

乳牛의 血清內 Progesterone 濃度の 簡易測定에 의한 妊娠診斷에 관한 研究

金相根 · 金敏奎 · 申鉉朱 · 李晚徽 · 李明憲

忠南大學校 農科大學

Studies on the Pregnancy Diagnosis by Easy Measurement of Serum Progesterone Concentrations in Dairy Cows

Kim, S.K., M.K. Kim, H.J. Shin, M.H. Lee and M.H. Lee

College of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to evaluate the ability of clinical application of pregnancy diagnosis based upon the determination of progesterone in serum, utilizing EIA-kit of progesterone concentrations in the serum were assayed by radioimmunoassay.

1. The progesterone concentrations of the pregnant cows(2.40 ± 0.34 ng/ml) were significantly higher than those of non-pregnant cows(1.03 ± 0.09 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 95.0% for non-pregnant cows, and 92.3% for pregnant cows.
3. During 20 to 22 days after artificial insemination, the accuracy of pregnancy diagnosis from serum progesterone concentrations were 100% for non-pregnant cows(< 1.4 ng/ml), and 96.2% for pregnant cows(≥ 2.0 ng/ml). The average overall accuracy of prediction for pregnant and non-pregnant cows were 98.1%.
4. Accordingly, the pregnancy diagnosis from EIA-kit of progesterone is thought to be recommendable because this early diagnostic means are simple with accurate results.

I. 緒 論

國民所得의 증대로 畜産物의 需要가 急增되고 乳牛의 飼育規模가 확대됨에 따라 繁殖效率의 향상이 酪農經營에 중요한 문제로 대두되게 되었다.

妊娠牛에서는 妊娠黃體의 활동에 의해 progesterone 水準이 높아지고, 非妊娠牛에서는 黃體가 퇴화

하고 卵胞의 발육에 의해 progesterone 水準이 낮아 지는데 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(Plotka 등, 1967; Laing 과 Heap, 1971; Robertson 과 Sarda, 1971; Robertson, 1972; Heap 등, 1973; Hoffmann 등, 1974; Dobsen 등, 1975; Smith 등, 1975; Pope 등, 1977; 岡因과 山

本, 1985).

지금까지 주로 利用되어온 radioimmunoassay (RIA)나 enzymeimmunoassay(EIA)를 통한 progesterone 濃度の 측정은 高價의 機械設備와 熟練된 기술과 많은 경험을 요할 뿐만 아니라 放射線 汚染 등의 제약이 따라 이용빈도가 극히 낮은 편이며, 또한 直腸檢査 역시 早期에는 妊娠診斷 適中率이 저조할 뿐만 아니라 고도의 숙련된 기술을 요하므로, 실제 酪農家들이 현장에서 간편하고 용이하게 應用이 가능하면서도 診斷適中率이 높은 방법이 요청되고 있는 실정이다.

近年에는 分析化學의 진보에 따라 steroid hormone의 측정을 酵素로서 標識한 높은 感度の 호르몬 측정이 가능한 hetelogenous enzyme immunoassay 系의 kit가 개발되어 간편하게 측정이 가능하여 비교적 早期에 妊娠을 診斷할 수 있을 뿐만 아니라 診斷正確度도 높아 현장에서 간편히 應用할 수 있는 妊娠診斷法이라 할 수 있다.

이에, 本 研究는 progesterone 측정용 EIA-kit를

이용하여 妊娠을 診斷하고 臨床的 應用性 與否를 試驗하였는 바 그 結果는 다음과 같다.

II. 材料 및 方法

1. 供試牛

供試牛는 大田 近郊에서 사육되고 있는 Holstein 種 經産牛로서 臨床的으로 건강하며 정상적인 性週期를 나타내는 50 頭의 乳牛를 供試하여 試驗에 이용하였다.

2. 試料採取

檢體인 血清은 發情日 및 授精日, 發情 및 授精後 각각 3日, 5日, 10日, 15日, 19日 및 20~22日에 採血하였다. 採血은 供試牛의 頸精脈으로부터 10 ml의 血液을 採血하여 3,000 rpm으로 遠心分離하여 血清을 분리시켜 -20°C 에 冷凍保存하면서 측정에 이용하였다.

