

## 한우 인공수정에서 수정적기 진단키트 활용이 수태율에 미치는 영향

최선호<sup>†</sup>, 진현주  
농촌진흥청 국립축산과학원

### Effects of Optimal Heat Detection Kit on Fertility after Artificial Insemination (AI) in Hanwoo (Korean Native cattle)

Sun-Ho Choi<sup>†</sup> and Hyun-Ju Jin

National Institute of Animal Science, RDA, 55365, Wanju, Jeollabukdo, Korea

#### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the optimal artificial insemination (AI) time with diagnostic kit at ovulation time. We already applied the patent about the protein in the cow heat mucose in external reproductive tract. And we would examine the accuracy for detection of cow heat by the kit produced with the protein. Evaluation of optimal heat detection was tried two time at 12 hrs and 24 hrs after the heat. And then, AI service also performed two times with no relation to the results of heat diagnosis by heat detection kit and pregnancy rates were checked with rectal palpation on 60<sup>th</sup> day after AI. Heat diagnostic results by kit in natural heat after 12 hrs in Hanwoo cows were showed 31.3~75.0% on positive in first heat detection and 33.3~100.0% on positive in second heat detection. In the 1<sup>st</sup> positive results were significant different ( $p<0.05$ ), but 2<sup>nd</sup> positive were not. The results of heat detection showed different result on regional influence and individual cow effects. The pregnancy rates of first trial of heat detection were showed 34.4~78.7% on positive and 21.3~68.8% on negative after the diagnosis by heat detection kit. And the pregnancy rates of next trial of heat detection were showed 33.3~85.7% on positive and 14.3~66.6% on negative after the heat diagnosis. Both positive results of first trial and next trial also were showed significant different ( $p<0.05$ ), but negative results were not. In positive result, first trial of total pregnancy rates was higher than the next trial of pregnancy, but there showed opposite results on negative results. In conclusion, the optimal heat detection kit is suitable to ordinary Hanwoo cows and it suggested that we have to improve the kit's accuracy by detecting the materials like proteins related optimal AI time.

(Key words: Optimal, Artificial insemination, Heat detection, Kit, Hanwoo)

#### 서론

최근 발정 관찰을 위해 제작된 기구나 장비는 발정 분비물의 점도나 센서의 전기적 저항반응과 외음부의 온도(Sakatani 등, 2016)등의 외부생식기의 현상을 관찰하여 실시하고 있으며, CCTV 관찰 및 적외선 카메라와 열화상카메라(Talukder 등, 2015) 등 다양한 방법을 이용하여 수행하고 있으나, 화학적 분석 등에 입각한 발정 측정과 수정적기의 판단은 전무한 실정이다. 한편 사람에 있어서 타액의 estradiol(Ozono 등, 1992; Guida 등, 1993; Fehring과 Gaska, 1998)이나 소에서 건조시킨 타액의 결정 형태(Ravinder 등, 2016), 낙타(Haberova, 2010), 개(Pardo-Carmona 등, 2010) 를 확인하여 수정적기를

판단하는 것이 과학적인 방법이라 보고되고 있다. 현재의 발정 관찰 방법은 발정 징후가 나타나는 암소의 반응을 식별하여 승가허용, 발정분비물, 보행의 횟수(Talukder 등, 2015) 등을 관찰하는 방법이나 미약 발정과 같이 발정징후가 분명하지 않은 경우의 발정 관찰은 어려운 실정므로, 수태율을 높이기 위해서 2~3회의 인공수정을 실시함으로써 발정의 미발견이나 재발정을 등으로 인한 수태율 저하를 줄이려 하고 있다. 소의 발정관찰 방법을 개선하기 위하여 Kamar(Kamarinc, USA)를 등에 부착하거나 크레용을 미근부에 그려서 증가로 인해 발생하는 현상을 승가허용 행동으로 확인하여 첫 발정 발견율을 16.7%에서 75.0% 개선되었음을 보고하였다(박 등, 2002). 한우 암소(젖소포함) 사육규모가 확대되면서 번식우에

<sup>†</sup> Correspondence: Sun-Ho Choi  
Phone: +82-63-238-7210  
E-mail: sunho8722@korea.kr

