) of positive reaction, 7 heads(4.6%) of quasi-positive, and 0 heads(0%) of negative among 152 heads and, in Auto ELISA reader-kit, 152 heads(100%) of positive reaction among 152 heads.

2. During 19 to 22 days after artificial insemination, the results of milk progesterone measurement by Home-kit, and thereafter during 50 to 90 days after that, the results of pregnant test by rectal palpation were summarized as follows : 147 heads(82.1%) among 179 heads of positive reaction by Home-kit and 5 heads(31.3%) among 16 heads of quasi-positive were revealed pregnant cows by rectal palpation, and 42 heads(100%) among 42 heads of negative were non-pregnant.

3. During 19 to 22 days after artificial insemination, the results of milk progesterone measurement by Auto ELISA reader-kit, and thereafter during 50 to 90 days after that, the results of pregnant test by rectal palpation were summarized as follows : 146 heads(86.9%) among 168 heads of positive reaction by Auto ELISA reader-kit and 6 heads(28.6%) among 21 heads of quasi-positive were revealed pregnant cows by rectal palpation, and 48 heads

* 본 논문은 1993년도 건국대학교 동물자원연구센터 자체연구비에 의해 연구되었음.

Address reprint requests to Dr Byung-hyun Chung, Department of Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University, 93-1, Mojin-Dong, Kwangjin-Gu, Seoul 133-701, Republic of Korea.

(100%) among 48 heads of negative were non-pregnant.

4. For the accuracy of the rectal palpation, Home-kit and Auto ELISA reader-kit were used in the cows of ovarian diseases. The results were following : in the cows of reproductive disorders expected negative milk progesterone, the accuracies of rectal palpation were the same 75.5%(40 heads among 53 heads) by Home-kit and Auto ELISA reader-kit, and in the cows of reproductive disorders expected positive milk progesterone, the accuracies of rectal palpation were 82.6%(19 heads among 23 heads) and 91.3%(21 heads among 23 heads) by Home-kit and Auto ELISA reader-kit, respectively, and the general accuracies of rectal palpation were 77.6%(59 heads among 76 heads) and 80.3%(61 heads among 76 heads) by Home-kit and Auto ELISA reader-kit, respectively.

Key words : milk progesterone, EIA, pregnancy, reproductive disorders, dairy cows

서 론

우리나라는 짧은 낙농의 역사를 가지고 있으며 여러 가지 악조건임에도 불구하고 낙농기술은 괄목할만한 발전을 이룩하였다. 품종개량의 역사 역시 짧고 조직적이고 체계적인 개량이라고는 할 수 없으나 종모우의 수입 혹은 정액의 수입에 의한 인공수정의 보급으로, 한국축산연감(1989-1990)에 의하면 점정우의 경우 비유능력이 7,000kg에 육박하고 있다. 그러나 이러한 개량의 개가는 점차적으로 좁은 면적에서 다두 사육화하는 우리나라의 낙농업의 형태에서 사양조건과 사양관리 및 질병관리가 잘 이루어지지 않고 있기 때문에 현재까지 힘겹게 개량된 젖소의 잠재적 능력을 최대한으로 이용하지 못하고 있음은 물론 낙농기술의 향상에 대한 낙농가의 의욕이 저하함에 따라 개체관리를 등한시하게 되고, 다두사육에 의한 운동부족, 사양기술 및 사양조건의 과분한 개량 등에 의해 젖소의 경제적 수명을 단축시키고 있다.

정¹은 국내에서 사육되고 있는 유우의 번식간격의 연장이 대부분 번식장애에 의해 발생된다고 하였으며 정²과 김 등³은 난소의 기능이상에 의해 발생하는 번식장애는 전체 번식장애발생우의 각각 45.6%, 37.8%, 34.1%로 보고하였다. 그래서 정상적인 번식을 유도하기 위하여 여러 연구자들이 여러분야에 걸쳐 많은 연구를 수행하고 있으나 번식장애의 요인이 워낙 광범위하기 때문에 그 해결방법도 단순하지 않다. 여러 연구중에서 우리나라의 현실에 적용이 가능한 방법으로 젖소의 이용효율을 향상시킬 수 있는 분야 중의 하나인 우유의 progesterone을 측정하여 조기비임진단 및 번식장애의 진단법에 관한 연구는 많은 연구자들에 의해 상당한 수준에까지 와 있다.

