การใช้พลาสม่าโคท้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวบ่งชี้การตั้งท้องของโค

Challenge mice immunity with pregnant cow plasma to produce specific antibodies as pregnant markers of cows

บุญญรัตน์ เดชเรืองศรี[1], กฤดา ชูเกียรติศิริ[1], อานนท์ ปะเสระกัง[1], ภาคภูมิ เสาวภาคย์[1], วาที คงบรรทัด[2] และ วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์[1*]

Boonyarat Detruengsri[1], Kridda Chukiatsiri[1], Anon Paserakung[1],

Phakphume Saowaphak[1], Watee Kongbuntad[2] and Wiwat Pattanawong[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาการใช้พลาสม่าโคท้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนบ่งชี้การตั้งท้อง วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้พลาสม่าโคท้องฉีดกระตุ้นหนูทดลอง สามารถทำให้หนูทดลองสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Pregnancy associated glycoproteins (PAG) โดยนำหนูทดลองเพศผู้จำนวน 12 (n=12) ตัว แบ่งฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยพลาสม่าโคท้องจำนวน 9 ตัว ไม่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 3 ตัว (กลุ่มควบคุม) จากนั้นนำตัวอย่างเลือดหนูทดลองมาทดสอบ ELISA ; Enzyme-linked immunosorbent assay วัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในพลาสม่าหนูในการจับกับ PAG ซึ่งผลการทดสอบพบว่าหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยพลาสม่าโคท้องมีมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของ ELISA เท่ากับ 1.04 และกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของ ELISA เท่ากับ 0.33 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้พลาสม่าโคท้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองสามารถทำให้หนูทดลองผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PAG ได้

คำสำคัญ: PAG, ELISA, แอนติบอดี

ABSTRACT: The study of using pregnant cow plasma to stimulate immune response of mice to produce specific antibodies as pregnant markers of cows. The aim of this study was to inject a pregnant cow plasma to mice for create antibodies that are specific to the Pregnancy associated glycoproteins (PAG). By using 12 male mices (n=12) to immune injection with pregnant cow plasma and not injected 3 mices (control group). Than collect blood samples were tested for ELISA; enzyme-linked immunosorbant assay. Measure the absorbance (optical density; OD) at a wavelength of 450 nm. From testing the ability of antibodies in plasma mice in binding with PAG. Experience showed that the mice immunity has the average OD values of ELISA at 1.04 and the control group is 0.33 which is significantly different ($P <0.05$). In conclusion, this study shows that pregnant cow plasma injection can be used the mice immunity for produce specific antibodies as PAG of cows.

Keywords: Antibody, ELISA, PAG

---

[1] คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiangmai 50290

[2] ภาควิชาทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Division of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiangmai 50290

