

PIIMA PROGESTEROONISALDUSE MÄÄRAMISE IMMUNOENSÜMAATILISE JA RADIOIMMUNOLOOGILISE MEETODI VÕRDLUS JA NENDE KASUTAMINE LEHMADE SIGIMISSEISUNDI JÄLGIMISEKS

A. Waldmann, V. Passel

Piima progesteroonisisaldus peegeldab kollakeha funktsionaalsust. Progesterooni kõrge taseme korral on kollakeha aktiivne (luteaalfaas), madala taseme puhul mitte- või väheaktiivne (follikulaarfaas). Progesterooni määramine on üks kõige levinumaid hormoonanalüüse loomade reproduktiooni seisukorra uurimisel, samuti on see leidnud laialdast kasutamist karja taastootmise kiirendamisel. Nii on piima progesteroonisisalduse määramist kasutatud karja sigimisseisundi kontrollimiseks ja iseloomustamiseks (Hoffmann jt., 1976; Laitinen, 1983; Schopper jt., 1993), poegimisjärgse ovariaalse aktiivsuse taastumise kindlakstegemiseks ja iseloomustamiseks (Heinonen jt., 1988; Eldon, 1991), ovariaalsükli iseloomustamiseks (Rajamahendran, Taylor, 1990; Eldon, 1991), vaigse inna määramiseks (Schopper jt., 1993), innatunnuste kinnitamiseks (Van de Wiel jt., 1982), optimaalse seemendusaja valikuks ja seemendamise vältimiseks luteaalfaasis (Poulkes jt., 1982), seemendusprogrammis ilma inna avastamiseta koos prostaglandiini süstimisega (Elmore, 1987), seemendusjärgselt mittetiinete lehmade varaseks avastamiseks ja tiinuse diagnoosimiseks (Heap jt., 1976; Pennington jt., 1985; Worsfold jt., 1987), embrüonaalse suremuse kindlakstegemiseks (Bulman, Lamming, 1979; Butterfield, Lishman, 1988), ovariaalsüstide diferentseerimiseks ja endokriinse teraapia tulemuste hindamiseks (Nakao jt., 1992; Booth, 1988), sobivate embrüodonorite valikuks (Allen, Foote, 1988; Herrler, 1990). Kaasajal kasutatakse progesterooni kvantitatiivseks määramiseks peamiselt kahte meetodit: radioimmunoloogilist – RIA (Heap jt., 1976; Espinosa jt., 1984) ja immunoensümaatilist – EIA (Sauer jt., 1986; Stanley jt., 1986). Lisaks progesterooni määramise laborimeetoditele toodetakse erinevate firmade poolt ka kommertsiaalseid piima progesterooni määramise reaktiivide komplekte (Nebel, 1988). Meile on seni kättesaadavaks meetodiks olnud RIA, mille abil on ELVI-s piima progesteroonisisaldust pidevalt määratud alates 1985. aastast. Selle meetodi puuduseks on kallis aparatuur, radioaktiivsete isotoopide, antud juhul I^{125} lühike poolestusaeg, samuti küllaltki töömahukas ja kohmakas analüüsikäik. Praeguseks on välja töötatud kodumaine piima progesterooni määramise EIA meetod (Waldmann, 1993).

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda ELVI-s kasutusel oleva RIA meetodi ning väljatöötatud EIA meetodi järgmisi aspekte: 1) tööaja kulu analüüsi teostamiseks, 2) piimaproovi võtmise aja ja piima rasvasisalduse mõju progesteroonisisaldusele, 3) piima progesteroonisisalduse dünaamikat innatsükli jooksul, 4) meetodite omavahelist korrelatsiooni, 5) lehmade mittetiinestumise ja tiinestumise varajast diagnoosimist.

Materjal ja meetodid

Katsed korraldati 1991. a. septembris-novembris Tartu Riigimajandi Rahinge farmis. Piimaproovid (20 ml) koguti eesti mustakirjut ja eesti punast tõugu lehmadel järgmiselt: proovi võtmise aja ja rasvasisalduse mõju uurimiseks võeti piimaproovid jõudluskontrolli päeval eellüpsi-, kannu- ja järellüpsiimast. Piima progesteroonisisalduse dünaamika jälgimiseks, mittetiinestumise ning tiinestumise varaseks diagnoosimiseks järellüpsiimast. Kõik piimaproovid konserveeriti *Thimerosal*'i (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) lisamisega (0,05 %). Konserveeritud proovid säilitati temperatuuril 4° C ning progesteroonisisaldus määrati kuni 10 päeva jooksul pärast proovide võtmist. Osa proove külmutati ja säilitati temperatuuril -40° C kuni analüüsamiseni.

Analüüs

Piima progesteroonisisalduse radioimmunoloogiliseks (RIA) määramiseks kasutati kommertsiaalseid reaktiivide komplekte *Steron-PM- I^{125}* (*Valgevene TA Bioorgaanilise Keemia Instituut*), mis on mõeldud kuni 43 paralleelproovi progesteroonisisalduse määramiseks rasvases e. järellüpsi piimas. Proovid analüüsiti täpselt tootja instruksioone järgides. Impulsside arv loeti gamma-lugejal *Gamma-Trac 1290* (*Tracor Analytic, Elk Grove Village, IL*). Progesteroonisisaldus arvatati vastava arvutiprogrammiga, kasutades logit-log analüüsi. RIA testisisene ja testiväline variatsioon (CV) oli <15 %.

Käesolevas töös kasutatud immunoensümaatiline (EIA) meetod on erinevalt RIA-st mitteradioaktiivne mikrotiiterplaatidel põhinev tahke faasi süsteem, kus antikehana kasutatakse hiire progesteroonivastast monokloonset antikeha ning markerensüümina määrarõika peroksidaasi. Optilised tihedused mõõdeti automaatspektrofotomeetrite *MR-580* (*Dynatech, Aleksandria, VI, USA*) või *Twinreader Plus* abil (*Labsystems, Helsinki, Soome*), progesteroonisisaldus arvatati arvutiprogrammiga *Pro-Elisa* (koostatud M. Viikmaa poolt, TÜ ÜMPI), kasutades logit-log analüüsi. EIA testisisene ja testiväline variatsioon (CV) oli <10 %.