Yollow와 Berson은 이미 1950년에 plasma insulin을 측정하는 radioimmunoassay(RIA)를 발명하여 생명과

학 분야, 특히 내분비학에 관한 연구에 일대 개혁을 일으켰지만⁴, 그 후 RIA는 방사성 동위원소를 이용함으로써 여러가지 문제점을 발생시켰다. 그러한 것을 보완하기 위하여 개발된, 효소를 이용한 비방사성 면역분석법인 enzyme immunoassay(EIA)를 1977년 Schuurs and Weekman⁵이 개발하고 이어 Arnstadt 과 Cleere⁶, 와 Stanly et al⁷ 등이 우유 및 혈액에서 progesterone을 측정할 수 있는 방법을 체계화함으로써 이 분야의 연구에 큰 개가를 올리게 되었다. 최근에는 화학발광체를 이용한 chemiluminescence immunoassay(CIA)가 Pazzagli et al⁸와 Barnard et al⁹에 의하여 개발되었고 국내에서는 강 등¹⁰과 이 등¹¹에 의해 임상에서의 응용을 시도하고 있다.

그러나 이러한 방법 모두를 산업화시키기에는 어려운 점이 많지만 그중 EIA는 민감도나 재현도 및 기자재의 가격 등이 유리한 조건이므로 이에 대한 표준화에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 여러 연구자들에 의해 progesterone에 대한 단클론항체를 생산하였고^{12,13}, 이를 이용하여 progesterone의 정량을 위한 면역분석법의 개발이 활발히 진행되어 현재는 우유나 혈청을 이용한 progesterone 정량분석법을 kit화하여 시판되고 있다. 제품으로는 Immuchem progesterone kit(Divison of ICN Biomedicals, INC East Universty Drive, Carson, CA, USA)를 비롯한 Hormonost[®] progesterone(Biolab GmbH, West-Germany)과 Progesterone EIA-Kit(帝國藥器製藥株式會社, 日本) 등이 있으나 고가이고 측정방법의 난이도가 높아서 고도의 숙련이 필요하므로 우리나라에서는 사용이 제한되고 있는 실정이다.

EIA에 의한 우유 및 혈청내 progesterone을 측정하여 Laing 과 Heap¹⁴, Penington et al¹⁵, Heap et al¹⁶, Hoffman et al¹⁷, Dopson과 Fitzpatrick¹⁸, Thun et al¹⁹ 등은 임신조기진단에 관한 연구를 수행하여 소의 성주기 19-23일에 비임신우를 색출할 수 있는 EIA-Kit를

실용화하였고, Laing과 Heap¹⁴, Hoffman et al¹⁷, Dobson과 Fitzpatrick¹⁸, Dawson²⁰, Ott et al²¹, Seguin²², Ball과 Jackson²³, Foote et al²⁴, Kassa et al²⁵, Nebel²⁶은 직장검사에 의한 난소의 기능을 측정하기에는 진단의 한계가 있다는 점을 중시하고 직장검사에 의한 진단과 도살후의 육안적 진단의 비교, 직장검사자의 검사능력에 관한 문제, 직장검사에 의한 난포낭종과 황체낭종의 감별진단의 어려움 등을 해결하기 위해 우유 또는 혈액 중의 progesterone 농도를 측정, 번식장애의 정확한 진단과 처방을 위하여 연구하였다.

국내에서는 EIA를 이용하여 progesterone 농도를 측정, 조기임신진단에 관한 연구보고로서 이 등¹¹, 김 등²⁷, 정과 김²⁸, 김 등²⁹ 등에 의해 그 효과를 입증하였으나 이들은 대부분 앞에서 언급한 외국제품의 EIA-kit들을 실험에 이용하였다.

이와 같이 많은 연구자들에 의해 연구된 ELISA가 가축에 있어서 번식효율을 증진시키는데 효과적으로 이용될 수 있음을 확인하였고, 직장검사에 의한 난소의 기능을 측정하기에는 진단의 한계가 있다는 점을 고려하여 이미 김 등³⁰에 의해 progesterone에 대한 특이성이 좋은 단클론항체의 생산이 성공되었고 이 항체의 *in-vivo* 대량생산 방법 및 우유속에 progesterone 측정을 위한 ELISA를 개발하여 상품화 체계가 완료된 milk progesterone kit를 소의 조기임신진단과 난소질환의 임상적 응용에 적용하기 위하여 야외실험을 통한 그 효능을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 1992년 5월부터 1993년 9월까지 경기도 일원의 건국우유의 집유농가와 충청남도 태안군 안면읍 소재 두산유업 목장의 Holstein 성우 중, 이기간동안 발정이 유발되어 인공수정된 젖소 237두와 무발정 및 이상발정우 76두를 대상으로 시험하였다.

Sample채취

임신확인우에 대한 sample채취 및 EIA-kit 효능검정 : 경기도 일원의 개인목장에서 인공수정후 2-6개월인 젖소에 대하여 직장검사로 임신이 확인된 유우에서 아래와 같은 방법으로 sample을 채취하여 EIA-kit로 효능을 검정하였다.

