

Progesterone EIA-kit에 의한 乳牛의 妊娠診斷에 관한 研究

金敏奎 · 申鉉朱 · 李晚徽 · 李明憲 · 金相根

忠南大學校 農科大學 獸醫學科

(1989. 9. 25 접수)

Studies on the early diagnosis of pregnancy of dairy cows by EIA-kit of progesterone in milk

Min-kyu Kim, Hyun-ju Shin, Man-hwai Lee, Myung-heon Lee, Sang-keun Kim.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture Chungnam National University.

(Received Sept 25, 1989)

Abstract: This study was carried out to evaluate the accuracy of the early diagnosis of pregnancy in dairy cows using EIA-kit of progesterone in milk and to compare the progesterone concentrations in milk with those assayed by radioimmunoassay.

1. The progesterone concentrations of the pregnant cows ($2.07 \pm 0.54 \text{ ng/ml}$) were significantly higher than those of non-pregnant cows ($1.04 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$), and thereafter began to increase and maintained high levels.

2. During 20 to 22 days after artificial insemination, the accuracy of pregnancy diagnosis from EIA-kit of progesterone were 93.7% for non-pregnant cows, and 91.6% for pregnant cows.

3. During 20 to 22 days after artificial insemination, the accuracy of pregnancy diagnosis from milk progesterone concentrations were 100% for non-pregnant cows ($< 2.7 \text{ ng/ml}$), and 92.9% for pregnant cows ($\geq 3.2 \text{ ng/ml}$). The average overall accuracy of prediction for pregnant and non-pregnant cows were 96.5%.

4. Accordingly, the pregnancy diagnosis from EIA-kit of progesterone is thought to be recommendable because this early diagnostic means are simple with accurate result.

Key words: pregnancy, EIA-kit, progesterone, dairy cows.

緒 論

酪農經營에 있어서 分娩後 空胎期間을 短縮시켜 繁殖效率를 向上시키기 위해서는 早期에 妊娠을 精確히 診斷하는 것이 絶對的으로 必要하다.

妊娠牛에서는 妊娠期間이 經過함에 따라 妊娠黃體가 발달함으로서 體內的 progesterone 水準이 높아지고, 非妊娠牛에서는 黃體가 退化하여 卵胞가 發育하게 됨으로서 體內 progesterone 水準이 낮아지는데 이러한 progesterone 水準의 增減變化를 이용하여 妊娠與否를 診斷하려는 研究가 많이 수행되어 왔다.¹⁻¹⁴ 그러나,

現在 이용되고 있는 RIA나 EIA에 의한 progesterone 濃度の 測定은 高價의 機械設備과 技術 및 많은 經費를 요할 뿐만 아니라 放射線 汚染 등의 제약이 따라 실제로 利用頻度가 극히 낮은 편이며, 또한 直腸檢査역시 早期에는 妊娠診斷適中率이 아주 저조하며 고도의 熟練된 技術이 필요한 바, 실제 酪農家에 있어서는 早期에 妊娠診斷이 가능하며 또한 診斷方法이 용이하고 妊娠診斷適中率이 높은 診斷方法이 요구되고 있는 실정이다.

近年에는 分析化學의 進歩에 따라 steroid hormone의 測定이 가능한 heterologus enzyme immunoassay系

의 kit가 開發되어 비교적 早期에 용이하게 妊娠을 診斷할 수 있을 뿐만 아니라 妊娠診斷適中率도 높아 現場에서 간편히 應用할 수 있는 妊娠診斷法이라 할 수 있다.

이에, 本研究은 progesterone 測定用 EIA-kit를 이용하여 妊娠을 診斷하고 臨床的 應用性 與否를 시험하였는 바 그 結果는 다음과 같다.

材料 및 方法

供試牛: 供試牛는 大田近郊에서 飼育되고 있는 Holstein種 經産牛로서 정상적인 性週期를 나타내는 50頭의 乳牛를 供試하여 시험에 이용하였다.

試料: 檢體인 乳汁은 發情日 및 授精日, 授精後 2日, 4日, 7日, 10日, 14日, 17日, 19日 및 20~22日에 각각 採乳하였다. 乳汁은 搾乳 즉시 搾乳罐의 中央部에서 20ml를 취하여 牛乳保存劑인 potassium dichromate 1錠이 들어있는 25ml의 試驗管에 넣고 완전히 용해시킨 후 밀봉하여 -20°C 에 보존하면서 測定하였으며, 採取한 乳汁은 각각 2회 3,000 rpm으로 遠心分離하여 上層脂肪을 除去한 脫脂乳를 分離시켜 測定에 이용하였다.