대한 발정관찰을 향상시키기 위하여, 발정감지센서를 관찰대상 소의 미근부(꼬리 윗부분)에 부착하는 기술을 개발하였고 보고하였다(조 등, 2008), 번식우의 효율적인 번식기록관리와 발정행동인식 발목형 센서를 부착하여 발정관찰 인공수정을 실시하여 번식효율이 17.8~23.3% 개선되었음을 보고하였다(김 등, 2012). 따라서 인공수정이나 수정란이식을 통해 농가에 이득이 되는 송아지의 생산을 위해 발정과 수정적기를 과학적인 방법으로 진단하고 번식에 활용할 필요가 대두되고 있다. 암소의 발정시기에 외형적 행동변화 뿐만 아니라 생체의 변화를 탐색함으로써 과학적인 진단이 가능할 것으로 예상되어 발정시기에 분비되는 발정 분비물내의 단백질을 분리 동정하여 특이 단백질을 분리하였다. 이를 토대로 유전체의 발현율을 재검증하여 발현 특이 단백질을 제작하는 등 키트화하는 기반을 구축하였다. 따라서 본 실험은 이러한 근거를 기반으로 하여 암소 발정 시 발현되는 특이 단백질을 탐색하는 소 수정적기 진단키트를 활용하여 한우 농가의 수태율 향상을 위하여 발정키트 사용 후 발정발현율과 인공수정 임신율을 각각 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 인공수정 대상농가의 선정

전국에 번식암소 50두 이상의 농가를 선정하여 자연발정이 2회 이상 정상적으로 발현되는 암소를 선발하였으며, 자연발정 혹은 발정동기화법(PGF2α와 GnRH+CIDR 처리에 의한 발정동기화)을 활용하여 번식우의 발정을 유도하였고, 발정이 나타난 암소는 수정적기 판정키트를 활용하여 수정시기를 정하였다.

#### 2. 수정 적기 판정키트의 활용

발정 후 12시간이 경과한 암소의 질부에 스왑(swap)이나 직검장갑을 착용한 손으로 질점액을 채취하여 점액 농후부를 함유 단백질의 농도를 조절하기 위해 희석액에 넣어 희석하였고, 희석한 발정 점액을 키트의 반응 유도 구멍에 3~4방울 떨어뜨려 반응을 유도하였다. 0.5~1분 경과 후 반응 표시줄

하단부에 키트가 정상적으로 반응함을 알려주는 붉은 밴드가 나타나며, 양성일 경우 상단부에 붉은 밴드가 나타나 수정적기임을 감지하여 판정하였다(Fig. 1)

#### 3. 수정 적기를 검사한 암소의 인공수정 및 수태율 검사

수정적기를 검사한 암소의 인공수정은 일반적인 인공수정 방법으로 실시하였으며, 수정적기 판정키트의 양·음성 여부에 관계없이 2회 이상 인공수정을 실시하여 양성 및 음성에 대한 수태율을 조사하였다. 인공수정 후 재발정이 나타난 암소는 재차 수정적기 판정과 인공수정을 실시하였고, 재발정이 나타나지 않은 암소는 인공수정 60일 이후에 직장검사법으로 임신감정을 실시하여 수태율을 조사하였다.

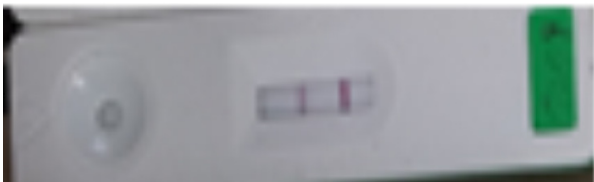
#### 4. 수정 적기 판정결과 및 수태율에 대한 통계분석

수정적기 진단키트를 이용한 수정적기 판정결과와 판정 후 양성 및 음성의 결과와 관계없이 인공수정하여 60일 이후의 임신진단 결과에 대한 통계분석은 95% 신뢰수준에서 Statview Program (USA)의 ANOVA 검정을 이용하여 분석하였다.