조기 비임신(임신)진단을 위한 Sample채취 : 우유 채취는 인공수정 후 19-22일에 저녁착유 때 임상적 및 문진에 의해 발정유무를 확인하고 유두에서 처음 2-3회의 우유를 짜버린후 potassium dichromate가 첨가

된 15ml의 멸균 cap tube에 채취하여 분석하기전까지 4℃에서 보관하였다.

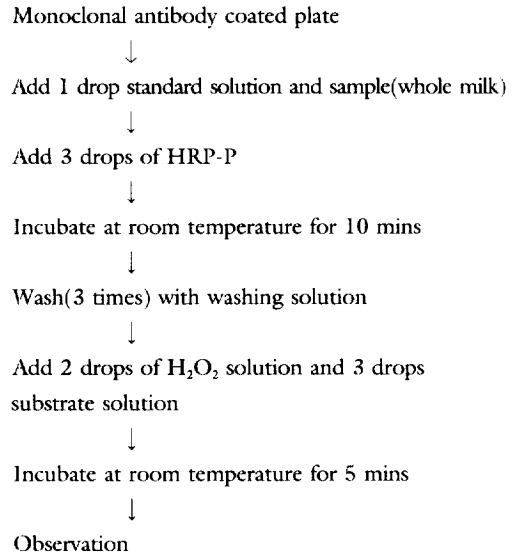


Fig 1. Milk progesterone semi-determination by Home-kit.

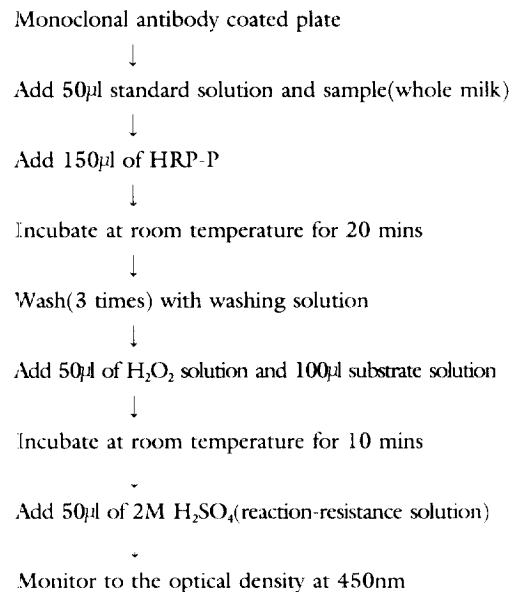


Fig 2. Milk progesterone determination by Auto ELISA reader-kit.

난소이상의 진단을 위한 Sample채취 : 건국대학교 축산대학 부속 동물병원으로 의뢰된 외래환축과 두산 유업목장에서 발생된 번식장애우중 직장검사에 의해 4가지의 난소질환(난소휴지, 난포낭종, 성숙난포, 황체 존재)으로 명확한 진단이 가능한 개체를 직장검사 직후 상기와 같은 방법으로 sample을 채취하였다.

Milk progesterone 측정 : Milk progesterone(MP) 농도 측정은 김과 홍³¹에 의해 개발되어 두산 기술원에서 제조한 progesterone EIA-kit 를 사용하여 MP를 판능에 의해서 판독하는 방법인 Home-kit와 Auto ELISA reader(SLT LAB 제품 : Model No. 301)-kit를 이용하여 판독하는 방법을 병행 실험하였으며 그 방법은 Fig 1과 Fig 2와 같다.

Standard 작성 : Home-kit의 경우에 있어서는 표준 용액이 progesterone 2ng/ml이므로 표준용액보다 색이 같거나 짙은 청색인 경우 음성, 표준용액보다 색이 옅은 청색일 경우 의양성, 거의 무색일 경우는 양성으로 판정하며 Auto ELISA의 경우에 있어서는 표준용액이 progesterone 4ng/ml(표준용액A)과 10ng/ml(표준용액B)이므로 표준용액A 보다 흡광도가 같거나 높을 경우 음성, 표준용액A 보다 작고B 보다 클 경우 의양성, 표준용액B 보다 같거나 낮을 경우는 양성으로 판정하였다.

직장검사에 의한 난소질환의 진단 : 직장검사에 의한

난소질환의 진단은 Arthur et al³², Morrow et al³³, Garcia와 Edgvist³⁴이 제시한 기준에 근거하여, 난소내의 구조물의 탄력성과 구조를 주관적으로 판단하고 progesterone 분비량을 예측하여 Table 1과 같이 분류 진단하였다.

임신헌인을 위한 직장검사 : 조기 비임신(임신)진단 시험의 정확도를 확인하기 위하여 임신감정은 인공수정 후 50-90일에 직장검사에 의해 실시하였으며, 직장검사에 의해 임신으로 판정된 임신우에 대해서는 다시 재검사를 하기 위하여 직장검사 직후 앞에서 언급한 방법에 의해 Sample을 채취하여 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit로 검사를 실시하였다.