Piima rasvasisaldust mõõdeti ELVI piimaanalüüsides laboratooriumis analüsaatoriga *Milk-Scan 203* (*Foss-Electric, Hillerød, Taani*).

Katses olnud lehmad seemendas Tartu Riigimajandi seemendustehnik, tiinuse diagnoosis rektaalselt sama majandi loomaarst.

Statistiline analüüs tehti programmpaki *Statgraphics* (*STSC Inc, USA*) abil.

Tulemused

Tööaja kulu

Analüüsi etapid ja tööaja kulu ühele RIA komplektile ja EIA mikrotiiterplaadile on toodud tabelites 1 ja 2.

Tabel 1. Tööaja kulu RIA puhul / Time needed to perform RIA

Analüüsi etapid Experimental stages	Aeg (min.) Time (min)
1. Proovide lahjendamine / Dilution of milk samples	20
2. Reagentide ettevalmistamine analüüsiks / Preparation of reagents for analysis	10
3. Standardite, piimaproovide, antiseerumi ja märgistatud progesterooni pipeteerimine reaktsioonitubidesse / Pipetting of standards, milk samples, antiserum and tracer into reaction tubes	30
4. Inkubatsioon toatemperatuuril / Incubation at room temperature	120
5. Inkubatsioon jäävannis / Incubation in an ice bath	15
6. Sõe lisamine / Addition of charcoal	5
7. Inkubatsioon jäävannis / Incubation in an ice bath	10
8. Tsentrifugimine / Centrifugation	10
9. Supernatandi ümberpipeteerimine lugemistubidesse / Pipetting of supernatants into counting tubes	15
10. Proovide lugemine loenduris ja analüüs / Counting and sample analysis	25
43 paralleelproovi (üks komplekt) analüüsimiseks kuluv aeg Time required to analyse 43 samples (one kit) in duplicate	260
Ühe paralleelproovi analüüsimiseks kuluv aeg Time required to analyse one sample in duplicate	6,05

Tabel 2. Tööaja kulu EIA puhul / Time needed to perform EIA

Analüüsi etapid Experimental stages	Aeg (min.) Time (min)
1. Standardite ja proovide lahjendamine / Dilution of standards and milk samples	20
2. Antikehaga kaetud mikrotiiterplaadi pesemine / Washing of the antibody coated plate	2
3. Standardite, proovide ja konjugaadi pipeteerimine antikehaga kaetud mikrotiiterplaadi kannudesse / Pipetting of standards, samples and conjugate into the antibody coated wells	5
4. Inkubatsioon toatemperatuuril / Incubation at room temperature	30
5. Pesemine / Washing	2
6. Substraadi pipeteerimine kannudesse / Pipetting of substrate into wells	5
7. Inkubatsioon toatemperatuuril / Incubation at room temperature	30
8. Stoplahuse lisamine / Addition of stop solution	2
9. Optiliste tiheduste mõõtmine ja proovide analüüs / Measurement of optical densities and sample analysis	5
40 paralleelproovi (üks mikrotiiterplaat) analüüsimiseks kuluv aeg Time required to analyse 40 samples (one microplate) in duplicate	98
Ühe paralleelproovi analüüsimiseks kuluv aeg Time required to analyse one sample in duplicate	2,45

Proovi võtmise aja ja rasvasisalduse mõju piima progesteroonisisaldusele

Piimaproovid koguti 47-lt lehmalt eellüpsi-, kannu- ja järellüpsiimast, mille rasvasisalduseks mõõdeti vastavalt ($x \pm s$) 2,85±1,30, 4,65±0,80 ja 8,51±1,62 %. Proovide (konserveeritud) progesteroonisisaldust mõõdeti nii RIA kui ka EIA meetoditega. Piima rasvasisalduse ja piimaproovi võtmise aja mõju piima progesteroonisisaldusele selgitati regressioonanalüüsiga (tabel 3). Tabelist 3 on näha, et nii eellüpsi-, kannu- kui ka järellüpsiimast oli progesteroonisisaldus korrelatiivses seoses ($r=0,85...0,93$, $P<0,001$ ja

Tabel 3. 47 lehma eellüpsi-, kannu- ja järellüpsiimast progesteroonisisalduse vahelised korrelatsioonikordajad ja regressioonivõrrandid / Coefficients of correlation and regression equations between progesterone concentration in milk samples of 47 cows collected from fore milk, whole milk and postmilk strippings

	RIA eellüpsiim RIA fore milk (x)	RIA kannulüpsiim RIA whole milk (x)		EIA eellüpsiim EIA fore milk (x)	EIA kannulüpsiim EIA whole milk (x)
RIA järellüpsiim RIA postmilk strippings	$y=-1,33+2,12x$ $r=0,88^{***}$	$y=0,78+1,07x$ $r=0,93^{***}$	EIA järellüpsiim EIA postmilk strippings	$y=-0,12+1,67x$ $r=0,92^{***}$	$y=-0,66+0,96x$ $r=0,97^{***}$
RIA kannulüpsiim RIA whole milk	$y=-0,57+1,80x$ $r=0,85^{***}$		EIA kannulüpsiim EIA whole milk	$y=1,13+1,65x$ $r=0,90^{***}$	

*** $P<0,001$

$r=0,90-0,97$, $P<0,001$), vastavalt RIA või EIA-ga mõõtes. Et regressioonivõrrandi proportsionaalsuse koefitsient (b) peaks ideaali korral olema 1, siis saadud tulemused näitasid, et progesteroonisisaldus eellüpsiimas oli RIA -ga mõõtes keskmiselt 2,1 korda väiksem kui järellüpsiimas ja 1,8 korda väiksem, kui kannulüpsiimas. EIA-ga mõõtes saadi analoogne tulemus. Eellüpsiim sisaldas progesterooni 1,7 korda vähem kui järellüpsi- ning kannulüpsiim. Vaatamata olulisele ($P<0,001$) piima rasvasisalduse erinevusele kannu- ja järellüpsiimas, b väärtused nii RIA kui ka EIA puhul 1-st ei erinenud ($P>0,05$). Kannulüpsi- ja järellüpsiima progesteroonisisalduste absoluutväärtuste sarnasus ning tihedat korrelatsiooni näitavad, et analüüsiks sobib mõlema meetodi puhul nii kannu- kui ka järellüpsiim (joon. 1).