[*] Corresponding author: wpattanawong@gmail.com

บทนำ

หนึ่งในข้อสำคัญของการเลี้ยงโคในปัจจุบันคือ การตรวจการตั้งท้องโค ซึ่งผลของการตรวจการตั้งท้องของโคมีความสำคัญและจำเป็นในการประเมินประสิทธิภาพฟาร์ม และการจัดการฟาร์มด้านต่างๆ (Bromfield, 2016) เพราะซึ่งการปล่อยให้มีโคท้องว่างมากกว่า 12-13 เดือน ภายในฝูง จะส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงโคท้องว่างเพิ่มขึ้นได้ (Larson และ Ball, 1992) และจากการตรวจการตั้งท้องในโค ที่นิยมกันในปัจจุบัน มักจะเกิดปัญหาต่างๆ ในการตรวจ เช่น ต้องใช้ทั้งความรู้ประสบการณ์ของผู้ตรวจ บางเทคโนโลยีก็มีราคาสูง รวมทั้งความแม่นยำ และช่วงระยะเวลาที่ยาวนานกว่าจะทราบผลชัดเจน จึงมีการศึกษาตัวบ่งชี้การตั้งท้องใหม่ๆ เพื่อให้มีการตรวจการตั้งท้องในโคสะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้นอย่าง เช่น การศึกษา Early pregnancy factor (EPF) (Morton,1984; Klima et al., 1992; Cordoba et al., 2001) ตรวจพบได้โดย Rosette inhibition test (RIT assay) เป็นวิธีที่ยุ่งยาก และอาจมีสารอื่นๆ ในตัวอย่างที่ส่งผลให้ผลตรวจผิดพลาดได้ การศึกษา Placental lactogen (PL) (Byatt et al., 1992) PL มีความเข้มข้นค่อนข้างแปรปรวน และอยู่ในระดับต่ำ ตรวจพบได้ในช่วง 3-4 เดือนของการตั้งท้องเท่านั้น การศึกษา Chorionic Gonadotropins (CG) (Zondek และ Aschheim,1927; Cole และ Hart, 1930) ตรวจพบได้ในช่วง 35-40 วันของการตั้งท้อง มีปริมาณน้อยและตรวจพบได้ช้า การศึกษา Estrone sulphate (E1S) (Hung และ Prakash, 1990) E1S พบได้ในน้ำนม พลาสม่า และปัสสาวะ ตรวจโดยวิธี RIA (radioimmunoassay) และ ELISA สามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่ 3.5-4 เดือนขึ้นไปของการตั้งท้อง และการศึกษา Interferon-τ (IFN- τ) ของ Roberts. (2007) Interferon- τ พบอยู่ในมดลูกแต่ก็มีปริมาณน้อย ไม่สามารถวัดได้ในกระแสเลือดและของเหลวส่วนอื่นๆ ของแม่สัตว์ และเพื่อขจัดปัญหาดังกล่าวจึงมีการศึกษาการตรวจการตั้งท้องของโค โดยการตรวจหา PAG ที่สังเคราะห์จากรกในแม่โคที่ตั้งท้อง PAG เป็นกลุ่มของ glycoproteins ขนาดใหญ่ ที่โดย PAG สามารถตรวจพบด้วยวิธี RIA และ ELISA (Sousa et al., 2006) โมเลกุล PAG เหล่านี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดย mono และ binucleate trophoblastic cells และปล่อยออกสู่กระแสเลือดของแม่โค ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการตั้งท้องจนกระทั่งคลอด PAG สามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อรก เมื่อเริ่มมีการฝังตัวของตัวอ่อนและการสร้างรก คุณลักษณะของ PAG คือมี มวลโมเลกุลถึง 70kDa มากกว่าไกลโคโปรตีนอื่นๆ ในพลาสมาเป็นสองเท่า ในส่วนของ Bovine PAG ที่ค้นพบครั้งแรก คือ boPAG-1 หรือที่เรียกว่า boPAG-67kDa ส่วนอื่นๆ ของโมเลกุลที่อยู่ในตระกูลนี้มีจำนวนและชื่อที่ได้รับการยอมรับจาก international nomenclature จนถึงปัจจุบันและได้รับการตรวจสอบพิสูจน์แล้วว่ามี Bovine PAG อยู่ 22 ชนิด คือ boPAG-1 – boPAG-22 จากการวิเคราะห์ทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางชีวภาพของ สามารถแบ่ง Bovine PAG ออกเป็น 3 กลุ่มคือ (Gajewski et al., 2009) 1. Bovine PAG-8 อาจเป็น 2. boPAG-2 และ 3. คือ boPAG-1 หรือที่เรียกว่า boPAG-67kDa ซึ่ง PAG เป็นกลุ่มโมเลกุลหลักของ Bovine PAG (Sousa et al., 2006)

จากการค้นพบ PAG นี้ จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจการตั้งท้องของโค ซึ่งจะเป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจท้องที่มีประสิทธิภาพดีกว่าแบบเดิมที่มีข้อจำกัดต่างๆ การตรวจการตั้งท้องจาก PAG จึงมีเป้าหมายเพื่อที่นั้น ทราบผลการตรวจที่ชัดเจนและรวดเร็วกว่า สามารถตรวจได้ง่ายกว่า โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาผลของการใช้พลาสม่าฉีดกระตุ้นหนูทดลองแทนที่การใช้ PAG บริสุทธิ์

วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างเลือดจากโคท้องประมาณ 5-8 เดือน ที่ยืนยันการตั้งท้องโดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักโดยสัตวบาลประจำฟาร์ม จำนวน 3 ตัว ปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำตัวอย่างเลือดของโคที่เก็บมาปั่นเหวี่ยงและดูดเก็บพลาสม่าไว้ใช้ในการเตรียมเป็นแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยผสมพลาสม่าโคท้องที่เก็บมากับ Incomplete freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งแรก และครั้งต่อไปเปลี่ยนเป็น complete freund's adiuvant ผสมจนเป็นของเหลวเนื้อเดียวกัน (homogenization) และนำ

ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังของหนูทดลองพันธุ์ BALB/cAJcl เพศผู้ อายุ 3-7 สัปดาห์ ตัวละ 200 ไมโครลิตร ทั้งหมด 9 ตัว ฉีดกระตุ้นทั้งหมด 20 สัปดาห์ (ฉีดสัปดาห์เว้นสัปดาห์) และไม่ฉีดกระตุ้น 3 ตัว ก่อนฉีดกระตุ้นทุกครั้งทำการเก็บตัวอย่างเลือดหนูทดลอง โดยการใช้มีดโกนกรีดบริเวณเส้นเลือดโคนหาง ให้เป็นแผลขนาดเล็ก และใช้ Haematocrit tubes ดูดเก็บเลือด ปริมาณไม่เกิน 0.2 มิลิเมตร (เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ MACUC 002A/2562) ถ่ายใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและดูดเก็บพลาสม่าไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียล เพื่อนำไปใช้ในทดสอบ Indirect ELISA (ตามวิธีของของ รัชนี วรรณ, (2550) เริ่มจากหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของแอนติเจน, แอนติบอดี และ Goat anti-mouse HRP ซึ่งอัตราส่วนที่เหมาะสม ได้แก่ แอนติเจน (PAG protein) คือ PAG 50 นาโนกรัมต่อ phosphate buffer saline (PBS) 100 ไมโครลิตร, แอนติบอดี (พลาสม่าหนูทดลอง) ที่เจือจางกับ PBS ในอัตราส่วน 1:1000 และ Goat anti-mouse HRP ที่เจือจางกับ PBS ในอัตราส่วน 1:2000 จากนั้นจึงเริ่มขั้นตอนของการทำ Indirect ELISA ที่จำเพาะต่อ PAG เพื่อตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ PAG ของหนูที่ได้รับการฉีดพลาสม่าโคท้อง ผลการทำ Indirect ELISA ต่อ PAG จะได้ค่าการดูดกลืนแสงของ ELISA ที่อ่านจากเครื่อง ELISA reader ที่ 450 nm ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่จำเพาะต่อ PAG จะถูกนำมาวิเคราะห์ภายใต้แผนการทดลองการแบบสุ่มสมบูรณ์ที่มีการวัดซ้ำ โดยใช้ขั้นตอน PLOC GLM ในโปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SAS Studio 3.8 Basic Edition (SAS University Edition, 2018)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Indirect ELISA ที่จำเพาะต่อ PAG พบว่าการทดลองการใช้พลาสม่าโคท้อง ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลอง ส่งผลทำให้หนูทดลองสามารถสร้างแอนติบอดีได้โดยดูจากค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรของ ELISA พบว่าหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของ ELISA เท่ากับ 1.04 เทียบกับกลุ่มไม่ได้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของ ELISA เท่ากับ 0.33 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดัง Figure 1 แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองสามารถสร้างแอนติบอดี

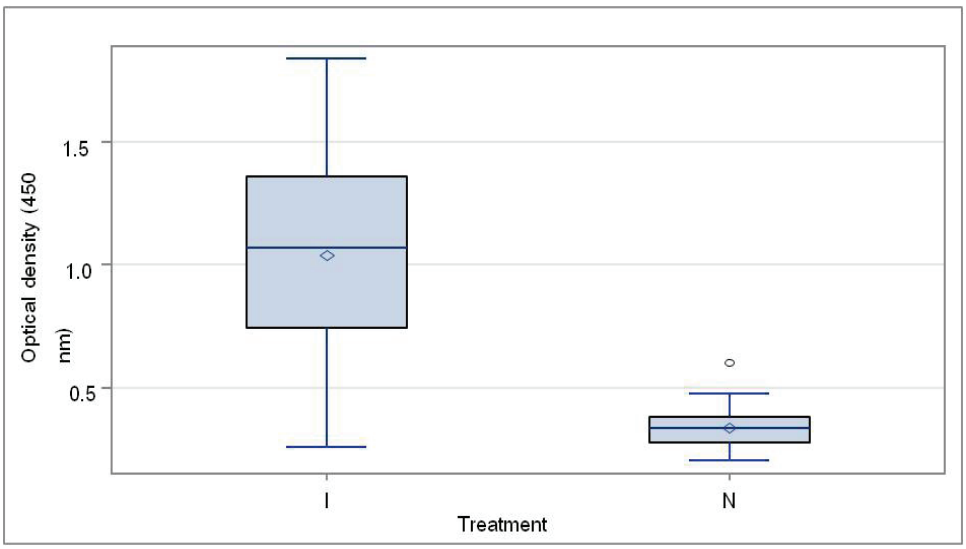

Figure 1 Chart showing the comparison of the average OD values of ELISA from the reaction of antibodies as PAG. (I refers to the average OD values of ELISA in mice immunity group, N refers to the average OD value the average OD values of ELISA in control group)

