

NGHIÊN CỨU SO SÁNH HÀM LƯỢNG PROGESTERONE BẰNG KỸ THUẬT EIA TRONG SỮA VÀ HUYẾT TƯƠNG Ở BÒ SỮA THEO CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ MẪU KHÁC NHAU

*Phan Văn Kiêm^{*1}, Tăng Xuân Lưu² và Nguyễn Quý Quỳnh Hoa¹.*

¹Bộ môn Sinh sản & thụ tinh nhân tạo; ²Trung tâm NC bò và đồng cỏ Ba Vì

*Tác giả đề liên hệ: TS. Phan Văn Kiêm, Trưởng Bộ môn SS & TTNT, Viện Chăn nuôi

ĐT: 844 8385 940; Fax: 844 8 389 775; E- mail: kiempv@yahoo.com

ABSTRACT

Comparison of Progesterone concentration in milk, serum of dairy cattle using EIA with different sample treatment methods

This study was conducted to compare the effectiveness of the methods determining P4 concentration in milk and blood serum with different treatments. The results showed that there was a different P4 concentration in whole milk and skim milk, but there was no different in two types of blood serum treatments. In conclusion, both two methods of sample treatment can be used for early pregnancy diagnosis in cattle.

Key words: *Progesterone concentration, EIA, milk, serum, dairy cattle*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Một trong các biện pháp kỹ thuật để góp phần kiểm tra và đánh giá thực trạng tình hình sinh sản của đàn bò sữa đã và đang được áp dụng ở nhiều nước trên thế giới là kỹ thuật EIA để định lượng Progesterone (EIA-P₄) trong sữa hoặc huyết tương. Đây là kỹ thuật có thể xác định nhanh, chính xác tình trạng hoạt động của buồng trứng và các trường hợp chậm sinh do buồng trứng gây ra: buồng trứng kém phát triển (Nakao và cs., 1983), buồng trứng có thể vàng, u nang (Phan Văn Kiêm và Nguyễn Quý Quỳnh Hoa (2003). Ngoài ra kỹ thuật EIA- P₄ còn có thể tiến hành trên phân. (Isobe và cs., 2005). Đây là cơ sở để đưa ra các biện pháp xử lý có hiệu quả, góp phần nâng cao năng suất sinh sản ở bò sữa. Nhằm tìm ra phương pháp định lượng P₄ có độ chính xác cao, dễ áp dụng phù hợp với điều kiện chăn nuôi ở Việt Nam, đề tài tiến hành với mục đích tìm ra phương pháp xử lý mẫu thích hợp trên sữa và huyết tương trong việc định lượng P₄ ở bò sữa

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm tiến hành trên bò lai hướng sữa F₂, F₃ có khối lượng trên 300kg, đã đẻ 1-2 lứa và không mắc bệnh đường sinh dục

Phương pháp lấy mẫu

Các mẫu máu và sữa lấy vào ngày: động dục & phối giống (ngày 0), các mẫu sau lấy vào ngày 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 và 24 sau phối.

+ Cách lấy mẫu máu (huyết tương): Các mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch cổ hoặc đuôi vào ống nghiệm có tráng Heparine, ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút và tách lấy huyết tương.

+ Cách lấy mẫu sữa: Các mẫu sữa được bảo quản bằng Kali Dichromate, được chia thành 2 nhóm:

- Nhóm sữa không tách bơ
- Nhóm sữa tách bơ: sữa được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút và tách bỏ bơ

Phương pháp định lượng hormone P₄

Đối với mẫu sữa

- Nhóm mẫu sữa không tách bơ (phương pháp trực tiếp): Các mẫu sữa được pha loãng 5 lần bằng dung dịch đệm Assay Buffer (AB), sau đó được ủ trong bể nước ấm 70 độ trong 30 phút trước khi phân tích.

- Nhóm sữa tách bơ (phương pháp gián tiếp): xử lý mẫu sữa bằng Petroleum Ete trong cồn lạnh

Đối với mẫu huyết tương

- Nhóm mẫu huyết tương không xử lý Petroleum Ete: Các mẫu được pha loãng 5 lần bằng dung dịch đệm Assay Buffer (AB). Sau đó được ủ trong bể nước ấm 70 độ trong 30 phút trước khi phân tích.