Progesteroonisisalduse dünaamika üksiklehmadel

Progesteroonisisalduse dünaamika 11 lehmale, mõõdetuna RIA ja EIA meetodiga, on kujutatud joonistel 2. Individuaalsetest progesteroonikõveratest on näha, et katse käigus esines 11 lehmale 15 follikulaarfaasi. Piima progesteroonisisaldus langes alla 5 ng/ml kõikides follikulaarfaasides, sõltumata inna tunnuste avaldumisest, ja oli >10 ng/ml kõikides luteaarfaasides. Katse käigus seemendati 9 lehma, neist tiinestus 3 (lehmad 7765, 6573, 7039). Kõikidel seemendatud lehmadel oli seemendamispäeval progesteroonisisaldus <5 ng/ml. Progesteroonikõveratest on näha, et kuuel juhul (40 %) jäi ind avastamata ning ka vastavad lehmad seemendamata.

Innatsükli pikkus

Keskmine innatsükli pikkus määrati 7 eesti punast tõugu lehmale, võttes mõõtmise aluseks progesteroonisisalduse 5 ng/ml. Innatsükli pikkuseks mõõdeti RIA ja EIA-ga vastavalt $22,44\pm 1,75$ ja $22,66\pm 1,84$ päeva. Follikulaarfaasis oli progesteroonisisaldus üle 5 ng/ml ($7,51\pm 0,86$ resp. $7,61\pm 1,03$ päeva), luteaarfaasis aga alla 5 ng/ml ($14,98\pm 1,25$ resp. $15,06\pm 2,17$ päeva).

Meetodite omavaheline korrelatsioon

Joonistelt 1A ja 1B on näha, et progesteroonisisalduse väärtused, mõõdetuna nii RIA kui ka EIA-ga, korreleerusid hästi lehmade reproduktiivse staatusega, olles madalad follikulaarfaasis ja kõrged luteaalfaasis ning tiinuse ajal. Meetodite omavahelise korrelatsiooni väljaselgitamiseks töödeldi 11 lehma piimaproovide progesteroonisisalduse andmeid regressioonanalüüsiga. Saadud regressioonikoefitsiendid näitasid meetodite vahelist tihedat korrelatsiooni iga looma puhul eraldi, korrelatsioonikordaja ulatus 0,823-st ($P<0,001$) kuni 0,981-ni ($P<0,001$) (tabel 4). Üheteistkümmel lehma piima progesteroonisisalduse andmete regressioonanalüüs näitas samuti meetoditevahelist tihedat seost ($r=0,894$, $P<0,001$) (joon. 3), kuid regressioonikordaja (b) näitas, et EIA-ga mõõdetud väärtused on võrreldes RIA-ga ligikaudu 1,37 korda suuremad ($P<0,001$).

Lehmade tiinestumise ja mittetiinestumise varajane diagnoosimine

Piimaproovid koguti 32 lehmale iga päev 19...24. seemendusjärgsel päeval. Progesteroonisisaldus määrati nii EIA kui ka RIA-ga. Lehmad loeti mittetiinesteks, kui piima progesteroonisisaldus oli alla 7 ng/ml, tiineks aga siis, kui see oli üle 10 ng/ml. Vahepealse progesteroonisisaldusega lehmad diagnoositi kahtlaseks.

Rektaalne analüüs, mis tehti 48...63. seemendusjärgsel päeval, näitas, et tiinestunud oli 7 lehma (21,9 %), ülejäänud 25 (78,1 %) aga mitte. Selgus, et piima progesteroonisisalduse järgi oli võimalik mittetiinestunud loomi avastada nii RIA kui ka EIA puhul 100 %-liselt, kõige täpsemad tulemused saadi RIA korral 23. ja 24. seemendusjärgsel päeval ning EIA puhul 22. päeval, vastavalt 58,3 % ja 70 %. Mittetiinestunud lehmade avastamise täpsus oli viimatinimetatud päeval nii RIA kui ka EIA puhul 72 % (25-st mittetiinest lehmast avastati 18). Kahtlase diagnoosiga lehma oli vastavalt 2 (6,85 %) ja 4 (12,5 %).

Joonis 1. Kannu ja järellüpsi piima progesteroonisisalduse seos määratuna RIA ja EIA meetodil (piima rasvasisaldus oli vastavalt $4,65 \pm 0,80$ ja $8,51 \pm 1,62$ %)

Figure 1. Relationship between the progesterone content of whole milk and postmilk strippings determined by the RIA and EIA methods (milk fat content was 4.65 ± 0.80 and 8.51 ± 1.62 %, resp.)