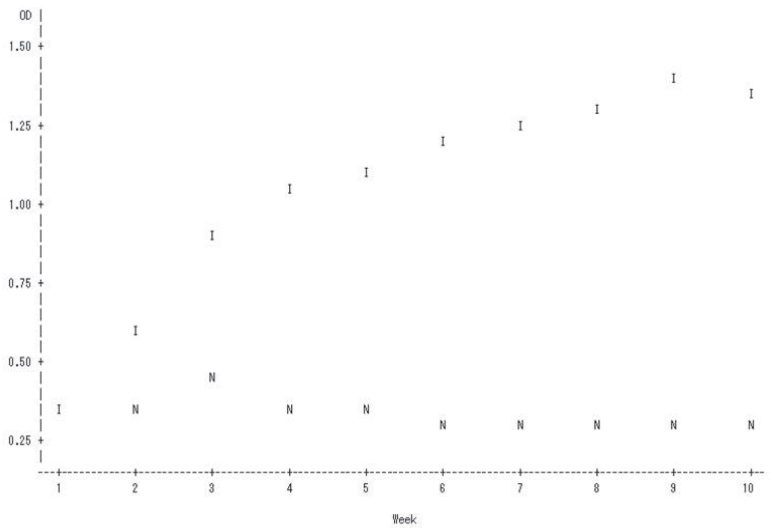

Figure 2 Chart showing the comparison of the average OD values of ELISA in each week from the reaction of antibodies as PAG. (I refers to the average OD of ELISA in mice immunity group, N refers to the average OD of ELISA in control group)

ข้อมูลจาก Figure 2 แสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้วเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากสัปดาห์ที่ 0 ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 20 การที่ค่าการดูดกลืนแสงของ ELISA มีค่าสูงขึ้น เกิดจากหลักการของการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกันของแอนติบอดี และแอนติเจน โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยา (ปวิน, 2555) การที่ค่าการดูดกลืนแสงของ ELISA มีค่าสูง แสดงว่ามีการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจนหรือ PAG ใน Figure 2 สัปดาห์ที่ 0 ของทั้งสองกลุ่ม (I คือ กลุ่มที่ฉีดกระตุ้น และ N คือกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้น) มีค่าใกล้เคียงกันและน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับสัปดาห์ถัดไป และในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ขึ้นไป กลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นมีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างเห็นได้ชัด ตามกลไกการทำงานของการสร้างภูมิคุ้มกันที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5-10 วัน (สันนิภา, 2549) และจากการศึกษาของ Fricke et al. (2016) เกี่ยวกับระดับ PAG ในพลาสม่าและน้ำนม พบว่าระดับ PAG ในพลาสม่าจะเริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 25 หลังผสมเทียม และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 32 หลังผสมเทียม จากนั้นจะลงลงต่ำสุดในช่วงวันที่ 53-67 หลังผสมเทียม และจะค่อยๆ เพิ่มระดับขึ้นในวันที่ 74 หลังผสมเทียม Green et al. (2005) ระบุว่า ELISA สามารถตรวจพบ PAG ในเลือดของโคที่ตั้งท้องได้อย่างชัดเจนภายใน 28 วันหลังการผสมเทียม (ความเข้มข้นของ PAG ในเลือดคือ 8.75 ± 3.04 ng/mL) ความเข้มข้นของ PAG มีค่าสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่คลอดที่ 588.90 ± 249.90 ng/ mL และจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากคลอด โดยระดับความเข้มข้นของ PAG ที่ 0.80 ng/ml ในเลือดถูกใช้เป็นจุดตัดเพื่อวินิจฉัยการตั้งท้องของโค (Karen et al., 2014)