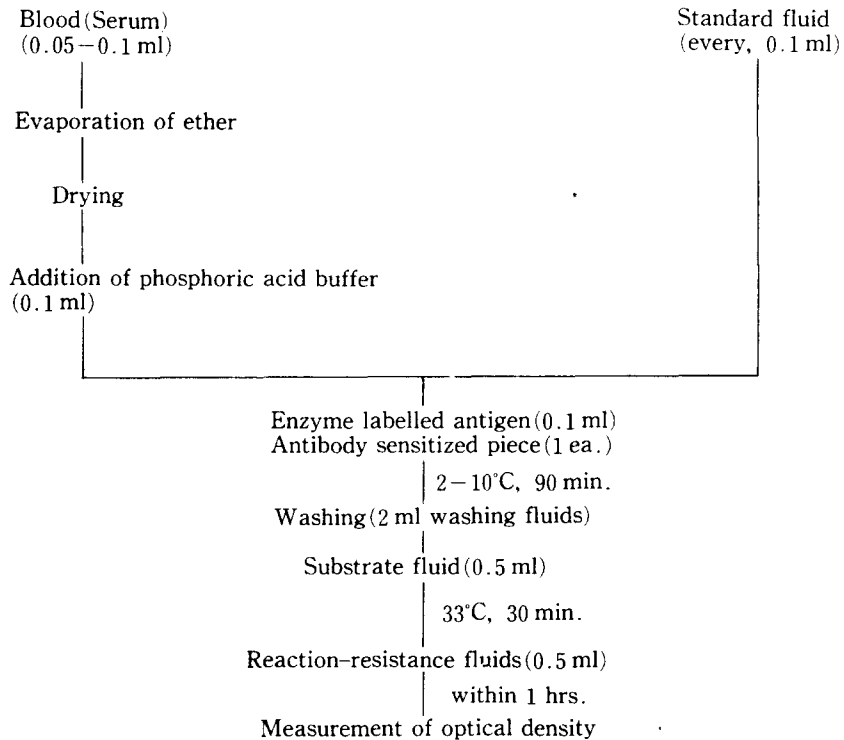


Fig. 1. Cow pregnancy test based upon serum progesterone determination by EIA-kit of progesterone

3. 方法

1) 檢定方法

血清의 progesterone 水準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 농도가 높은 것은 연한 黃色으로, 낮은 것은 진한 黃色으로 着色)를 관찰하였다. 아울러 1時間 이내에 波長 420 nm에서 反應液의 吸光度를 구하여 檢體 1 ml 중의 progesterone 濃度を 標準曲線에 의해 測定하였다(Fig. 2)

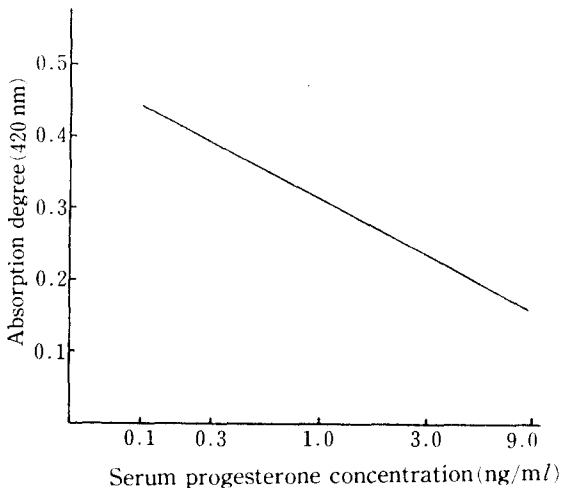


Fig. 2. Standard curve of progesterone EIA-kit

2) Progesterone의 radioimmunoassay

Progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷 結果와 radioimmunoassay(RIA)에 의해 測定한 血清內 progesterone 水準에 의한 妊娠診斷 結果를 比較 檢討하고자 RIA를 실시하였는데, 그 측정법은 Heap 등(1973)의 방법에 준하여 측정하였다.

3) 妊娠判定

Progesterone EIA-kit에 의해 測定한 血清內 1 ml 중의 progesterone 濃도에 의해 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.

III. 結果 및 考察

1. 非妊娠牛와 妊娠牛의 progesterone 水準

非妊娠牛 및 妊娠牛의 血清內 progesterone 濃度を 測定하여 妊娠診斷에 응용코져, 發情日 및 授精日과 發情 및 授精後 각각 3日, 5日, 10日, 15日, 19日 및 20~22日에 測定한 非妊娠牛 및 妊娠牛의 progesterone 濃度の 變化는 Fig. 3과 같다.