Joonis 2. Piima progesteroonisisalduse dünaamika mõõdetud RIA ($\Delta\Delta$) ja EIA ($\circ\circ$) meetodil. Noolega on näidatud seemendamise päev

Figure 2. Content of progesterone of milk determined by the RIA ($\Delta\Delta$) and EIA ($\circ\circ$) methods. Arrows denote day of insemination

Joonis 2 järg (seletus eelmisel lehel)

Figure 2 continuation (commentary on the previous page)

*Tabel 4. EIA ja RIA-ga määratud piima progesteroonisisalduse andmete omavaheline seos
Relationship between the data determined by two methods: EIA and RIA
(x=RIA, y=EIA, ng/ml)*

Lehma nr. No. of cows	Proovide arv (n) Number of samples (n)	Regressioonivõrrand / Regression equation		Korrelatsiooni- kordaja (r)
		vabaliige (a) intercept (a)	regressiooni- kordaja (b) slope of regression line (b)	Correlation coefficient (r)
7430	22	-2,264*	1,683***	0,981
7615	31	0,226	1,281***	0,864
8356	30	1,073	1,719***	0,956
5178	24	-2,862**	1,704***	0,960
5927	29	-3,078***	1,095***	0,955
8106	29	-2,633***	1,445***	0,954
8650	24	-0,964	1,328***	0,980
8499	27	-0,619	1,706***	0,876
7765	30	0,536	1,419***	0,823
6573	28	-1,274	1,243***	0,956
7039	28	0,957	1,019***	0,840

Tabelis toodud arv erineb nullist (vabaliige) või ühest (regressioonikordaja) oluliselt / The number given in the table differs from zero (intercept) or 1 (slope) significantly

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

Joonis 3. Eri meetoditega määratud piima progesteronisisalduse seos (x-väärtused on saadud RIA, y-väärtused EIA meetodil)

Figure 3. Relationship between the progesterone content of milk determined by two methods (x – by RIA, y – by EIA)

Mittetiinestunud lehmade paremaks avastamiseks ja tiinuse diagnoosimise täpsuse suurendamiseks kasutati paarisproovide analüüsi. Paarisproovideks olid vastavalt 19. ja 24., 19. ja 23., 20. ja 24. ning 20. ja 23. seemendusjärgsel päeval võetud proovid. Lehmad loeti

mittetiineks, kui ühe paari ühes või mõlemas proovis jäi progesteroonisisaldus alla 7 ng/ml. Lehmadiagnositi tiineks, kui ühe paari mõlema proovi progesteroonisisaldus oli üle 10 ng/ml, ja kahtlaseks, kui ühe paari ühe või mõlema proovi progesteroonisisaldus oli üle 7 ja alla 10 ng/ml. Paarisproovide analüüsi korral saadi kõige täpsemad tulemused siis, kui proovid koguti 19. ja 24. ning 19. ja 23. seemendusjärgsel päeval. Paarisproovide analüüsi korral suurenes mittetiinestunud lehmade avastamise tundlikkus RIA korral 80 %-ni (25-st mittetiinest lehmast avastati 20) ning EIA puhul 92 %-ni (avastati 23 mittetiinet lehma). Tiinuse diagnoosimise täpsus suurenes RIA korral 70 %-ni ja EIA puhul 87,5 %-ni. Kahtlase diagnoosiga lehmade arv RIA puhul ei muutunud, EIA puhul aga vähenes 3,1%-ni.

Analüüsitulemuste arutelu

Käesolevast tööst selgus, et mõlemad meetodid sobivad piima progesteroonisisalduse kvantitatiivseks määramiseks, kuid EIA omab teatud eeliseid RIA ees. Üheks peamiseks plussiks EIA puhul võrreldes RIA-ga on radioaktiivse isotoobi asemel markerensüümi kasutamine. EIA eeliseid RIA ees seoses kasutatava markerensüümi käsitleb üksikasjalikult Tijssen (1985). Lühidalt: ensüüm tagab kõrge tundlikkuse ning spetsiifika, aparatuur on suhteliselt odav, analüüs on kiire ning teostatav välitingimustes, puudub radiatsioonihoi, reaktiivid on suhteliselt odavad ning stabiilsed. Teiseks EIA eeliseks on antikehaga seondunud ja seondumata kompleksi eraldamise viis. Kasutatud RIA on vedel-faasi meetod, mis tähendab, et antikehaga seondumata vaba ja märgistatud progesteroon eraldatakse antikehaga seondunud progesteroonist aktiivsõe ja tsentrifuugimisega. Kasutatud EIA meetodi puhul on progesteroonispetsiifilised antikehad kinnitatud tahkele pinnale (mikrotiiterplaadi kannud), mis võimaldab antikehaga seondumata kompleksi seondunust kiirelt eraldada, selle lihtsalt maha pestes. Seega mikrotiiterplaatidel põhineva EIA teostamiseks ei ole vaja tsentrifuugimist. Ka reagentide analüüsiks ettevalmistamise ning immuunreaktsiooni aeg on EIA puhul lühem kui RIA korral. Kokkuvõttes kulub EIA puhul ühe paralleelproovi analüüsimiseks 2,5 korda vähem aega kui RIA-t kasutades.