檢定方法: 乳汁을 이용한 妊娠診斷方法은 Fig 1에서 보는 바와 같이, progesterone EIA-kit(帝國臟器製藥株式會社, 日本)를 이용하여, progesterone 抗體를 感作시킨 固相 piece에 酵素標示抗原과 檢體중의 progesterone을 競合시켜 基質을 分解 發色케 하여 色調의 變化(progesterone 濃도가 높은 것은 연한 黃色으로, 낮은 것은 진한 黃色으로 着色)를 觀察하였다. 아울러 1時間 이내에 波長 420nm에서 反應液의 吸光度를 구하

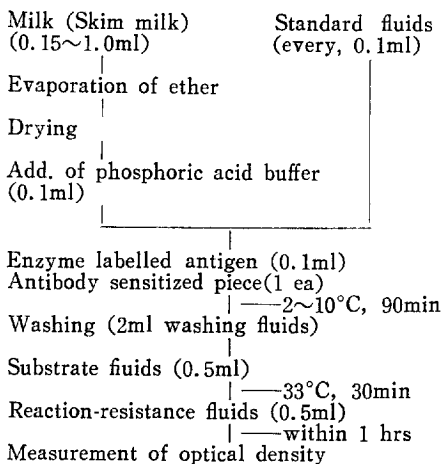


Fig 1. Cow pregnancy test based upon milk progesterone determination by EIA-kit of progesterone.

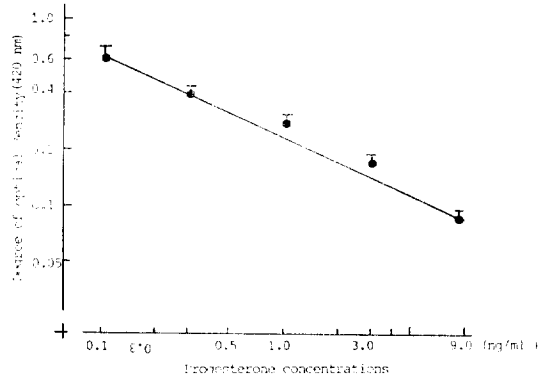


Fig 2. The standard curve measured by EIA-kit of progesterone.

여 檢體 1ml 중의 progesterone 濃度を 標準曲線에 의해 測定하였다(Fig 2).

Progesterone의 radioimmunoassay: Progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷 結果와 radioimmunoassay에 의해 測定한 progesterone 濃도에 의한 妊娠診斷 結果를 比較 檢討하고자 radioimmunoassay를 Heap et al⁴의 方法에 準하여 測定하였다.

妊娠判定: Progesterone EIA-kit에 의해 측정된 檢體 1ml 중의 progesterone 濃도와, RIA에 의해 測定한 乳汁내의 progesterone 濃도에 의한 妊娠與否를 診斷하였으며, 이때 妊娠의 判定은 授精後 60~70日 사이에 直腸檢査에 의해 判定하였다.

結 果

妊娠牛와 非妊娠牛의 progesterone 水準: 發情日 및 授精日과, 發情 및 授精後 各各 2日, 4日, 10日, 17日, 19日 및 20~22日에 採乳한 妊娠牛와 非妊娠牛의 乳汁내 progesterone 濃度の 變化는 Table 1과 같다.

妊娠牛의 乳汁內 progesterone 濃度は 授精後 增加하기 시작하여 4日에는 $3.91 \pm 0.97 \text{ ng/ml}$, 10日에는 $6.10 \pm 1.12 \text{ ng/ml}$, 17日에는 $8.21 \pm 1.38 \text{ ng/ml}$ 水準이었으며, 19日에는 $7.02 \pm 0.85 \text{ ng/ml}$ 로 약간 減少하였으나 그 이후 20~22日에는 $7.18 \pm 0.94 \text{ ng/ml}$ 水準이었다. 한편, 非妊娠牛에 있어서는 發情後 2日에는 $1.07 \pm 0.32 \text{ ng/ml}$, 4日에는 $2.75 \pm 0.73 \text{ ng/ml}$ 로 增加하기 시작하여 發情後 10日에는 $4.72 \pm 1.01 \text{ ng/ml}$ 로 急增하였으나 그 이후에는 減少하여 19日에는 $1.89 \pm 0.73 \text{ ng/ml}$, 다음 發情期인 20~22日에는 $1.04 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$ 水準이었다.

Progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷: 授精後 20

Table 1. The changes of milk progesterone concentrations of pregnant and non-pregnant cows

Non-pregnant cows		Pregnant cows	
Days after estrus	Progesterone* concentration (ng/ml)	Days after A.I.	Progesterone* concentration (ng/ml)
0	0.68±0.17	0	2.07±0.54
2	1.07±0.32	2	2.77±0.73
4	2.75±0.73	4	3.91±0.97
10	4.72±1.01	10	6.10±1.12
17	4.20±0.87	17	8.21±1.38
19	1.89±0.73	19	7.02±0.85
20~22	1.04±0.19	20~22	7.18±0.94

A.I.: artificial insemination.
* : mean±standard error.

Table 2. The accuracy of pregnancy diagnosis by EIA-kit of progesterone at 20 to 22 days after artificial insemination

Result of rectal palpation		Pregnancy test(ng/ml)			Total
		Dark-yellow Pregnancy	Doubtful	Light-ylelow Non-pregnancy	
Pregnancy	No. of cows %	22 (91.6)	1 (4.2)	1 (4.2)	24 (100)
Non-pregnancy	No. of cows %	1 (6.3)	—	15 (93.7)	16 (100)
Total	No. of cows	23	1	16	40

Table 3. Milk progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant cows classified by various physiological conditions(unit: ng/ml)

Condition	Pregnant	Non-pregnant
No. of cows	28	12
Total mean	4.04±0.92	1.85±0.82*
Milk yield		
<5,000kg	4.10±0.47	1.81±0.54
≥5,000kg	4.32±0.87	1.78±0.63
Calving		
<4th	4.29±0.59	1.93±0.54
≥5th	4.02±0.97	2.01±0.43
Days from calving to 1st estrus		
<60days	3.92±0.75	1.90±0.82
≥61days	4.07±1.01	1.89±0.79
Days from artificial insemination to return of estrus		
<60days		1.57±0.86
61~90days		1.87±1.06

* : mean±standard error.

~22일에 採乳한 全乳를 2회에 걸쳐 3,000 rpm으로 遠心分離하여 上層脂肪을 제거한 脫脂乳에 progesterone 抗體를 感作시킨 固相 piece에 酵素標示抗原과 檢體중의 progesterone을 競合시켜 基質을 分解 發色시켜 色調變化의 관찰과 波長 420 nm의 分光光度計에서 比色定量한 結果에 의한 妊娠診斷 成績과 直腸檢査에 의한 妊娠診斷 成績을 비교하여 妊娠與否를 診斷하였는 바, 그 結果는 Table 2와 같다.

Progesterone EIA-kit에 의해 妊娠을 診斷한 結果, 妊娠으로 判定된 乳牛는 22頭였으나, 直腸檢査에 의해 24頭가 妊娠으로 判定되었으므로 91.6%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 非妊娠으로 判定된 乳牛는 16頭였으나 15頭가 直腸檢査 結果 非妊娠으로 判定되었으므로 93.7%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 妊娠牛 및 非妊娠牛의 妊娠診斷 正確度는 각각 91.6%와 93.7%로서 非妊娠牛에서 약간 높은 正確度를 나타냈다.

乳汁내 progesterone 水準에 의한 妊娠診斷: Progesterone 水準을 妊娠診斷에 應用코져 授精後 20~22일에 測定한 妊娠牛와 非妊娠牛의 乳汁내의 progesterone 平均濃度는 각각 4.04±0.92 ng/ml, 1.85±0.82 ng/ml 水準이었으며, 乳汁내 progesterone 濃도에 의해 妊娠與否를 결정하는 限界水準은 Table 3에서 보는 바와 같이 妊娠牛에서는 3.2 ng/ml 以上, 非妊娠牛에서는 2.7 ng/ml 以下 水準이었다. 이에 根據한 妊娠診斷 結果를 直腸檢査 結果와 비교하여 분류한 바, 그 結果는 Table 4와 같다.

乳汁내 progesterone 濃도에 의해 妊娠으로 規定한 3.2 ng/ml 以上에 속하는 乳牛는 24頭였으나 直腸檢査 結果 26頭가 妊娠으로 判定되었으므로 92.3%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 非妊娠으로 規定한 2.7 ng/ml 以下에 속하는 乳牛는 12頭였으나 直腸檢査 結果 12頭가 非妊娠으로 判定되었으므로 100%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈다.