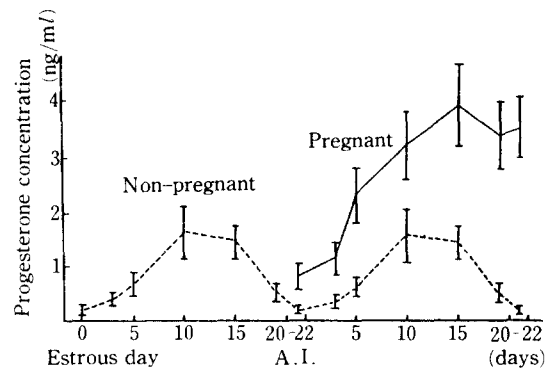


Fig. 3. Serum progesterone concentrations during the estrous cycle and early pregnancy

非妊娠牛의 血清內 progesterone 濃度は 發情後 3日에는 0.75 ± 0.07 ng/ml, 5日에는 1.41 ± 0.19 ng/ml로 增加하기 시작하여 10日과 15日에는 각각 3.17 ± 1.04 ng/ml, 3.04 ± 0.92 ng/ml로 높은 水準을 나타냈으나 그후 減少하기 시작하여 19日에는 1.04 ± 0.12 ng/ml, 다음 發情期의 20~22日에는 0.35 ± 0.06 ng/ml 수준이었다. 한편, 妊娠牛에 있어서는 授精後 3日에는 2.37 ± 1.07 ng/ml 수준이었으나 增加하기 시작하여 5日과 10日에는 각각 4.56 ± 1.42 ng/ml, 6.39 ± 1.76 ng/ml 수준이었으며 15日에는 7.73 ± 1.92 ng/ml 으로서 높은 水準을 나타냈으며, 그 이후 19日 및 20~22日에는 6.06 ± 2.04 ng/ml ~ 7.15 ± 2.32 ng/ml 수준이었다.

이러한 결과는 發情週期 및 妊娠初期중의 progesterone 濃도에 관한 여러 報告(Dobsen 등, 1975; Smith 등, 1975; Robertson, 1972; Laing과 Heap, 1971; Wettemann과 Hafs, 1973)와 절대수준의 차이는 인정되지만 變化傾向은 매우 類似하였다. 또한 發情週期中 血清內 progesterone 수준이 最高値를 나타내는 시기에 관하여 Dobsen 등

(1975)은 14日, Robertson(1972)은 13~14日, Wettemann 등(1972)은 11日이라고 報告하였는데 이 결과는 本試驗 결과와 대체로 類似한 結果로 생각된다.

2. Progesterone EIA-kit 에 의한 妊娠診斷

授精後 20~22日에 採血한 血液으로부터 얻은 血清에 progesterone 抗體를 感作시킨 固相 piece에 酵素標示抗原과 檢體중의 progesterone 을 競合시켜 基質을 分解 發色시켜 色調邊化의 관찰과 波長 420 nm의 分光光度計에서 比色 定量한 결과에 의한 妊娠診斷 성적과 直腸檢査에 의한 妊娠診斷 성적을 비교하여 妊娠與否를 診斷하였는 바, 그 결과는 Table 1과 같다.

Progesterone EIA-kit 에 의해 妊娠을 診斷한 결과 妊娠으로 判定된 乳牛는 26頭였으나, 直腸檢査에 의해 24頭가 妊娠으로 判定되었으므로 92.3%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 非妊娠으로 診斷된 乳牛는 20頭였으나 19頭가 直腸檢査 결과 非妊娠으로 判定되었으므로 95.0%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈다.

이러한 결과는 金 등(1989)이 乳汁을 이용하여 progesterone EIA-kit 에 의한 妊娠牛 및 非妊娠牛의 診斷結果인 91.6% 및 93.7%에 비해 다소 높은 성적이었다.

2. 血清內 progesterone 水準에 의한 妊娠診斷 血清內 progesterone 水準을 妊娠診斷에 응용코저

Table 1. 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	Doubtful	Light-yellow	
		Pregnancy	Doubtful	Non-pregnancy	
Pregnancy	No. of cows	24	1	1	26
	%	(92.3)	(3.9)	(3.9)	(100)
Non-pregnancy	No. of cows	1	.	19	20
	%	(5.0)	.	(95.0)	(100)
Total	No. of cows	25	1	20	46

Table 2. Serum progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant cows classified by various physiological condition

Condition	(Unit : ng/ml)	
	Pregnant	Non-pregnant
No. of cows	24	22
Total mean	2.40±0.34	1.03±0.09*
Milk yield		
<5,000 kg	2.12±0.27	1.01±0.12
≥5,000 kg	2.43±0.35	1.04±0.21
Calving		
<3 rd	2.63±0.41	1.28±0.21
≥4 th	2.25±0.30	1.03±0.07
Days from artificial insemination to return of estrus		
<60 days		0.89±0.16
61~90 days		1.12±0.23

* : Mean±Standard error.