Veres tsirkuleeriv progesteroon läbib mammosüüte difusiooni teel ning tänu rasva lahustuvusele akumuleerub piimarasva. Heapi jt. (1975) andmetel on 80 % piima progesteroonist seotud piima rasvaga, 19 % valkudega ning vähem kui 1 % on seondumata progesteroon. Kuna on teada, et piima rasvasisaldus, seega ka progesteroonisisaldus, sõltub mitmetest teguritest (piimaproovi võtmise ajast, lüpsi täielikkusest, lüpsmise intervallist), siis on piima rasvasisalduse ja piimaproovi võtmise aja mõju progesteroonile uurinud mitmed autorid (Ginther jt., 1976; Heap jt., 1979; Pope jt., 1976; Gowan, Etches, 1979; Holdsworth jt., 1980; Pennington jt., 1981; Laitinen, 1983; Chandrasekaran, 1991). Üldiselt on RIA-ga mõõtes eellüpsi piima progesteroonisisaldus oluliselt väiksem kannulüpsi piima omast (Heap jt., 1976; Pope jt., 1976; Holdsworth jt., 1980; Pennington jt., 1981; Laitinen, 1983; Chandrasekaran, Rao, 1991), kuid vaatamata piima rasvasisalduse olulisele erinevusele kannulüpsi- ja järellüpsi piima vahel, on vastavate piimafraktsioonide progesteroonisisaldustes saadud vasturääkivaid tulemusi. Osa autorite järgi (Pope jt., 1976; Laitinen, 1983; Chandrasekaran jt., 1991) on RIA-ga mõõtes järellüpsi piima progesteroonisisaldus oluliselt suurem kannulüpsi piima omast, teiste järgi (Dobson jt., 1976; Drendel jt., 1977; Pennington jt., 1981) aga mitte. Kirjanduses on vähe andmeid piima rasvasisalduse mõjust tahke faasi EIA meetoditele. Stanley jt. (1986) andmetel mõjutas piima rasvasisaldus EIA meetodiga mõõdetud progesteroonisisaldust vähem kui RIA-ga mõõtes. Footi (1988) järgi oli mikrotiiterplaatidel põhineva reaktiivide komplektiga *Enzygnost* määratud eellüpsi piima progesteroonisisaldus umbes kaks korda väiksem kui kannulüpsi piima progesteroonisisaldus, kuid järellüpsi piima progesteroonisisaldus ei erinenud kannulüpsi piima omast. Käesoleva töö tulemustest selgus, et piimaproovi võtmise aeg ja piima rasvasisaldus mõjutasid progesteroonisisaldust nii RIA kui EIA puhul ühtemoodi. Eellüpsi piima rasva- ja progesteroonisisaldus erines oluliselt ($P < 0,001$), kannulüpsi piima rasva- ja progesteroonisisaldusest, kuid kannu- ja järellüpsi piima progesteroonisisaldus üksteisest ei erinenud ($P > 0,05$), ehkki rasvasisaldus oli erinev ($P < 0,001$). Erinevad tulemused piimaproovi võtmise aja ning rasvasisalduse mõjust progesteroonisisaldusele näitavad, et piimarasv mõjutab erinevaid määramismeetodeid erinevalt. Arvatavasti meetodid, mille puhul järellüpsi piima progesteroonisisaldus ei erine kannulüpsi piima omast, määravad põhiliselt rasvaga

seondumata progesterooni ja on seega rasva suhtes vähem tundlikud kui need meetodid, millega määrates järellüpsiima progesteroonisisaldus on suurem kannulüpsiima omast. Progesteroonisisalduse erinevus eellüpsi- ja kannulüpsiima vahel (määratud rasva suhtes vähetundlike meetoditega) ei ole tingitud vastavate piimafraktsioonide erinevast rasvasisaldusest, vaid piimaproovi päritolust (tsisternaalne piim vs. alveolaarne piim) (Waldmann, avaldamata andmed). Seda kinnitavad Nachreineri jt. (1992) andmed, kes näitasid, et ka kooritud piima progesteroonisisaldus on eellüpsiimas oluliselt madalam kui lüpsi keskel võetud piimas.

Erinevad tulemused piimaproovi võtmise aja ning rasvasisalduse mõjust progesteroonisisaldusele näitavad, et iga uue määramismeetodi kasutuselevõtul on otstarbekas selgitada piima rasvasisalduse ning piimaproovi võtmise aja mõju progesteroonisisaldusele.

EIA ja RIA-ga määratud piima progesteroonisisaldus korreleerus lehmade reproduktiivse staatusega, olles suur luteaalfaasis ja tiinuse ajal ning väike follikulaarfaasis (joon. 2A ja 2B). Mõõdetud ovariaalsükli olid veidi pikemad ($22,4 \pm 1,8$ ja $22,7 \pm 1,8$ päeva vastavalt RIA ja EIA-ga mõõtes) enamiku autorite poolt saadud tulemustest (keskmine 21 päeva) (Asdell jt., 1949; Olds, Seath, 1951; Morrow jt., 1969). Viimasel ajal kirjanduses avaldatud andmed progesteroonisisalduse mõõtmise alusel saadud ovariaalsükli pikkuse kohta on vasturääkivad. Savio jt. (1990) mõõtsid poegimisjärgselt esimesele ovariaalsükli järgnenud innatsükli keskmiseks pikkuseks $23 \pm 2,1$ päeva. Rajamahendrani jt. (1990) järgi oli poegimisjärgselt teise ovariaalsükli keskmiseks pikkuseks 24 ± 6 päeva. Seevastu on Eldoni (1991) andmetel Islandi piimalehmadel poegimisjärgselt teise ovariaalsükli pikkus $20,1 \pm 2,8$ päeva ning poegimisjärgselt kolmanda ovariaalsükli pikkus $20,9 \pm 2,5$ päeva. Eespoolnimetatud autorite poolt saadud ovariaalsükli pikkuste keskmiste erinevuste analüüs näitas, et Islandi lehmade ovariaalsükli olid lühemad Iirimaa peetavate friisi tõugu lehmade kui ka Kanadas (British Columbia) peetavate holsteini ja äärširi tõugu lehmade ovariaalsükli (P<0,05). Eesti punast tõugu lehmade ovariaalsükli on eelmiste-ga võrreldes vahepealse pikkusega. Nendele andmetele toetudes võib väita, et ovariaalsükli pikkus võib olla erinevates populatsioonides erinev.

Mõlema meetodiga mõõdetud progesteroonisisaldus korreleerus omavahel hästi (tabel 4, joon. 3), kuid EIA mõõdab progesterooni väärtusi mõneti kõrgemalt kui RIA. Selline erinevus võib olla tingitud standardite valmistamise erinevusest (Stanley jt., 1986; Küstler jt., 1987; Waldmann, 1993), erinevusest antikehade spetsiifikas (Stanley jt., 1986; Waldmann, 1993) või meetodi tüübist (tahkefaasi meetod vs. vedelfaasi meetod) (Stanley, jt., 1986). Olenemata progesteroonisisalduste absoluutväärtuste erinevuse põhjustest, võimaldab absoluutväärtuste suurem vahe EIA puhul madalaid progesteroonisisaldusi kõrgetest paremini diferentseerida.