- Nhóm mẫu huyết tương xử lý Petroleum Ete trong cồn lạnh

Phân tích mẫu

Theo kỹ thuật miễn dịch Enzyme Immuno Assay (EIA) trên máy đọc Opsys MR-DYNEX (USA), theo Isobe & Nakao (2003)

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Excel và phần mềm Minitab 12

Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành tại:

- Trại nghiên cứu thực nghiệm thức ăn gia súc Viện Chăn nuôi
- Trung tâm NC bò và đồng cỏ Ba Vì, Hà Tây.
- Phòng thí nghiệm bộ môn SS & TTNT Viện Chăn nuôi

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả định lượng P₄ trên sữa theo phương pháp tách chiết và không tách chiết mẫu

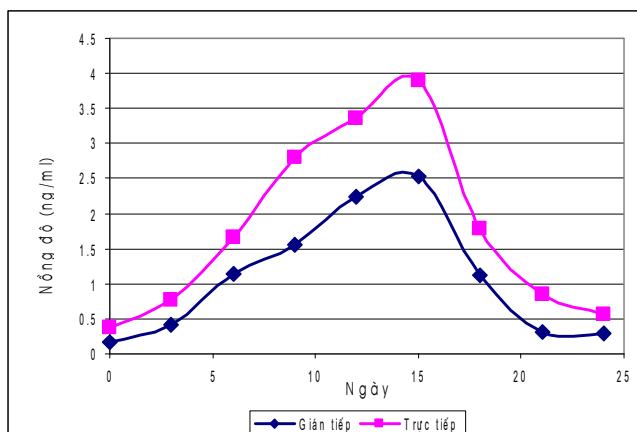
360 mẫu sữa và huyết thanh bò lai F₂, F₃ được thu thập, sau khi phân tích hàm lượng P₄ theo phương pháp sữa tách bơ (phương pháp gián tiếp) và không tách bơ (phương pháp trực tiếp) bằng kỹ thuật EIA, kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Kết quả định lượng P₄ trong sữa ở bò sữa

Ngày	Mẫu sữa tách bơ			Mẫu sữa không tách bơ		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
ĐD	0,17	0,07	41,18	0,38	0,15	39,47
3	0,41	0,04	9,76	0,77	0,12	15,58
6	1,14	0,06	5,26	1,65	0,10	6,06
9	1,55	0,03	1,94	2,79	0,16	5,73
12	2,25	0,05	2,22	3,35	0,13	3,88
15	2,52	0,02	0,79	3,89	0,17	4,37
18	1,13	0,06	5,31	1,79	0,11	6,15
21	0,32	0,03	9,38	0,85	0,15	17,65
24	0,28	0,04	14,29	0,57	0,12	21,05

Hàm lượng P₄ vào các ngày: Động dục và phối giống, ngày 3-6-9-12-15-18-21 và 24 sau phối giống tương ứng là: 0.17 - 0.41 - 1.14 - 1.55 - 2.25 - 2.52 - 1.13 - 0.32 và 0.28 ng/ml ở mẫu sữa tách bơ. Ở các mẫu sữa không tách bơ kết quả tương ứng là: 0.38 - 0.77 - 1.65 - 2.79 - 3.35 - 3.89 - 1.79 - 0.85 - 0.57 ng/ml. Từ kết quả trên nhận thấy độ biến động của 2 phương pháp xử lý mẫu trong kỹ thuật EIA: Phương pháp sữa đã tách bơ so với phương pháp sữa không tách bơ là tương đương nhau. Tuy nhiên mức độ biến động ở phương pháp tách chiết ít

hơn so với phương pháp không tách chiết. Do vậy để xác định hàm lượng P₄ trong sữa nên ứng dụng phương pháp tách chiết mẫu (xem Biểu đồ 1). Kết quả trên phù hợp với các tác giả: Homeida và Nakao (2002); Phan Văn Kiểm và Nguyễn Quý Quỳnh Hoa (2003) tiến hành phân tích P₄ trên sữa tách bơ và YoShida và Nakao (2003) trên sữa chưa tách bơ.