결 과

임신헌인우에 대한 EIA-kit 효능검정 : 인공수정후 2-6개월에 직장검사에 의해 임신을 확인한 152두를 Home-Kit 및 Auto ELISA reader-kit에 의한 측정법으로 확인한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. Auto ELISA reader-kit에 의한 측정법에서는 직장검사에 의해 확진된 임신우 152두 전체가 MP 양성반응으로 나타났다. 그러나 Home-kit의 측정 결과에서 직장검사에 의한 임신확인우 152두 중 145두에서 MP 양성으로

Table 1. Differential diagnosis of ovarian function based on rectal palpation in dairy cows

Diagnosis based on rectal palpation	Prediction of milk progesterone concentration	Standard of differential diagnosis
Dysfunction ^a	<2 [*]	no palpable structure
Follicle ^a	<2	≤2.5 cm in diameter
Follicular cyst ^a	<2	thin wall and fluctuant
Corpus luteum ^b	≥2	>10 mm in diameter

* ng/ml ^a Absence of functional luteal tissue in the ovary ^b Presence of functional luteal tissue in the ovary

Table 2. The accuracy test of Home-kit and Auto ELISA reader-kit to pregnant dairy cows determined by rectal palpation

Kit		Accuracy			Total
		Positive	Negative	Quasi-positive	
HK ^a	Heads(%)	145(95.4)	0(0)	7(4.6)	152(100)
AK ^b	Heads(%)	152(100)	0(0)	0(0)	152(100)

^a Home-kit ^b Auto ELISA reader-kit

판정되었으나 4.6%에 해당하는 7두는 의양성으로 판정되었다.

조기 비임신 및 임신진단

Home-kit 측정 : 조기 비임신 및 임신진단시험에 공시된 정상발정우 237두를 대상으로 Home-kit로 측정 한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 임신으로 예측되는 kit 양성반응우는 179두로 전체의 75.5%이었으나 그 중 수정후 50-90일에서 직장검사에 의해 임신으로 확인된 유우는 147두로 82.1%로 나타났다. 여기서 양성반응임에도 불임으로 확인된 것은 32두(17.9%)로 나타났다. 또한 인공수정후 19-22일에 EIA-kit 검사에 의해 불임으로 예측한 음성우에서는 42두중 42두(100%) 전체가 직장검사에 의해 불임으로 판정되었다. 그리고 의양성우로 판명된 16두는 전체의 6.8%로서 EIA-kit 검사로는 임신 유무를 판단할 수 없었으며 수정후 50-90일에 직장검사에 의한 임신감정에서 5두(31.3%)가 임신으로 판정되었다.

Auto ELISA reader-kit에 의한 측정 : Auto ELISA reader-kit에 의한 측정결과는 Table 4에서 보는 바

와 같이 MP 양성우가 168두로 Home-kit로 측정 한 결과보다 11두가 적었으며, 그 중 직장검사에 의한 임신우는 146두로 임신예상두수의 86.9%가 임신으로 나타났다, 비임신으로 예측되었던 48두 모두가 비임신으로 판정되었다. 의양성 역시 21두로 그 중 6두가 임신이었고 15두가 불임으로 나타났다.

EIA-kit에 의한 난소질환 진단 : 직장검사에 의해 MP 측정 음성으로 예측한 번식장애우 53두(난소기능정지우 27두, 난소내 난포존재우 20두 및 난포낭종우 6두)와 MP 측정 양성으로 예측한 황체존재우 23두로 총 76두를 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit에 의해 검정한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같이, Home-kit 측정에서는 76두중 59두로 77.6%의 적중율을 나타냈으며, Auto ELISA reader-kit에 의한 측정에서는 76두중 61두가 직장검사에 의한 MP 예측이 적중되어 적중율은 80.3%로 나타났다. 그리고 MP 예측 음성우에서는 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit 측정에서 일치된 결과인 53두중 40두로 75.5%의 적중율을 나타내었다. 그러나 MP 예측 양성우에서는 Home-kit의 적중율

Table 3. Comparison of pregnancy diagnosis by Home-kit and rectal palpation

	Home-kit ^a	Rectal palpation ^b	
		Pregnancy	Non-pregnancy
Positive	Heads(%) 179(75.5)	147(82.1)	32(17.9)
Negative	Heads(%) 42(17.7)	0(0)	42(100)
Quasi-positive	Heads(%) 16(6.8)	5(31.3)	11(68.7)
Total	Heads(%) 237(100)	152	85

^a 19-22 days after artificial insemination

^b 50-90 days after artificial insemination

Table 4. Comparison of pregnancy diagnosis by Auto ELISA reader-kit and rectal palpation