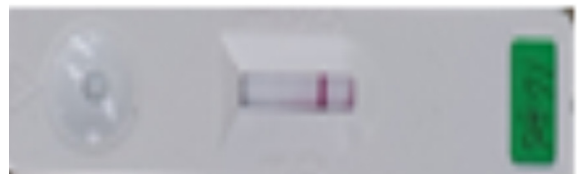
### 결 과

#### 1. 수정적기 판정 키트를 이용한 판정 결과

수정적기 진단키트를 활용하여 자연발정 혹은 발정동기화를 통해 발정이 유도된 암소의 수정적기를 판정한 결과는 Table 1과 같다. 암소의 사육환경과 지역적인 차이가 있으나, 1차 수정적기 진단키트의 판정결과에서 31.3~75.0%까지 양성 판정이 나타났고, 시험 농장에 따른 발정발현율에서는 유의적인 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 대부분의 농가는 자연발정을 통해 암소의 임신을 유도함으로써 개체간의 차이(진단키트 밴드의 발색율)가 컸으나, JY 농가는 CIDR 등을 이용하여 발정동기화를 시도하여 비교적 일정한 발정 현상을 관찰할 수 있었으나, 수정적기 키트의 양성 반응은 높게 나타나지 않았다. 2차 수정적기 진단키트의 판정결과는 33.3~100.0%로 나타났으며, 1차 수정에 의해 발정이 재발된 개체를 위주로 실시한 결과 시험농장간의 차이는 없었다. 2차 판정은 1차에서 이미 착상



Positive: optimal for AI



Negative : not optimal for AI

Fig. 1. Evaluation of estrous mucus by optimal heat detector

Table 1. Positive rates of heat detection by optimal artificial insemination diagnosis kits.

Farms	1 <sup>st</sup> trial		2 <sup>nd</sup> trial	
	No. of positive/cows	%	No. of positive/cows	%
JY	13/25	40.0 <sup>abc</sup>	3/4	75.0
CB	21/28	75.0 <sup>a</sup>	1/3	33.3
CS	14/41	34.2 <sup>abc</sup>	2/3	66.7
KY	5/16	31.3 <sup>abc</sup>	4/4	100.0
JS	5/9	55.6 <sup>ab</sup>	3/5	60.0
<b>Total</b>	<b>58/119</b>	<b>48.7</b>	<b>13/19</b>	<b>68.4</b>

a, ab, abc in the same column means significant different ( $p<0.05$ ).

내지는 임신의 단계에 들어선 암소의 나머지이므로 발정발현이 다소 떨어졌으나, 수정적기 판정키트에서는 1차에 비해 큰 차이를 보이는 양성 발현율을 나타냈다. 그러나 판정두수가 적어 적절한 결과로 판정하기는 어려울 것으로 사료된다.

## 2. 수정적기 판정 키트로 판정 후 결과와 관계없이 인공수정을 실시한 수태율

수정적기 진단키트를 활용하여 수정적기를 판정한 후 인공수정을 실시하여 얻어진 수태율은 Table 2와 같다. 1차 수정적기 진단에서 양성으로 나타난 암소에 인공수정한 결과 수태율은 34.4~78.7%를 나타냈으며, 시험농장 간에 유의적인 차이를 나타냈다( $p<0.05$ ). 또한 2차 수정적기 진단 후 양성으로 나타난 암소의 인공수정 수태율은 33.3~85.7%를 나타냈고, 지역적인 차이를 보였으며, 유의적인 차이를 나타냈다( $p<0.05$ ). 특히 1차 수정적기 진단과 2차 수정적기 진단의 결과와 관계없이 수태율에서 큰 차이를 보인 경우가 많았다. 이는 지역간 개체들의 발정주기의 변화가 일정하지 않음을 시

사하는 것으로 대상 암소의 발정이 농가들 간의 사양관리에 차이가 있어 일정하게 나타나지 않는 것으로 사료된다. 1차 수정적기 진단과 2차 수정적기 진단에서 음성으로 나타난 암소의 인공수정 결과는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 양성으로 판정된 개체 중 수태가 되지 않고 발정이 재귀된 개체들이 포함되어 수태율의 차이가 일정하지 않음을 시사한다고 하겠다.