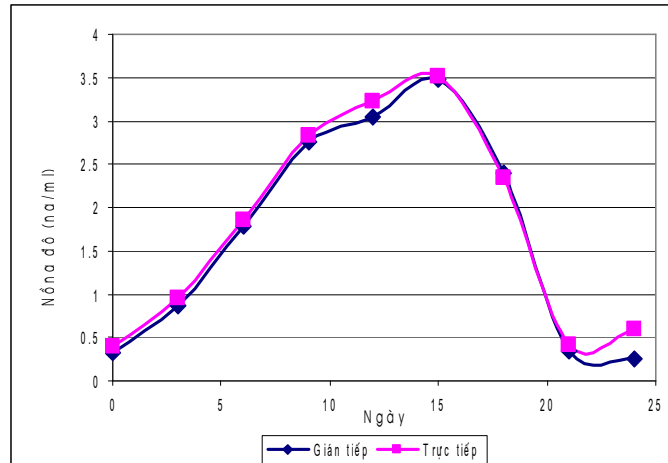
Biểu đồ 1: Kết quả định lượng P₄ trong sữa ở bò sữa

Kết quả định lượng P₄ trong huyết tương ở bò sữa theo phương pháp tách chiết và không tách chiết mẫu

Hàm lượng P₄ trên huyết tương ở phương pháp tách chiết mẫu bằng Petroleum Ete như sau: vào các ngày động dục và phối giống, ngày 3-6-9-12-15-18-21 và 24 sau phối giống tương ứng là: 0,32 - 0,86 - 1,78 - 2,75 - 3,04 - 3,48 - 2,40 - 0,35 và 0,56 ng/ml. Ở phương pháp không tách chiết mẫu kết quả tương ứng là: 0,40 - 0,95 - 1,86 - 2,83 - 3,23 - 3,52 - 2,34 - 0,41 và 0,59 ng/ml. Chúng tôi nhận thấy độ biến động ở phương pháp tách chiết và không tách chiết huyết tương khác nhau không rõ rệt (p > 0,05) (xem Biểu đồ 2). Do vậy, khi định lượng P₄ trên mẫu là huyết tương có thể dùng 1 trong 2 phương pháp trên.

Bảng 2: Hàm lượng P₄ trên huyết tương ở bò sữa

Ngày	Mẫu xử lý Petroleum Ete			Mẫu không xử lý Petroleum Ete		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
ĐD	0,32	0,02	6,25	0,40	0,03	7,50
3	0,86	0,05	5,81	0,95	0,04	4,21
6	1,78	0,04	2,25	1,86	0,02	1,08
9	2,75	0,07	2,55	2,83	0,05	1,77
12	3,04	0,02	0,66	3,23	0,04	1,24
15	3,48	0,03	0,86	3,52	0,06	1,70
18	2,40	0,07	2,92	2,34	0,05	2,14
21	0,35	0,02	5,71	0,41	0,05	12,20
24	0,56	0,07	12,50	0,59	0,04	6,78



Biểu đồ 2 : Hàm lượng P4 trên huyết tương ở bò sữa

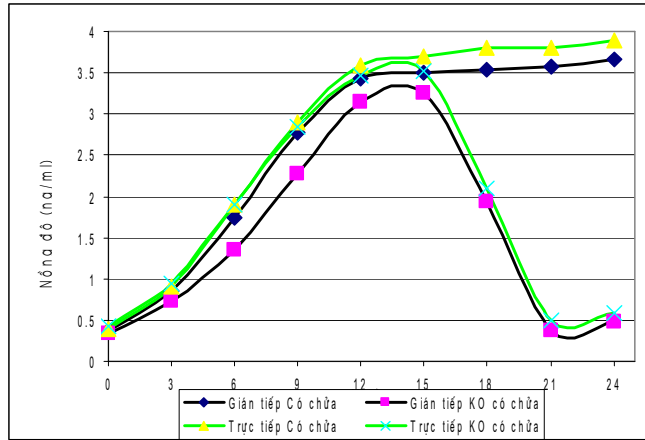
Kết quả định lượng P₄ trên sữa theo phương pháp tách chiết và không tách chiết mẫu ở bò lai hướng sữa sau phối giống

12 bò sau phối giống được tiến hành lấy mẫu sữa và huyết tương để kiểm chứng mức độ biến động của phương pháp tách chiết và không tách chiết mẫu nhằm chẩn đoán có thai sớm, kết quả được trình bày ở Bảng 3 và Biểu đồ 3.