	Auto ELISA reader-kit ^a	Rectal palpation ^b	
		Pregnancy	Non-pregnancy
Positive	Heads(%) 168(70.9)	146(86.9)	22(13.1)
Negative	Heads(%) 48(20.3)	0(0)	48(100)
Quasi-positive	Heads(%) 21(8.8)	6(28.6)	15(71.4)
Total	Heads(%) 237(100)	152	85

^a 19-22 days after artificial insemination

^b 50-90 days after artificial insemination

Table 5. The accuracy test of Home-kit and Auto ELISA reader-kit to ovarian diagnosis classified by rectal palpation

Ovarian diagnosis by rectal palpation			Accuracy	
			HK ^a	AK ^b
Dysfuction	Heads(%)	27(35.5)	21(77.7)	22(82.5)
Follicle	Heads(%)	20(26.3)	16(80.0)	15(75.0)
Follicular cyst	Heads(%)	6(7.9)	3(50.0)	3(50.0)
Subtotal	Heads(%)	53(69.7)	40(75.5)	40(75.5)
Corpus luteum	Heads(%)	23(30.2)	19(82.6)	21(91.3)
Total	Heads(%)	76(100.0)	59(77.6)	61(80.3)

^a Home-kit

^b Auto ELISA reader-kit

은 82.6%, Auto ELISA reader-kit에 의한 번식장애 진단 적중율은 91.3%이었다.

고 찰

임신후인우에 대한 EIA-kit 효능검정 : 인공수정후 2-6개월에 직장검사에 의해 임신을 확인한 152두를 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit로 측정하였을 때, Auto ELISA reader-kit에 의한 측정법에서는 직장검사에 의해 확진된 임신우 152두 전체가 MP 양성반응으로 나타나 본 EIA-kit의 정확도가 100%임을 확인하였다. 그러나 Home-kit의 측정 결과에서 직장검사에 의한 임신확인우 152두 중 145두에서 MP 양성으로 판정되었으나 7두는 의양성으로 판정되었다. 이러한 4.6%의 오차는 Home-kit의 결과판정에서 주관적인 판독에 의한 실수가 가장 큰 원인으로 생각된다. 절소에서 임신 50일 이상이면 직장검사에 의해서도 확실한 임신 유무를 판정할 수 있고, 일단 임신이 되면 황체에서 분비되는 progesterone에 의해 임신이 유지되므로 본 실험에서 임신이 확인된 개체는 100%가 progesterone 양성임을 Auto ELISA reader-kit에 의해 기 증명된 사실이므로 이를 이용하여 본 EIA-kit의 효능을 확인한 바 그 효능이 확실한 것으로 판명되었다.

조기 비임신 및 임신진단

Home-kit 측정 : 조기 비임신 및 임신진단시험에 공시된 정상발정우 237두를 대상으로 Home-kit로 측정

한 결과, 임신으로 예측되는 양성반응우는 179두(75.5%)이었으나 그 중 수정후 50-90일에서 직장검사에 의해 임신으로 확인된 유우는 147두(82.1%)로 나타났다. 여기서 양성반응임에도 불구하고 불임으로 확인된 32두(17.9%)는 영구황체이었거나 임신후 조기유산으로 직장검사에 의한 임신감정시 불임으로 진단된 것으로 생각된다. 또한 인공수정후 19-22일에 EIA-kit 검사에 의해 불임으로 예측한 음성우에서는 42두중 42두(100%) 전체가 재발정이었거나 그후 번식장애 및 직장검사에서 불임으로 판정되었다. 그리고 의양성우로 판명된 16두(6.8%)는 EIA-kit 검사로는 임신 유무를 판단할 수 없었다. 이렇게 정상임신임에도 불구하고 MP의 농도가 현저히 낮은 것은 Heap et al¹⁶과 Pope et al¹⁵이 보고한 sample의 채취방법과 시간의 차이, 계절적 요인과 영양수준, steroid hormone의 불활성화 능력(간기능) 등에 의한 것으로 보고한 점을 고려 한다면, 본 실험에서 의양성 중 직장검사에 의해 임신으로 확진된 5두는 sample의 채취방법 및 검사과정에서의 실수, 혹은 계절적인 요인(혹서기) 및 그 개체의 영양수준의 이상에 의해 MP 농도가 낮았던 것이 원인으로 생각된다. 또한 의양성 판정우중 불임으로 판정된 11두(68.7%)는 간기능의 저하로 혈중 MP의 불활성화 능력이 낮아 황체기 혹은 비록 저수준으로 분비되는 progesterone이라 할지라도 체내에서 불활성화가 지연되어 MP 농도가 다소 높았던 것으로 생각된다.