Lehmade tiinestumist diagnoositi karja reproduktsiooni seisukohalt halvades tingimustes. Vaatamata väga halvale tiinestumisele (21,9 %) oli mittetiinete lehmade avastamise täpsus ühe piimaproovi alusel nii RIA kui ka EIA puhul 100 %, kuid tiinete loomade avastamise täpsus (58,3 % ja 70 % vastavalt RIA ja EIA puhul) on kirjanduses avaldatud (Müller, 1987) keskmistest tulemustest (umbes 80 %, ulatus 45...100 %) väiksem. Valediagnoosi põhjustena on nimetatud embrüonaalset suremust, mida erinevate autorite järgi esineb pärast 24. seemendusjärgset päeva 8,7...15,2 % lehmadel (Bulman, Lamming, 1979; Drew jt., 1986; Butterfield, Lishman, 1988), seemendamist luteaalfaasis (Hoffmann jt., 1976; Oltner, Edqvist, 1981; Reimers jt., 1985), keskmisest pikemaid või lühemaid innatsükli (Pope jt., 1976). Paarisproovide analüüs suurendas nii RIA kui ka EIA puhul tunduvalt mittetiinete lehmade avastamist ja tiinuse diagnoosimise täpsust. EIA puhul vähenes ka kahtlase diagnoosiga lehmade arv. Ühe piimaproovi progesteroonisisalduse alusel teostatud tiinuse diagnoosimise suhteliselt tagasihoidlik täpsus ning selle oluline suurenemine paarisproovide analüüsi korral on arvatavasti tingitud lehmade mitteõige-aegsest seemendamisest. Seda oletust kinnitab ka väga madal tiinestumise protsent (21,9). Progesteroonitesti kasutamise väärtus mittetiinestunud lehmade avastamise seisukohalt oli järgmine: progesteroonitesti diagnoositi paarisproovide alusel mittetiineks 20 resp. 23 (RIA ja EIA-ga mõõtes) lehma. Tegelikult avastati ja seemendati järgneva inna ajal ümber 9 lehma. Progesteroonitesti kasutamine võimaldas käesolevas katses lisaks ümberseemendatud 9 lehmale varakult avastada veel 11 resp. 14 (RIA resp. EIA) mittetiinet looma.

Järeldused

1. Käesolevas töös kasutatud RIA ja EIA meetodid sobivad mõlemad piima progesteroonisisalduse kvantitatiivseks määramiseks.
2. EIA on RIA-st vähem töömahukas ja kiirem, ühtlasi on see kasutamiseks mugavam.
3. Piimaproovi võtmise aeg ja piima rasvasisaldus mõjutavad nii RIA kui ka EIA-ga mõõdetud progesteroonisisaldust ühtemoodi, mõlema meetodi puhul sobib analüüsimiseks nii kannu- kui ka järellüpsipiim.
4. Iga uue piimaprogesterooni määramismeetodi kasutuselevõtul on otstarbekas selgitada piima rasvasisalduse ning piimaproovi võtmise aja mõju progesteroonisisaldusele.
5. Paarisproovide analüüs suurendab nii RIA kui ka EIA puhul oluliselt tiinuse diagnoosimise täpsust.
6. Lehmade ovariaaltsükliid võivad erinevates lehmapiimatsoonides olla erineva pikkusega.

Kirjandus

- Allen, S. E., Foote, R. H. An enzyme-linked immunoassay of milk progesterone as a diagnostic aid in embryo transfer programs. - *Theriogenology*, vol. 29, p. 893...903, 1988.
- Asdell, S. A., de Alba, J., Roberts, S. G. Studies on the estrous cycle of dairy cattle. - *Cornell Vet.*, vol. 39, p. 389...402, 1949.
- Booth, J. M., Davies, J., Holdsworth, R. J. Use of the milk progesterone test for pregnancy determination. - *Br. Vet. J.*, vol. 135, p. 478...488, 1979.
- Booth, J. M. The milk progesterone test as an aid to the diagnosis of cystic ovaries in dairy cows. - *Vet. Rec.*, vol. 123, p. 437...439, 1988.
- Bulman, D. C., Lamming, G. E. Milk progesterone in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. - *J. Reprod. Fert.*, vol. 54, p. 147...158, 1978.
- Butterfield, W. A., Lishman, A. W. Embryo mortality and early post-oestrus cycle embryonic death estimated from oestrous cycle lengths and milk progesterone analysis. - *S. Afr. J. Anim. Sci.*, vol. 18, p. 79...82, 1988.
- Chandrasekaran, S. K., Rao, R. G. Correlation between progesterone and fat content in different fractions of milk from crossbred cows. - *Indian Vet. J.*, vol. 68, p. 1094...1095, 1991.
- Dobson, H., Fitzpatrick, R. G. Clinical application of the progesterone-in-milk test. - *Br. Vet. J.*, vol. 132, p. 538...542, 1976.
- Drendel, T. R., Spahr, S. L., Johnson, R. V., Davis, C. L. Progesterone in milk strippings as a reproductive management aid. - *J. Dairy Sci.*, vol. 60, (Suppl. 1), p. 44, 1977.
- Eldon, J. Post-partum and post-conceptional ovarian activity of dairy cows: evaluation based on progesterone profiles. - *Acta Vet. Scand.*, vol. 32, p. 377...386, 1991.
- Elmore, R. G. Breeding cows without estrous detection. - *Bovine Proc.*, vol. 19, p. 112, 1987.
- Espinosa, J., Botana, L. M., Puentes, E., Regueiro, B. J. Milk progesterone radioimmunoassay using radioiodinated tracers: a rapid and reliable assay system. - *Steroids*, vol. 44, p. 217...229, 1984.
- Foote, R. H., Oltenacu, E.A.B., Kummerfeld, H. L., Smith, R. D., Riek, P. M., Braun, R. K. Milk progesterone as a diagnostic aid. - *Br. Vet. J.*, vol. 135, p. 550...558, 1979.
- Foote, R. H. Using rapid progesterone assay in embryo transfer programs. - *Vet. Med.*, vol. 83, p. 617...620, 1988.
- Foulkes, J. A., Cookson, A. D., Sauer, M. J. AI in cattle based on daily microtitre plate enzymeimmunoassay of progesterone in whole milk. - *Br. Vet. J.*, vol. 138, p. 515...521, 1982.
- Ginther, O. J., Nuti, L. C., Garcia, M. C., Wentworth, B. C., Tyler, W. T. Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products. - *J. Anim. Sci.*, vol. 42, p. 155...159, 1976.