妊娠診斷法의 檢討: 乳汁을 통한 progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷法과 progesterone 濃도에 의한 妊

Table 4. The accuracy of pregnancy diagnosis from milk progesterone concentrations at 20 to 22 days after artificial insemination

Result of rectal palpation		Limit level of pregnancy test (ng/ml)			Total
		2.7 Non-pregnancy	2.8~3.1 Doubtful	3.2 Pregnancy	
Pregnancy	No. of cows %	—	2 (7.1)	26 (92.9)	28 (100)
Non-pregnancy	No. of cows %	12 (100)	—	—	12 (100)
Total	No. of cows	12	2	26	40

Table 5. Comparison of pregnancy diagnosis rates with EIA-kit of progesterone and milk progesterones at 20 to 22 days after artificial insemination

Result of rectal palpation		Methods of pregnancy diagnosis		Total
		EIA-kit of progesterone	Milk progesterone concentrations	
Pregnancy	No. of cows %	22 (91.6)	26 (92.9)	48 (100)
Non-pregnancy	No. of cows %	15 (93.7)	12 (100)	27 (100)
Total	No. of cows	37	38	75

娠診斷法을 비교한 성적은 Table 5와 같다.

Progesterone EIA-kit 및 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷 결과는 妊娠牛의 判定의 경우 각각 91.6%와 92.9%였으며, 非妊娠牛의 判定의 경우는 각각 93.7%와 100%로서 비교적 높은 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 乳汁내의 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法이 progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷法보다 다소 높은 診斷正確度를 나타냈다. 특히, progesterone EIA-kit 및 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法 모두가 妊娠牛에서 보다 非妊娠牛에서 診斷正確度가 높았다.

考 察

乳牛의 繁殖機能은 性腺에서 分泌되는 호르몬의 작용에 의하여 조절됨으로 妊娠牛에서는 妊娠黃體의 발달로 體內 progesterone 水準이 증가하고 非妊娠牛에서는 黃體의 退化에 따른 卵胞의 發育으로 progesterone 水準이 낮아지는데 이러한 增減變化를 이용하여 早期에 妊娠을 診斷하려는 研究가 많이 수행되어 왔다.

妊娠牛 및 非妊娠牛의 體內 progesterone 水準은 Table 1에서 보는 바와 같다. 이러한 水準은 Laing과 Heap¹⁵, Heap et al⁴ 및 鄭과 金¹⁶이 報告한 妊娠牛와 非妊娠牛의 progesterone 水準인 6.05 ± 2.20 ng/ml 및 1.44 ± 0.76 ng/ml, 7.50 ± 0.52 ng/ml 및 4.2 ± 0.92 ng/ml, 4.2 ± 0.5 ng/ml 및 1.6 ± 0.9 ng/ml 水準과 미

슷한 결과였으며, 특히 妊娠牛에서의 水準이 非妊娠牛보다 현저히 높은 水準을 나타냈다는 報告와 一致하였다. 이는 妊娠이 經過함에 따라 妊娠黃體의 發達에 따른 體內 progesterone의 增加에 基因된 것으로 思料된다.

早期에 간편하게 妊娠을 診斷하고자, progesterone EIA-kit를 이용한 妊娠診斷 成績은 Table 2에서 보는 바와 같이, 妊娠牛와 非妊娠牛에서 각각 91.6%와 93.7%로서 비교적 높은 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 특히 妊娠牛에 비해 非妊娠牛에서 높은 正確度를 나타냈다.

乳汁內 progesterone 水準에 의한 妊娠與否를 결정하는 限界水準은, 妊娠牛와 非妊娠牛에서 각각 3.2 ng/ml 以上과 2.7 ng/ml 以下 水準이었으며, 妊娠診斷 正確度는 92.9%와 100%였다. 이러한 결과는 Günzler et al¹⁷, Hoffmann et al⁶, Pennington et al⁸ 및 鄭과 金¹⁶이 각각 2.6ng/ml, 6.4 ng/ml, 2 ng/ml 및 3 ng/ml 以下를 非妊娠으로 看做했을 때 94~100%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈다는 결과와 類似한 成績이었으며, 妊娠牛에서 보다 非妊娠牛의 診斷成績이 더욱 正確하다고 報告한 점은 一致하였다.

以上の 結果로 미루어 볼 때 progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷法과 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法 모두가 早期에 妊娠을 診斷할 수 있는 비교적 適中率이 높은 妊娠診斷法으로서, 특히 progesterone

EIA-kit에 의한 妊娠診斷法은 특별한 機械設備나 技術의 필요없이 簡便하게 妊娠을 診斷할 수 있어 酪農家들이 現場에서 應用이 容易하여 勸獎할 만한 妊娠診斷法으로 思料된다.

結 論

授精後 20~22일에 progesterone 抗體를 感作시킨 固相 piece에 酵素標識抗原과 檢體 중의 progesterone을 競合시켜 基質을 分解 發色시켜 色調의 變化를 比色定量하는 progesterone EIA-kit에 의해 妊娠을 診斷하고 乳汁內 progesterone 水準에 의해 診斷한 結果와 直腸 檢査 結果와 比較하여 臨床의 應用性 與否를 檢討하였는 바, 그 結果는 다음과 같다.