Table 3. The accuracy of pregnancy diagnosis from serum progesterone concentrations at 20 to 22 days after artificial insemination

Result of rectal palpation		Limit level of pregnancy test (ng/ml)			Total
		<1.4	1.4-1.9	≥2.0	
		Non-pregnancy	Doubtful	Pregnancy	
Pregnancy	No. of cows	1	.	25	26
	%	(3.8)	.	(96.2)	(100)
Non-pregnancy	No. of cows	20	.	.	20
	%	(100)	.	.	(100)
Total	No. of cows	21	.	25	46

Table 4. Comparison of pregnancy diagnosis rate tested by EIA-kit of progesterone and concentrations of serum progesterone at 20 to 22 days after artificial insemination

Result of rectal palpation		Methods of pregnancy diagnosis		Total cows
		EIA-kit- of progesterone	Concentrations of serum progesterone	
Pregnancy	No. of cows	24	25	26
	%	(92.3)	(96.2)	(100)
Non-pregnancy	No. of cows	19	20	20
	%	(95.0)	(100)	(100)
Total	No. of cows	43	45	46

授精後 20~22 日의 血清內 妊娠牛 및 非妊娠牛의 平均 progesterone 水準은 각각 2.40 ± 0.34 ng/ml, 1.03 ± 0.09 ng/ml 이었다. 이때 血清內 progesterone 水準에 따른 妊娠與否를 결정하는 限界水準은 Table 2에서 보는 바와 같이, 妊娠牛에서는 2.0 ng/ml 以上, 非妊娠牛에서는 1.4 ng/ml 以下 수준이었으며, 이에 근거한 妊娠診斷 결과를 授精後 60~70 日에 실시한 直腸檢査 결과와 비교하여 分類한 바 그 결과는 Table 3과 같다.

血清內 progesterone 濃度에 의해 妊娠으로 規定한 限界水準인 2.0 ng/ml 以上에 속하는 乳牛는 25 頭였으나, 直腸檢査 결과 26 頭가 妊娠으로 判定되었으므로 96.2%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 非妊娠으로 規定한 限界水準인 1.4 ng/ml 以下에 속하는 乳牛는 20 頭였으나 直腸檢査 결과 20 頭가 非妊娠으로 判定되었으므로 100%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈다.

本 試驗의 결과는 Robertson 과 Sarda(1971), Wettemann 등(1972) 및 金(1984) 등이 각각 2.0 ng/ml~2.8 ng/ml 以上과, 1.0 ng/ml~2.0 ng/ml 以下를 각각 妊娠과 非妊娠으로 規定했을 때 94~100%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈다는 결과와 유사한 성적이었으며, 妊娠牛에서 보다 非妊娠牛의 진단성적이 더욱 정확하다고 報告한 점도 一致하였다.

4. 妊娠診斷法 檢討

乳牛의 血清內 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法으로서, progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷法과 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法을 비교한 成績은 Table 4와 같다.

乳牛의 妊娠診斷을 위해 progesterone EIA-kit에 의한 妊娠診斷 및 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷의 결과 妊娠牛의 경우 각각 92.3%, 96.2%, 非

妊娠牛의 경우 95.0%, 100% 로서 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法이 progesterone EIA-kit 에 의한 妊娠診斷法보다 약간 높은 成績이었으며, 두 方法 모두가 비교적 높은 妊娠診斷度를 나타냈으며, 특히 妊娠牛에서 보다 非妊娠牛에서 妊娠診斷 正確度가 높았다.

이러한 결과는, 金 등(1989)이 乳汁을 이용한 妊娠診斷에서 妊娠牛와 非妊娠牛에 있어 각각 91.6% 와 92.9%, 93.7% 와 100% 를 나타냈다는 報告에 비해 다소 높은 妊娠診斷 正確度를 나타냈다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, progesterone EIA-kit 에 妊娠診斷法은 早期에 妊娠을 진단할 수 있을 뿐만 아니라 正確도가 높은 妊娠診斷法으로 判定되었다. 특히 이 方法은 특별한 機械設備나 技術의 필요없이 간편하고 용이하게 早期에 正確하게 妊娠을 診斷할 수 있어 酪農家들이 현장에서 應用이 용이하여 勸奨할 만한 妊娠診斷法으로 思料된다.