- Gowan, E. W., Etches, R. J. A solid phase radioimmunoassay for progesterone and its application to pregnancy diagnosis in the cow. - *Theriogenology*, vol. 12, p. 327...343, 1979.
- Heap, R. B., Henville, A., Linzell, J. L. Metabolic clearance rate, production rate, and mammary uptake and metabolism of progesterone in cows. - *J. Endocr.*, vol. 66, p. 239...247, 1975.
- Heap, R. B., Holdsworth, R. J., Gadsby, J. E., Laing, J. A., Walters, D. E. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. - *Br. Vet. J.*, vol. 132, p. 445...464, 1976.
- Heinonen, K., Rantasalmi, K., Alanko, M. Milk progesterone samples identifying cycling dairy cows. - *Acta Vet. Scand.*, vol. 29, p. 245...248, 1988.
- Herrler, A., Elsaesser, F., Niemann, H. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. - *Theriogenology*, vol. 33, p. 415...422, 1990.
- Hoffmann, B., Günzler, O., Hamburger, R., Schmidt, W. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany. - *Br. Vet. J.*, vol. 132, p. 469...475, 1976.
- Holdsworth, R. J., Booth, J. M., Sharman, G. A. M., Ratty, E. A. S. Measurement of progesterone levels in whole and fore-milk from dairy cows. - *Br. Vet. J.*, vol. 136, p. 546...552, 1980.
- Küster, J., Losert, J., Landmann, D., Holtz, W. Milchprogesteron-Bestimmung mit dem Enzymimmunoassay auf Mikrotiterplatten verschiedener Hersteller. - *Zuchthyg.*, vol. 22, S. 247...252, 1987.
- Laitinen, J. Oestrus conformation, pregnancy diagnosis and postpartum ovarian follow up of the Finnish dairy cows by milk progesterone assay: effects of breed, season, feed and sampling on milk progesterone levels. - *Publications of the University of Kuopio, Natural Sciences, Series Original Reports 1, 1983.* - 110 p.
- Morrow, D. A., Roberts, S. J., McEntee, K. Post partum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in dairy cattle. I. Ovarian activity. - *Cornell Vet.*, vol. 59, p. 173...190, 1969.
- Müller, M. Anwendung eines Milchprogesterondirekttestes (EIA) zur Überwachung des Fruchtbarkeitsstatus von Milchkühen im Rahmen des Fertilitätsdienstes der Zucht- und Besamungsgenossenschaft Rheinland e. G. - *Doktordissertation Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn, 1987.*
- Nachreiner, R. F., Oschmann, S. J., Edqvist, L. E., Richards, J. I. Factors affecting skim milk progesterone assay results. - *Am. J. Vet. Res.*, vol. 53, p. 1085...1089, 1992.
- Nakao, T., Harada, A., Nakao, S., Moriyoshim, A., Kawata, K. Diagnosis of ovarian follicular cysts in cows by milk progesterone test and therapeutic effect of Fenprostalene 14 days after fertirelin acetate. - *Proc. 12-th International Congress on Animal Reproduction. The Hague, the Netherlands, Aug. 23rd - Aug. 27th, vol. 1,* p. 78...80, 1992.
- Nebel, R. L. On-farm milk progesterone tests. - *J. Dairy Sci.*, vol. 71, p. 1682...1690, 1988.
- Olds, D., Seath, D. M. Repeatability of the oestrous cycle length in dairy cattle. - *J. Dairy Sci.*, vol. 34, p. 626...632, 1951.
- Oltner, R., Edqvist, L. E. Progesterone in defatted milk: its relation to insemination and pregnancy in normal cows as compared with cows on problem farms and individual problem animals. - *Br. Vet. J.*, vol. 137, p. 78...87, 1981.
- Pennington, J. A., Spahr, S. L., Lodge, J. R. Influences on progesterone concentrations in bovine milk. - *J. Dairy Sci.*, vol. 64, p. 259...266, 1981.
- Pennington, J. A., Schultz, L. H., Hoffman, W. F. Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and 24 post breeding: field study in dairy cattle. - *J. Dairy Sci.*, vol. 68, p. 2740...2745, 1985.
- Pope, G. S., Majzlik, I., Ball, P. J. H., Leaver, J. D. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. - *Br. Vet. J.*, vol. 132, p. 497...506, 1976.
- Rajamahendran, R., Taylor, C. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. - *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 22, p. 171...180, 1990.