1. 授精後 20~22일의 妊娠牛의 乳汁內 progesterone 濃度는 2.07 ± 0.54 ng/ml로서 非妊娠牛의 1.04 ± 0.19 ng/ml 보다 월등히 높았으며, 전차 增加하기 시작하여 높은 水準을 유지하였다.

2. 授精後 20~22일에 progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷에서 妊娠 및 非妊娠牛는 각각 22頭, 15頭였으나 直腸檢査에 의해 24頭, 16頭가 각각 妊娠 및 非妊娠으로 判定되어 91.6%, 93.7%의 妊娠診斷正確度를 얻었다.

3. 授精後 20~22일의 乳汁內 progesterone 濃도에 의한 妊娠診斷에서 2.7 ng/ml 以下를 非妊娠牛, 3.2 ng/ml 以上을 妊娠牛로 했을때, 妊娠診斷 正確度는 각각 92.9%, 100%로서, 非妊娠牛의 診斷에서 正確性이 더욱 높았으며, 妊娠 및 非妊娠牛에 대한 全體의 平均 正確度는 96.5%였다.

4. Progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷法은 廉價로 용이하게 妊娠을 診斷할 수 있으며, 妊娠診斷 正確度도 높아서 酪農家들에게 勸獎할 만한 妊娠診斷法으로 判定되었다.

參 考 文 獻

1. Bishop CA, Bond CP, Roberts C. Early diagnosis of non-pregnancy in cattle: The first eighteen months of a commercial service. *A B A* 1977;45:47.
2. Günzler OL, Korndorfer H, Hamburger R, et al. The importance of the milk progesterone test for fertility in the bovine. *VIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination* 1978.
3. Günzler OL, Rattenberger E, Görlach A, et al. Milk progesterone determination as applied con-

- firmation of oestrus, the detection of cycling and as an aid to veterinarian and biotechnical measures in cows. *Br Vet J* 1979;135:541~549.
4. Heap RB, Gwyn M, Laing JA, et al. Pregnancy diagnosis in cows: Changes in milk progesterone concentration during the oestrus cycle and pregnancy measured by rapid radioimmunoassay. *J Agri Sci* 1973;81:151~157.
5. Heap RB, Holdworth RJ, Godsby JE, et al. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *Br Vet J* 1976;32:445~463.
6. Hoffmann B, Günzler OL, Korndorfer L, et al. Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow. *Theriogenology* 1974;2:1~28.
7. Inaba T, Nakajima Y, Matsui N, et al. Pregnancy diagnosis in cows: A comparison of the method of ultrasonic linear electronic scanning and estimation of plasma progesterone. *Jpn J Anim Reprod* 1983;29:178-181.
8. Pennington JA, Spahr SL, Lodge JR. Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Br Vet J* 1975;132:496.
9. Pennington JA, Spahr SL, Lodge JR. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk. *A B A* 1977;45:176.
10. Pope GS, Majzlik I, Ball PJH, et al. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br Vet J* 1976;132:499~506.
11. Robertson HA, King GJ. Plasma concentration of progesterone, oestrone, oestradiol-17 β and oestrone sulphate in the pig at implantation during pregnancy and at parturition. *J Reprod Fert* 1974;40:133~141.
12. Sato S, Tomida G, Takahashi E, et al. Changes in serum progesterone levels and subsequent fertility in cows after artificial insemination. *Jpn Vet J* 1985;38:506~509.
13. Sugiyama S, Naka T, Tsunoda N, et al. An enzyme immunoassay of serum oestrone sulphate and its application to early pregnancy diagnosis in pigs. *Br Vet J* 1985;141:60.

14. Wettemann RP, Hafs HD. LH, prolactin, estradiol and progesterone in bovine blood serum during early pregnancy. *J Anim Sci* 1973;36: 51~56.
15. Laing JA, Heap RB. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br Vet J* 1971;19: XIX-XXII.
16. 鄭英彩, 金昌根. 소의多頭分娩에 관한 研究. Ⅱ. 牛乳의 hormone 分析法에 의한 소의 早期 妊娠診斷에 관한 研究, 韓國畜產學會誌 1980;22:7~15.
17. Günzler OL, Korndorfer H, Lohoff R, et al. Practical experience with the estimation of progesterone in the milk for determining the fertility status of cows. *A B A* 1975;43:524.
18. Hoffmann B, Günzler R, Hamburger R, et al. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle: Methodological approaches and present status of application in Germany. *Br Vet J* 1976;132:469~476.