Auto ELISA reader-kit에 의한 측정 : Auto ELISA reader-kit에 의한 측정결과는 Home-kit로 측정하

결과보다 다소 정확도가 높게 나타나 MP 양성우가 168두로 Home-kit 보다 11두가 적었으며 그 중 직장검사에 의한 임신우는 146두로 임신예상두수의 86.9%가 임신으로 나타났고, 비임신으로 예측되었던 48두 모두가 비임신으로 판정되어 Home-kit의 결과와 일치되었다. 의양성 역시 21두로 그 중 6두(28.6%)가 임신이었고 15두(71.4%)가 불임으로 나타났다.

이러한 실험결과로 볼때 본 kit는 임신을 확인할 수 있는 확률은 80% 이상의 효능이 있는 것으로 판단되며 100% 확진을 할수 없는 이유는 Home-kit 나 Auto ELISA reader-kit의 이상이나 조작의 실수보다는 실험대상동물의 번식장애 유형에 따라 달라지는 것으로 판단된다. 즉 동물의 성주기 중 발정기에는 progesterone이 분비되지 않지만 일단 임신을 하거나 비임신이라 할지라도 황체의 퇴행장이나 steroid hormone의 불활성화를 저해하는 조건하에서는 항상 progesterone 양성반응이 나타나기 때문이다. 그러나 발정후 차기발정예정일 전에 난포가 성숙되고 있는 시기에는 대체로 극소량의 progesterone이 난소 이외의 다른 기관에서 분비되므로 본 EIA-kit는 progesterone 음성반응이 나타난다. 그러므로 본 EIA-kit로 progesterone 음성반응이 나타나는 것은 100% 불임으로 판정할 수 있으며 본 실험에서도 이와 일치되는 결과를 얻었다.

Auto ELISA reader-kit 및 Home-kit 실험에서 각각 양성, 음성 및 의양성이 일치되지 않은 결과는 Home-kit 측정방법은 주관적인 판독인 반면에 Auto ELISA reader-kit에 의한 측정정은 객관적인 판독이므로 그에 따른 오차인 것으로 사료된다.

EIA-kit에 의한 난소질환 진단 : 이미 확인된 EIA-kit의 효능을 인정하고 이를 이용하여 난소질환을 분류 진단할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 직장검사에 의해 난소질환을 명확하게 구분할 수 있는 개체만 선발하여 MP 예측 음성 및 양성으로 분류하였다. 이것을 다시 MP 음성(총 53두)에 해당하는 난소 기능정지(27두), 난소내 난포존재(20두) 및 난포낭종(6두)으로 분류하였고, progesterone양성(총 23두)에 해당하는 난소질환인 황체존재(황체낭종 및 영구황체)의 4가지 질환으로 구분하여 직장검사에 의해 진단된 결과를 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit로 측정한 검정결과, Home-kit 측정에서는 76두중 59두(77.6%), Auto ELISA reader-kit에 의한 측정에서는 76두중 61두(80.3%)가 직장검사에 의한 MP 예측이 적중되었다. 이러한 결과는 Ott et al²¹이 난소내에 단지 기능적 황체가 난소내에 존재하는 기준을 1.0ng/ml(serum progesterone) 미만일때 기능적 황체가 없는 난소와 있는

난소의 직장검사의 정확도는 63%와 82%, Mortimer et al³⁶은 1.5ng/ml(serum progesterone) 미만을 기준하여 67%와 85%, Watson과 Munro³⁷은 3ng/ml(milk progesterone) 이하를 기준으로하여 67%와 85%, Boyd와 Munro³⁸는 2.2ng/ml(plasma progesterone) 미만을 기준하였을때 75%와 79%로 보고하였는데, 본 실험에서는 비록 serum은 아니지만 이들 연구보고를 참고한다면 MP 예측 음성우에서는 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit 측정에서 비슷한 결과인 53두중 40두(75.5%)로 나타났다. 그러나 MP 예측 양성우에서, Home-kit의 진단적중율은 82.6%, Auto ELISA reader-kit에 의한 적중율은 91.3%인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 상기 연구자들 보다 높은 적중율을 나타낸 것으로, 이것은 공시동물을 선정하는데 있어서 직장검사로 병명이 확실히 인정되는 개체만 본 실험에 이용하였기 때문이라고 생각한다. 임상이나 진단할 때에는 더욱 낮은 진단적중율을 나타낼 것으로 사료된다. 또한 MP 양성으로 예측한 번식장애우에서 Home-kit는 82.6%, Auto ELISA reader-kit가 91.3%의 적중율을 나타낸 것은 Home-kit의 관능검사에 의한 주관적인 판단이기 때문인 것으로 생각되어 번식장애우의 진단에는 객관성이 있는 Auto ELISA reader-kit를 이용하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합적으로 고찰해 볼 때 Home-kit와 Auto ELISA reader-kit는 실험방법의 차이로 Home-kit는 술자의 관능에 의한 판별이므로 Auto ELISA reader-kit 보다 정확도가 다소 떨어지나 그 효능은 양자가 모두 우수한 것으로 확인되었다. 그러나 우리나라에서 일시 수입 보급되었던 EIA-kit는 가격이 고가이기 때문에 산업적으로 이용하기에는 어려운 점이 많았으나 국내에서 개발, 대량생산 단계에 있는 본 EIA-kit를 상품화 한다면 가격이 저렴하고 실험이 간편하므로 산업적 이용에 많이 기대된다. 따라서 그 응용에 있어서 Home-kit는 기자재가 필요없으므로 낙농가가 직접 비임신진단에 활용할 수 있을 것으로 생각되며, Auto ELISA reader-kit는 야외의 임상수의사가 비임신진단은 물론 번식장애의 정확한 진단과 치료에 응용한다면 우리나라의 낙농업에서 생산성 향상에 가장 큰 문제점으로 지적되고 있는 번식간격의 연장 및 번식장애우의 해결에 획기적인 개가를 올릴 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 가축의 조기비임신 및 번식장애우의 milk