- Reimers, T. J., Smith, R. D., Newman, S. K. Management factors affecting reproductive performance of dairy cows in the northeastern United States. - *J. Dairy Sci.*, vol. 68, p. 963...972, 1985.
- Sauer, M. J., Foulker, J. A., Worsfold, A., Morris, B. A. Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre-plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle. - *J. Reprod. Fertil.*, vol. 76, p. 375...391, 1986.
- Savio, J. D., Boland, M. P., Roche, J. F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. - *J. Reprod. Fert.*, vol. 88, p. 581...591, 1990.
- Schopper, D., Schemer, R., Weiler, U., Claus, R. Einfluss der Milchleistung auf Fruchtbarkeitskriterien der Milchkuh post partum: Auswertung von Progesteronprofilen. - *Reprod. Dom. Anim.*, vol. 28, p. 225...235, 1993.
- Stanley, C. J., Paris, F., Webb, A. E., Heap, R. B., Ellis, S. T., Hamon, M., Worsfold, A., Booth, J. M. Use of a new and rapid milk progesterone assay to monitor reproductive activity in the cow. - *Vet. Rec.*, vol. 118, p. 664...667, 1986.
- Tijssen, P. Practice and theory of enzyme immunoassays. - *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*; vol. 15, Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier Sci. Publ., 1985. - 54 p.
- Van de Wiel, D. F. M., Kamonpatana, M., Ngramsurijaroy, C., Koops, W., Singhajan, S. Enzymeimmunoassay of milk progesterone: its application to oestrus conformation and early pregnancy diagnosis in cattle. - *Vet. Quart.*, vol. 4, p. 72...78, 1982.
- Waldmann, A. Enzyme immunoassay (EIA) for milk progesterone using a monoclonal antibody. - *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 34, p. 19...30, 1993.

COMPARISON OF A MILK PROGESTERONE ENZYMEIMMUNOASSAY AND A RADIOIMMUNOASSAY TO MONITOR REPRODUCTIVE STATUS IN THE COW

A. Waldmann, V. Passel

This study investigated both the validity and practicability of a direct monoclonal antibody based milk progesterone enzymeimmunoassay (EIA) used to monitor reproductive activity in the cow, compared to a commercial radioimmunoassay (RIA). The results obtained show that EIA is much easier to perform and gives results within 1.5 h. The influence of the type of milk or milk fat on progesterone concentrations was similar for both assays. Progesterone concentrations measured from the milk samples of 47 cows, collected from fore-milk, whole milk and postmilk strippings, correlated highly ($r=0.85...0.93$; $P<0.001$ and $r=0.90...0.97$; $P<0.001$) when measured by RIA and EIA, respectively. The slopes of the regression lines indicated that progesterone concentrations were lower ($P<0.001$) in foremilk than in whole milk and postmilk strippings. Absolute progesterone values in samples collected from whole milk and from postmilk strippings did not differ, although the milk fat concentrations of these milk fractions were different ($P<0.001$). Milk progesterone concentrations measured in 11 cows sampled daily correlated well with the reproductive status of individual animals being low in the follicular phase and high during the luteal phase and pregnancy. The regression coefficients obtained showed a strong correlation between EIA and RIA for each animal, with coefficients ranging from 0.82 ($P<0.001$) to 0.98 ($P<0.001$) for individual cows. The correlation coefficient between the two methods for all 11 cows was 0.89 ($P<0.001$), but EIA showed higher progesterone values than RIA. The average oestrous cycle length measured in Estonian Red Breed dairy cows was (mean \pm SD) 22.44 \pm 1.75 and 22.66 \pm 1.84 days as determined by RIA and EIA, respectively. Both RIA and EIA provided 100 % accuracy in assessment of non pregnancy status by measurement of progesterone in samples collected at 19...24 days after insemination. The highest accuracy for pregnancy diagnosis (58.3 and 70 % for RIA and EIA respectively) was obtained by analyzing milk

samples collected on days 23 or 24 after insemination for RIA and on day 22 for EIA. Pregnancy diagnosis was improved to 70 % and 87.5 % (for RIA and EIA respectively) by the measurement of progesterone in paired milk samples collected on days 19 and 23 or days 19 and 24 after insemination.

СРАВНЕНИЕ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА В МОЛОКЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ИХ ДЛЯ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫМ СТАТУСОМ КОРОВ

А. Вальдман, В. Пассел

Резюме

Была изучена пригодность и возможность практического применения прямого (безэкстрационного) иммуноферментного анализа (ИФА), базирующего на моноклональном антителе, по сравнению с коммерческим радиоиммунологическим методом (РИА) для наблюдения воспроизводительной активности у коров. Полученные результаты свидетельствуют о том, что методом ИФА ход анализа значительно проще и результаты получаются быстрее в течение 1,5 часа. Влияние типа (фракции) молока или молочного жира на концентрацию прогестерона было сходным при обоих методах определения. Концентрации прогестерона в пробах молока, взятых из первых струек, из основной дойки и из последойки, коррелировались высоко ($r=0.85...0.93$; $P<0.001$ и $r=0.90...0.97$; $P<0.001$) при определении соответственно методами РИА и ИФА. Концентрация прогестерона была ниже ($P<0.001$) в первых струек, чем в молоке от основной дойки и от последойки. Абсолютные концентрации прогестерона в пробах от орновной дойки и от последойки не отличались, хотя концентрация молочного жира в этих фракциях молока была различной ($P<0.001$). Содержание прогестерона, ежедневно определенное у 11 коров, хорошо коррелировалось с репродуктивным статусом каждого животного, являясь низкой в фолликулярной фазе и высокой в течение лютеальной фазы и стельности. Полученные коэффициенты корреляции свидетельствовали о тесной связи ИФА и РИА для каждого животного, колеблясь от 0,82 ($P<0.001$) до 0,98 ($P<0.001$) по отдельным коровам. Коэффициент корреляции результатов от всех 11 коров составил 0,89 ($P<0.001$), но ИФА дал более высокие показатели прогестерона по сравнению с РИА. Средняя длительность овариального цикла составляла (средняя \pm SD) соответственно $22,4\pm 1,75$ и $22,66\pm 1,84$ дня при определении РИА и ИФА. Как РИА, так и ИФА позволяли с 100 % точностью определить нестельный статус животного, прогестерона применяя молоко, собранное на 19...24-й день после осеменения. Найвысшая точность определения стельности (58,3 % и 70 % соответственно для РИА и ИФА) была достигнута анализами проб молока, собранных на 23 или 24-й день после осеменения для РИА и на 22-й день для ИФА. Улучшение определения стельности до 70 % и 87,5 % соответственно для РИА и ИФА было достигнуто определением прогестерона в повторных молочных пробах, взятых на 19 и 23-й день, или на 19 и 24-й день после осеменения.