Khi định lượng P₄ trên sữa theo phương pháp tách chiết nhận thấy: sự biến động về hàm lượng P₄ nhỏ hơn so với phương pháp không tách chiết mẫu, ở bò có chữa, trong khi ở bò không có chữa sự biến động khá cao. Trong 12 bò sau 24 ngày sau phối đã phát hiện 8 bò chẩn đoán là đã có thai (8/12 = 66,66%), và bò không có thai (4/12 = 33,33%). Kết quả này phù hợp với kết quả đã công bố của Nosier và cs (1992) khi định lượng P₄ bằng EIA trên sữa tách bơ.

Bảng 3: Hàm lượng P4 trên sữa ở bò lai hướng sữa sau phối giống

Ngày	Hàm lượng mẫu sữa tách bơ (ng/ml)						Hàm lượng mẫu sữa không tách bơ (ng/ml)					
	Bò có chữa (n=8)			Bò không chữa (n=4)			Bò có chữa (n=8)			Bò không chữa (n=4)		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
0	0,13	0,06	46,15	0,14	0,04	28,57	0,35	0,15	42,86	0,33	0,15	45,45
3	0,37	0,01	2,70	0,39	0,02	5,13	0,74	0,12	16,22	0,76	0,12	15,79
6	1,05	0,01	0,95	1,09	0,01	0,92	1,55	0,10	6,45	1,65	0,10	6,06
9	1,45	0,03	2,07	1,28	0,05	3,91	2,59	0,16	6,18	2,39	0,16	6,69
12	2,22	0,05	2,25	2,05	0,03	1,46	3,15	0,13	4,13	3,32	0,13	3,92
15	2,38	0,02	0,84	1,98	0,04	2,02	3,67	0,17	4,63	3,49	0,17	4,87
18	2,43	0,07	2,88	1,08	0,05	4,63	3,79	0,11	2,90	1,79	0,11	6,15
21	2,51	0,02	0,80	0,33	0,02	6,06	3,85	0,15	3,90	0,65	0,15	23,08
24	2,67	0,03	1,12	0,41	0,01	2,44	3,87	0,12	3,10	0,57	0,12	21,05



Biểu 3: Hàm lượng P₄ trên sữa ở bò lai hính sữa sau phối giống

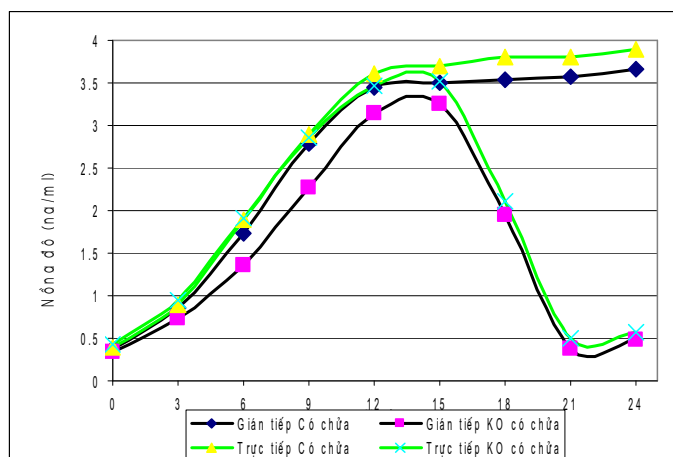
Kết quả định lượng P₄ trên huyết tương theo phương pháp tách chiết và không tách chiết ở bò lai hướng sữa sau phối giống

Sau khi phân tích các kết quả thu được thể hiện ở Bảng 4.