## 고 찰

한우사육에 있어서 가장 중요한 점은 번식우는 1년 1산의 송아지를 생산하고 고깃소는 고품질의 고기를 생산하는 비육을 철저히 해야 한다. 번식우가 송아지 생산을 하기 위해서는 암소의 발정이 그 기점이 되며, 이를 원활하게 이용할 경우 송아지 생산성 향상을 꾀할 수 있다. 최근 한우산업은 규모화되어 사육두수가 늘어나면서 발정관찰을 위해 관리해야 할

Table 2. Pregnancy rates of AI after detection of optimal AI diagnosis kit

Farms	1 <sup>st</sup> trial of AI				2 <sup>nd</sup> trial of AI			
	<Positive>*		<Negative>**		<Positive>*		<Negative>**	
	No. of cows		No. of cows		No. of cow		No. of cow	
	Inseminated	Pregnant (%)	Inseminated	Pregnant (%)	Inseminated	Pregnant (%)	Inseminated	Pregnant (%)
JY	30/58	51.7 <sup>b</sup>	24/58	41.4	31/58	53.4 <sup>ab</sup>	27/58	46.5
CB	21/28	75.0 <sup>a</sup>	7/28	25.0	3/9	33.3 <sup>abc</sup>	6/9	66.6
CS	41/54	75.9 <sup>a</sup>	13/54	24.1	5/9	55.6 <sup>ab</sup>	4/9	45.6
KY	11/32	34.4 <sup>b</sup>	22/32	68.8	6/7	85.7 <sup>a</sup>	1/7	14.3
JS	37/47	78.7 <sup>a</sup>	10/47	21.3	10/13	76.9 <sup>a</sup>	3/13	23.1
<b>Total</b>	<b>140/219</b>	<b>64.0</b>	<b>76/219</b>	<b>34.7</b>	<b>55/96</b>	<b>57.3</b>	<b>41/96</b>	<b>42.7</b>

\* : Positive indicated positive after the detection with optimal AI kits.

\*\* : Negative indicated negative after the detection with optimal AI kits.

a, b, ab, abc in the same column means significant different ( $p<0.05$ ).

암소가 많아 정확하고 편리한 발정 발견 방법이 연구되어 왔으나, 대부분이 승가나 외음부의 변화 및 점액의 출현 형태 등으로 관찰하여 임신을 유도하고 있다. 이 방법은 빈번한 관찰에 의해 가능한 방법이나 사육두수가 많은 경우는 한계가 있으므로, 번식관리 일지에 발정주기를 잘 기록하여 하는 방법이 있으나(김 등, 2012), 역시 사육두수의 문제와 농가별 사양관리의 형태에 따라 다양한 차이를 나타낸다. 그래서 개발된 방법은 암소의 미근부에 안료가 든 주머니를 부착하여 승가 압력에 의해 안료주머니가 터지면 발정의 여부를 판단할 수 있었는데, 그것을 ICT에 접목한 것은 미근부에 승가 시 발생하는 압박 자극을 감지하는 센서를 부착하여 조명이 들어 오거나(조 등, 2008), 자극 신호를 무선으로 컴퓨터에 전달하는 등의 방법이 개발되었다. 최근에는 축사내에 적외선을 지속적으로 소의 머리정도의 높이로 발사하고, 승가를 할 경우 머리가 적외선의 위쪽으로 올라가게 되므로, 센서가 승가에 의해 차단되는 적외선을 감지하여 발정을 발견하는 방법도 개발되었으나, 실질적인 활용도에 따라 선택의 폭이 다양하여 적극적으로 활용되지 못하고 있다. Redden 등(1993)은 만보계를 활용하여 대개 80% 정도의 발정을 발견할 수 있다고 보고하고 있으며, Sakatani 등(2016)은 화우에서 외음부의 온도와 습도를 측정하여 발정을 확인함으로써 유의적인 발정 발견율( $p < 0.05$ )을 보고하였고, 이 방법은 미약발정의 경우와 하절기의 더위(Sakatani 등, 2012)에도 비교적 정확한 발정을 확인할 수 있어서, 이는 만보계(Pedometer)의 발정 발견율 보다 더 높다(>90%)고 비교하고 있으나, 장비의 정확도에 따라 다소 차이가 있을 것으로 사료된다. 이러한 물리적인 관찰 방법은 소의 행동이 일정하지 않아 발견 확률이 높지 않다는 것도 문제점이다.