progesterone 분석에 의한 진단을 목적으로 국내에서 개발, 제품화 단계에 있는 EIA-kit를 야외실험을 통하여 그 효능과 안정성을 확인하고 야외에서의 응용범위와 타당성에 관한 연구를 하기 위하여 수행한 바, 그 결과는 다음과 같다.

1. 인공수정 후 2-6개월에 직장검사에 의해 임신이 확인된 152두의 유우를 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit에 의한 측정법으로 각각 확인한 결과, Home-kit에서는 양성인 145두(95.4%), 음성인 7두(4.6%), 그리고 음성은 0두(0%)로 나타났으며 Auto ELISA reader-kit에서는 모두가 양성으로 나타났다.

2. 인공수정 후 19-22일에 Home-kit에 의한 milk progesterone을 측정하고 인공수정 후 50-90일에 직장검사로 임신 확인한 결과 Home-kit 양성에서 179두 중 147두(82.1%), 음성에서 16두 중 5두(31.3%)가 임신하였고, 음성에서는 42두 중 42두(100%)로 모두 불임으로 나타났다.

3. 인공수정 후 19-22일에 Auto ELISA reader-kit로 milk progesterone을 측정하고 수정 후 50-90일에 직장검사로 확인한 결과 Auto ELISA reader-kit 양성에서 168두 중 146두(86.9%), 음성에서 21두 중 6두(28.6%)가 임신하였고, 음성에서는 48두 중 48두(100%)가 불임으로 나타났다.

4. 직장검사에 의해 milk progesterone 농도를 예측하여 난소질병을 병류별로 분류하여 그 정확도를 확인한 결과 milk progesterone 예측 음성인 번식장애우에서는 Home-kit 및 Auto ELISA reader-kit에서 각각 정확도가 53두 중 40두(75.5%)로 일치되었고, milk progesterone 예측 양성인 번식장애우에서는 Home-kit가 23두 중 19두(82.6%), Auto ELISA reader-kit에서는 23두 중 21두(91.3%)의 적중율을 나타내었으며 전체의 평균 적중율은 Home-kit에서 76두 중 59두(77.6%), Auto ELISA reader-kit에서 76두 중 61두(80.3%)이었다.

참 고 문 헌

1. 정병현. 유우의 번식장애 발생율과 번식장애우의 질내세균총에 관한 조사 연구. 대한수의사회지 1985; 21: 740-747.
2. 정병현. Prostaglandin F_{2a}, GTH 및 antibiotics의 투여가 repeat breeder치료에 미치는 영향. 가축번식학회지 1985; 9: 66-71.
3. 김선환, 최경문, 박희규. 유우의 번식장애 제1보

- 유우의 번식장애에 관한 조사연구. 한국축산학회지 1973; 15: 219-223.
4. Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. In: Work TS, Work E, eds. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. North-Holland publishing Co, 1978.
5. Schuurs AHM, Weekman BKV. Enzymeimmunoassay. *Clin Chem Acta* 1977; 81: 1-40.
6. Arnstadt KI, Cleere WF. Enzyme immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *J Reprod Fert* 1981; 62: 173-180.
7. Stanley CJ, Johnson A, Self CH. Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays. *J Immunol Meth* 1985; 83: 89-95.
8. Pazzagli M, Kim JB, Messeri G, et al. Serio luminescent immunoassay(LIA) for progesterone in heterogenous system. *Clin Chem Acta* 1981; 115: 287-296.
9. Barnard GJR, Kim JB, Brockelbank JL, et al. Recent advances in chemiluminescence immunoassay. In: *Bioluminescence and chemiluminescence: Instruments and Application*, Vol. 1, Knox V.D(ed), CRC Press, 1985; 151-183.
10. 강원준, 고대환, 이경광 등. Progesterone 측정을 위한 면역분석법의 최적 조건에 관한 연구. 한국가축번식학회지 1985; 9: 105-112.
11. 이경찬, 정태영, 정길생 등. RIA 및 EIA에 의한 혈장과 우유내 Progesterone 측정. 한국가축번식학회지 1990; 14(1): 57-65.
12. Fantl VE, Wang DY, Whitehead AS. Production and characterization of a monoclonal antibody to progesterone. *J Steroid Biochem* 1981; 14: 1682-1690.
13. White KL, Linder GM, Anderson GB, et al. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* 1983; 19: 701-705.
14. Laing JA, Heap RB. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br Vet J* 1971; 127: 19.
15. Pennington JA, Spahr SL, Lodge JR. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk. *J Dairy Sci* 1976; 59: 1528-