Hàm lượng P₄ vào các ngày: động dục và phối giống hàm lượng P₄ thấp nhất (0,37 ng/ml) sau đó tăng 1,74 ng/ml vào ngày thứ 6, sau đó tăng và ổn định từ ngày thứ 12 đến ngày thứ 24 (3,44 - 3,66 ng/ml) theo phương pháp mẫu được xử lý bằng Petroleum Ete. Ở phương pháp không tách chiết tương ứng là: 0,40 - 1,89; 3,58 – 3,89 ng/ml. Chúng tôi nhận thấy độ biến động của hai phương pháp xử lý mẫu dao động không đáng kể ($p > 0,05$) và có thể ứng dụng một trong hai phương pháp để xét nghiệm P₄ để chẩn đoán có thai sớm. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Nakao và cs (1983) được minh họa ở biểu đồ 4.

Bảng 4: Hàm lượng P₄ trên huyết tương ở bò lai hướng sữa sau phối giống

Ngày	Hàm lượng mẫu xử lý Petroleum Ete (ng/ml)						Hàm lượng mẫu không xử lý Petroleum Ete (ng/ml)					
	Bò có chữa (n=8)			Bò không chữa (n=4)			Bò có chữa (n=8)			Bò không chữa (n=4)		
	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
0	0,37	0,02	5,41	0,34	0,04	11,76	0,40	0,03	7,50	0,43	0,05	11,63
3	0,85	0,09	10,59	0,73	0,07	9,59	0,93	0,06	6,45	0,95	0,03	3,16
6	1,74	0,06	3,45	1,35	0,10	7,41	1,89	0,04	2,12	1,91	0,07	3,66
9	2,78	0,07	2,52	2,27	0,05	2,20	2,92	0,05	1,71	2,85	0,04	1,40
12	3,44	0,05	1,45	3,14	0,07	2,23	3,58	0,07	1,96	3,47	0,10	2,88
15	3,50	0,09	2,57	3,25	0,03	0,92	3,65	0,14	3,84	3,52	0,06	1,70
18	3,53	0,13	3,68	1,94	0,10	5,15	3,77	0,16	4,24	2,10	0,02	0,95
21	3,57	0,12	3,36	0,37	0,02	5,41	3,82	0,14	3,66	0,50	0,04	8,00
24	3,66	0,17	4,64	0,48	0,03	6,25	3,89	0,12	3,08	0,58	0,03	5,17



Biểu đồ 4: Hàm lượng P₄ trên huyết tương ở bò lai hướng sữa sau phối giống

Khi so sánh với kết quả siêu âm ở 35 ngày sau khi phối giống cho kết quả có thai và khám thai sau 55 ngày qua trực tràng xác nhận bò đã có chửa.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi có một số nhận xét sau:

- Hàm lượng P₄ ở phương pháp tách chiết mẫu so với phương pháp không tách chiết mẫu trên sữa là có sự sai khác
- Hàm lượng P₄ ở phương pháp tách chiết mẫu so với phương pháp không tách chiết mẫu trên huyết tương là tương đương nhau
- Có thể dùng một trong hai phương pháp - tách chiết hoặc không tách chiết mẫu trên sữa hoặc huyết tương để chẩn đoán có thai sớm ở bò sữa

Đề nghị

Cho phép thử nghiệm kỹ thuật EIA-P₄ trong sản xuất để chẩn đoán có thai sớm ở bò sữa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Homeida, Nakao T.. 2002. Progesterone levels in skim milk in cow which conceived and not conceived after AI. Hiroshima University. Journal
- Yoshida, Nakao T.. 2003. Use milk P₄ EIA for early pregnancy diagnosis in dairy cows. Hiroshima University. J. Vet. Sci 4, 49-53.
- Isobe N., Nakao T., Yamashiro H., Shimada M.. 2005. Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle. Animal reproduction science, 871-10.
- Nakao T., Sugihashi A., Kawata K., Saga N and Tsunoda N.. 1983. Milk progesterone level in cows with normal or prolonged estrous cycle, referenced to early pregnancy diagnosis. Jpn. J. Vet. Sci., 45, 495-499.
- Nosier M. B., Gyawu P. and Pope G. S.. 1992. Progesterone concentration in deffated milk in dairy cows in early pregnancy. Br. Vet. J., 148, 45-53.
- Phan Văn Kiểm, Nguyễn Quý Quỳnh Hoa. 2003. Kết quả nghiên cứu hàm lượng Progesterone ở bò lai hướng sữa bằng kỹ thuật miễn dịch enzyme (EIA). Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội, trang 607-610./.