그렇다면 좀 더 화학적, 생화학적 방법으로는 혈액이나 우유(Ingenhoff 등, 2016) 내의 progesterone 농도를 측정하여 발정의 여부를 판단하는 것이 개발되었으나, 혈액의 채취가 농가에서는 쉽지 않고 progesterone을 측정하는데 많은 비용이 소요되므로 활성화되기가 어렵다는 단점이 있다. 또 BUN(혈액내 요소태질소)(박 등, 2002)이나 MUN(우유내 요소태질소) 등을 측정 하는 방법도 최근 개발되었으나, 역시 측정하는데 많은 비용이 소요되어 활성화되지 못하고 있다. 이전 방법에 비하여 보다 간편하고 값싼 관찰 방법을 고안한 것이 질점막 상피의 변화를 조사하여 발정을 확인하였고 (Blazquez 등, 1989; Mingoas와 Ngayam, 2009), 특히 Tongku 등(2016)은 탈락상피의 변화를 관찰을 통해 소의 발정기에는 세포분열 중기 세포가 주로 나타난다는 것을 보고하였다. 한편, 유사한 방법으로 생쥐(Hayashi 등, 1988)와 설치류(엔 Santos 등, 2017)에서 질점막 상피의 변화로 발정을 관찰할 수 있다고 하였으나, 실험실에서 세포학적 인 관찰이 필요한 부분이어서 활성화

화되기가 쉽지 않다. 새롭게 개발된 더 간단한 방법은 소의 침을 건조하여 그 결정으로 판단하는 방법이 고안되었는데, Ravinder 등(2016)은 침의 건조 형태가 양치류의 형태일 경우 발정기임을 유의적으로 확인하였고( $p < 0.01$ ), 그것과 함께 분석한 침의 E2 수준과 E2/P4 비율이 유의적인 차이를 보여( $p < 0.05$ ), buffalo의 발정관찰에 상당히 유의한 방법임을 확인하였다고 하였다. 발정주기 중 타액 성분의 변화는 여성의 타액내 스테로이드의 변화에 의해 확인되어(Ozono 등, 1992), 여성의 생리주기 중 건조한 침의 형태(Guida 등, 1993)를 확인함으로써 구체화되어 소에서도 확인할 수 있게 되었다. 침을 건조할 때 생기는 형태 변화의 주요 요소는 고농도의 소금과 점액이 주로 그러한 형태를 만들며, 이것을 조절하는 것이 배란 전 estrogen 수준에 의해 일어난다고 보고하고 있다. 그러나 이러한 일반적인 동물의 생리현상을 조절하는 것은 섭취하는 영양분에 의해 크게 좌우되므로, 소에 있어서 사양관리가 상당히 중요하게 작용하게 되는데, Geppert 등(2016)은 일반적인 사료에 첨가량의 약 1.5배 단백질의 첨가는 배란할 난포가 커졌고, 평균적으로 난포의 수가 증가하는 경향을 보인다고 하였으나, estradiol 농도는 난포크기와 차이가 없다고 하였다.

이와 같이 발정 확인을 위한 다양한 방법이 개발되고 있으나, 사양관리의 차이에 의해 발정의 강약, 점액의 출현 및 점액 양의 차이, 발정기에 점액의 형태 및 양의 변화 등 다양한 변화에 의해 발정의 확인 및 이를 확인하여 인공수정 적기를 결정하는 것은 상당한 차이를 나타냄으로 정확하고 과학적인 발정 발견 방법의 연구가 절실한 상황이 지속되고 있다. 따라서 본 연구는 발정기와 배란기의 사이에 나타나는 단백질을 탐색하여 적절한 수정 시기를 확인하기 위해 발정기 단백질에 대한 특허를 요청하였고 이러한 기전을 활용한 진단키트를 개발하여 현장에서 확인한 결과 일정한 결과를 얻게 되어 결과를 보고하고자 하였다. 특히 자연발정과 발정동기화와 무관하게 외형적인 발정의 확인에 의해 인공수정 시 다소 높은 수태율을 보여 적절한 번식우 사양관리 방법으로 수태율을 일정 수준 혹은 향상을 할 수 있다는 것이 확인되었다.