- 1531.
16. Heap RB, Holdsworth RJ, Godsby JE, et al. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *Br Vet J* 1976; 132: 445-464.
 17. Hoffman B, Günzler O, Hamburger R, et al. Milk progesterone as a parameter fertility control in cattle : Methodological approaches and present status of application in Germany. *Br Vet J* 1976; 132: 469-474.
 18. Dobson H, Fitzpatrick RJ. Clinical applications of the progesterone-in-milk test. *Br Vet J* 1976; 132: 538-542.
 19. Thun R, Eggenberger E, Zerobin K, et al. Praktische erfahrungen mit dem milch progesteron-test(MPT) zur brunst- und non-return -diagnose beim rind. *Zuchthyg* 1980; 15: 7-14.
 20. Dawson FLM. Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of ovarian function in the cow. *Vet Rec* 1975; 96: 218.
 21. Ott RS, Bretzlaff KN, Hixon JE. Comparison of Palpable corpora lutea with serum progesterone concentration in cows. *JAVMA* 1986; 188: 1417-1419.
 22. Seguin BE. Ovarian cysts in dairy cows. In: Morrow DA, ed. *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia:WB Saunders Co, 1980; 199-204.
 23. Ball PJH, Jackson NW. The fertility of dairy cows inseminated on the base of milk progesterone measurements. *Br Vet J* 1979; 135: 537.
 24. Foote RH, Oltenucu EAB, Kummerfeld HL, et al. Milk progesterone as a diagnostic aid. *Br Vet J* 1979; 135: 550-558.
 25. Kassa T, Ahlin KA, Larsson K. Profiles of progesterone in milk and clinical ovarian findings in postpartum cows with ovarian dysfunctions. *Nord Veterimermed* 1986; 38: 360.
 26. Nebel RL. On farm milk progesterone tests. *J Dairy Sci* 1988; 71: 1682-1690.
 27. 김한근, 김민규, 신현주 등. 유우의 혈청내 progesterone 농도의 간이측정에 의한 임신진단에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 1989; 13(3): 157-163.
 28. 정영채, 김창근. 소의 다두분만에 관한 연구. II. 유우의 Hormone 분석법에 의한 소의 조기임신진단에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 1980; 22: 7-15.
 29. 김민규, 신현주, 이명현 등. Progesterone EIA-Kit에 의한 유우의 임신진단에 관한 연구. *대한수의학회지* 1990; 30(1): 35-40.
 30. 김정우, 김종배, 정길생 등. Progesterone 단일클론항체의 수동면역이 mouse 수정란의 착상저해에 미치는 효과. *한국가축번식학회지* 1990; 14(3): 157-164.
 31. 김정우, 홍승욱. 단일클론항체를 이용한 milk progesterone test(EIA) 측정법의 개발과 이에 의한 소의 발정 및 임신조기진단의 정확도 향상에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 1990; 14(3): 165-173.
 32. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. Infertility in the cow. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 6th ed. Baillière Tindall, 1989; 356-383.
 33. Morrow DA, Settergren I, Kaltenbach CC, et al. In: Morrow DA, ed. *Current therapy in theriogenology*. WB Saunders Co, 1980; 157-204.
 34. Garcia M, Edgvist LE. Progesterone determinations and clinical examinations of reproductive organs in purebred and crossbred female zebu cattle. *Theriogenology* 1990; 33: 1091.
 35. Pope GS, Ball PJH, Leaver JD. Use of progesterone concentration in plasma and milk on the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br Vet J* 1976; 132: 497-506.
 36. Mortimer RG, Olson JD, Huffman EM, et al. Serum progesterone concentration in pyometritic and normal postpartum dairy cows. *Theriogenology* 1983; 19: 647.
 37. Watson ED, Munro CD. A reassessment of the technique of rectal palpation of corpora lutea in cows. *Br Vet J* 1980; 136: 555-560.
 38. Boyd H, Munro CD. Progesterone assays and rectal palpation in pre-service management of dairy herd. *Vet Rec* 1979; 104: 341.