IV. 摘 要

授精後 20~22 日에 血清을 이용한 progesterone EIA-kit 에 의해 妊娠을 診斷하고, 血清內 progesterone 濃度에 의해 妊娠을 診斷한 결과와 直腸檢査 결과와 比較하여 臨床的 應用性 與否를 檢討하기 위해 실시하였는 바 그 결과는 다음과 같다,

1. 授精後 20~22 日의 妊娠牛의 血清內 progesterone 의 濃度は $2.40 \pm 0.34 \text{ ng/ml}$ 로서 非妊娠牛의 $1.03 \pm 0.09 \text{ ng/ml}$ 보다 현저히 높았으며 黃體期에 는 높은 水準을 유지하였다.

2. 授精後 20~22 日에 progesterone EIA-kit 에 의해 妊娠을 診斷한 결과 妊娠 및 非妊娠牛는 각각 24 頭 및 19 頭였으나 直腸檢査에 의해 26 頭 및 20 頭가 妊娠 및 非妊娠으로 判定되어 92.3%, 95.0% 의 妊娠診斷 正確度를 얻을 수 있었다.

3. 授精後 20~22 日에 測定한 血清內 progesterone 濃度에 의해 妊娠을 診斷한 결과 妊娠診斷 限界 水準인 2.0 ng/ml 以上을 妊娠牛로, 1.4 ng/ml 以下를 非妊娠牛로 하였을 때 妊娠診斷 正確度は 96.2%와 100% 로서 妊娠牛에서 보다 非妊娠牛의 診斷에서 正確도가 높았다.

4. Progesterone EIA-kit 에 의한 임신진단법은 간편하고 용이할 뿐만 아니라 廉價로 早期에 妊娠을

診斷할 수 있으며 診斷正確度도 높아서 酪農家들에게 勸奨할 만한 妊娠診斷法으로 判定되었다.

V. 引用文獻

1. Dobsen, H., S. E. Midmer and R. J. Fitzpatrick. 1975. Relationship between progesterone concentrations in milk and plasma during the bovine oestrous cycle. *Vet. Rec.*, 96 : 222-223.
2. Heap, T. B., M. Gwyn, J. A. Laing and D. E. Walters. 1973. Pregnancy diagnosis in cows : Changes in milk progesterone concentrations during the estrous cycle and pregnancy measured by rapid radioimmunoassay. *J. Agric. Sci. Comb.*, 81 : 151-157.
3. Hoffmann, B., R. Hamburger, O. Gunzler, L. Korndorfer and H. Lohoff. 1974. Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow. *Theriogenology*, 2 : 21.
4. Laing, J. A. and R. B. Heap. 1971. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br. Vet. J.*, 127 : 19.
5. Plotka, E. D., R. E. Erb, C. J. Callahan and W. R. Gomes. 1967. Levels of progesterone in peripheral blood plasma during the estrous cycle of the bovine. *J. Dairy Sci.*, 50 : 1158.
6. Pope, G. S., I. Majzlik, P. J. H. Ball and J. D. Leaver. 1977. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *A. B. A.*, 45(1) : 50.
7. Robertson, H. A. 1972. Sequential changes in plasma progesterone in the cow during the estrous cycle, pregnancy at parturition and postpartum. *Can. J. Anim. Sci.*, 52 : 645-658.
8. Robertson, H. A. and I. R. Sarda. 1971. A very early pregnancy test for mammals : its application to the cow, ewe and sow. *J. Endocrinol.*, 49 : 407.
9. Smith, J. F., R. J. Fairclough, E. Payne and L. A. Pertson. 1975. Plasma hormone levels in the

- cow. (I). Changes in progesterone and oestrogen during the normal estrous cycle. *N.Z.J. Agr. Res.*, 18 : 123.
10. Wettemann, R. P. and H. D. Hafs. 1973. LH, prolactin, estradiol and progesterone in bovine blood serum during early pregnancy. *J. Anim. Sci.*, 36(1) : 51-56.
 11. Wettemann, R. P., H. D. Hafs, L. A. Edgerton and L. V. Swanson. 1972. Estradiol-17 and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 34(6) : 1020 - 1024.
 12. 岡田榮一, 山本英二. 1985. Enzymeimmunoassay(EIA)とよる牛血中 Progesterone 濃度の測定と早期妊娠診断への應用. *日本獸醫畜産學會誌*, 236~237.
 13. 金相根. 1984. 乳牛의 血清과 乳汁中の 호르몬 水準에 의한 妊娠診斷에 관한 研究. *大韓獸醫學會誌*, 24(1) : 120~125.
 14. 金敏奎, 申鉉朱, 李明憲, 李晚徽, 金相根. 1990. Progesterone EIA-kit 에 의한 乳牛의 妊娠診斷에 관한 研究. *大韓獸醫學會誌(投稿中)*.