## ACKNOWLEDGMENTS

본 논문은 농촌진흥청 시험연구사업(과제번호 : PJ 011706)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- Blazquez NB, Batten EH, Long SE, Perry GC and Whelehan OJ. 1989. A quantitative morphological study of the bovine vaginal epithelium during the oestrous cycle. *Journal of Comparative Pathology* 100:187-193.
- Dos Santos AC, Viana DC, Oliveira GB, Silva RD, Oliveira MF and Assis-Neto AC. 2017. Follicular development and morphological changes in the vaginal epithelium during the estrous cycle of *Galea spixii*. *Microsc. Res. Tech.* 80:167-176.
- Fehring RJ and Gaska N. 1998. Evaluation of the lady free biotester in determining the fertile period. *Contraception* 57:325-328.
- Guida M, Barbato M, Bruno P, Lauro G, and Lampariello C. 1993. Salivary ferning and the menstrual cycle in women. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 20:48-54.
- Geppert TC, Meyer AM, Perry GA and Gunn PJ. 2016. Effects of excess metabolizable protein on ovarian function and circulating amino acids of beef cows: 2. Excessive supply in varying concentrations from corn gluten meals. *Animal* 9:1-9.
- Haberova T. 2010. A preliminary study of saliva crystallization in Bactrian camels (*Camelus bactrianus*). In: Cusimani EF, Havrland B, editors. 4th Scientific conference of institute of tropic and subtropics on sustainable use of natural resources in tropic and subtropics. *Plague:CULS Prague*; p.28.
- Hayashi K, Hayashi M, Boutin E, Cunha GR, Bernfield M and Trelstad RL. 1988. Hormonal modification of epithelial differentiation and expression of cell surface heparan sulfate proteoglycan in the mouse vaginal epithelium. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Lab. Invest.* 58:68-76.
- Ingenhoff L, Hall E and House JK. 2016. Evaluation of a cow-side milk progesterone assay and assessment of the positive predictive value of oestrus diagnosis by dairy farmers in New South Wales. *Austral. Vet. J.* 94:445-451.
- Mingoas JLK and Ngayam. 2009. Preliminary findings on vaginal epithelial cells and body temperature changes during oestrous cycle in Bororo Zebu cow. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3:1.
- Ozono S, Onozuka M, Sato K, and Ito Y. 1992. Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone, and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinomas. *Cell Struct. Funct.* 17:169-175.
- Pardo-Carmona B, Moyano MR, Fernandez-Palacios R and Perez-Marin CC. 2010. Saliva crystallization as a means of determining optimal mating time in bitches. *J. Small Anim. Pract.* 51:437-442.
- Ravinder R, Kaipa O, Baddela VS, Sinha ES, Singh P, Nayan V, Velagarla CSN, Baithalu RK, Onteru SK and Singh D. 2016. Saliva ferning, an unorthodox estrus detection method in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 86:1147-1155.
- Redden KD, Kennedy AD, Ingalls JR and Gilson TL. 1993. Detection of estrus by radiotelemetric monitoring of vaginal and ear skin temperature and pedometer measurements of activity. *J. Dairy Sci.* 76:713-721.
- Sakatani M, Balboula AZ, Yamanaka K and Takahashi M. 2012. Effect of summer heat environment on body temperature, estrous cycle and blood antioxidant levels Japanese Black cow. *J. Anim. Sci.* 83:394-402.
- Sakatani M, Takahashi M and Takenouchi N. 2016. The efficiency of vaginal temperature measurement for detection of estrus in Japanese Black cows. *J. Reprod. Dev.* 62:201-207.
- Talukder S, Thomsom PC, Kerrisk KL, Clark CE and Celi P. 2015. Evaluation of infrared thermography body temperature and collar-mounted accelerometer and acoustic technology for prediction time of ovulation of cows in a pasture-based system. *Theriogenology* 83:739-748.
- Tongku NS, Juli M, Rohaya, Cut NT, Dian M, Sri W, Juliana R, Nurhafni, Budianto P and Herrialfian. 2016. Determining proportion of exfoliative vaginal cell during various stages of estrus cycle using vaginal cytology techniques in Ach cattle. *Vet. Med. Intl. Vol. Article ID 3976125*.
- 박수봉, 서국현, 전기준, 최재관, 정영훈, 조원모, 백봉현, 나기준, 백광수, 전병순, 우제석, 안병식. 2002. 소 발정관찰방법 개선에 의한 번식률 향상, 농촌진흥청 영농기술정보.
- 조원모, 장선식, 권응기, 조영무, 신기준, 강수원, 백봉현, 유용희, 최영경. 2008. 『발정개시시간 표시기』를 이용한 한우 암소 발정관찰 활용, 농촌진흥청 영농기술정보.
- 김경호, 진현주, 천동원, 백광수, 이명식, 장성운. 2012. 소 번식관리시스템 활용, 농촌진흥청 영농기술정보.

---

Received March 16 2017, Revised March 30 2017,

Accepted September 12, 2017