สรุป

ผลจากการใช้พลาสม่าโคท้องฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลอง เพื่อกระตุ้นให้หนูทดลองสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวบ่งชี้การตั้งท้องของโค ในที่นี้คือ pregnancy associated glycoproteins ซึ่งผลจากการทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่จำเพาะต่อ PAG พบว่าหนูทดลองสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ PAG ได้ โดยหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของ ELISA เท่ากับ 1.04 และกลุ่มไม่ได้ฉีด

กระตุ้นภูมิคุ้มกันมีมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของ ELISA เท่ากับ 0.33 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จะเห็นได้ว่าส่วนต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน มีการสร้างแอนติบอดีที่อาจจำเพาะต่อการบ่งบอกการตั้งท้องของโค ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจะนำหนูทดลองที่ได้รับการฉีดกระตุ้นและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ไปใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ PAG เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาชุดตรวจสอบการตั้งท้องของโคภาคสนาม โดยใช้ PAG เป็นตัวบ่งบอก และพัฒนาให้มีความแม่นยำสูงสุดต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่สนับสนุนทุนในการทดลองครั้งนี้ พร้อมทั้งคณาจารย์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่ให้การสนันสนุนและคำปรึกษา

เอกสารอ้างอิง

ปวิน งามเลิศ. 2555. การใช้วิธีรวดเร็วสำหรับการทดสอบทางจุลชีววิทยา. http://blpd.dss.go.th/training/dwdocuments/enews/blpdenews_07_55.pdf. 5/10/2560. ค้นเมื่อ 26 ธันวาคม 2561.

รัชนีวรรณ เขจรวงศ์. 2550. ความสัมพันธ์ระหว่างการผสมติดของโคนมกับระดับอีสตราไดออลในน้ำนมในวันผสมเทียมวัดโดยวิธีอีไลซ่าที่เตรียมจากโมโนโคลนอลแอติบอดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สันนิภา สุรทัตต์. 2549. วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์ภาคปฏิบัติ. โรงพิมพ์ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

Bromfield John. 2016. ANS 3319C Reproductive Physiology and Endocrinology Pregnancy Diagnosis via Rectal Palpation in Cattle and Horses. http://animal.ifas.ufl.edu/ans3319/lab_notes/docs/lab_11_pregnancy_diagnosis_rectal.pdf. Accessed 18 Mar. 2019.

Byatt, J.C., W.C. Warren, P.J. Eppard, N.R. Staten, G.G. Krivi, and R.J. Collier. 1992. Ruminant placental lactogens: structure and biology. J. Anim. Sci. 70(9):2911-2923.

Cole, H. H. and G. H. Hart. 1930. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 93(1): 57-68

Cordoba, M.C., R. Sartori and P.M. Fricke. 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. J. Dairy. Sci. 84(8):1884-1889.

Fricke, P. M., A. Ricci, J. O. Giordano, and P. D. Carvalho. 2016. Methods for and Implementation of Pregnancy Diagnosis in Dairy Cows. Vet. Clin. Food. Anim. 32:165–180.

Gajewskil Z, M. Pertajitics, N.M. Sousa, J.F. Beckers, B. Pawlinski, and F. Janett. 2009. Pregnency–Associated glycoproteins as a new diagnostic tool in cattle reproduction, Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 151(12):577-582.

Green J.A., T.E. Park, M.P. Avalle, B.P. Telugu, A.L. McLain, A.J. Peterson, W. McMillan, N. Mathialagan, R.R. Hook, S. Xie, and R.M. Roberts. 2005. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. Theriogenology. 63:1481-1503.

Hung, N.N. and B.S. Prakash. 1990. Influence of gestation on blood plasma concentrations of oestrone and oestrone sulphate in Karan Swiss cows and Murrah buffaloes. Br. Vet. J. 146(5):449-456.

Karen, A., A.C. Bajcsy, R. Minoia, R. KOVÁCS, N.M. De Sousa, J.F. Beckers, J. Tibold, I. Madl, and O. Szenci. 2014. Relationship of progesterone, bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 and nitric oxide with late embryonic and early fetal mortalities in dairy cows. J. Reprod. Develop. 2013-033.

Klima, F., U. Tiemann, D. Schadow, M. Fasinski, S.B.Savoly, R. Loose, and C. Pitra, 1992. Bovine early pregnancy factor (EPF) activity dependent on a 67-kDa polypeptide. J. Reprod. Immunol. 21(1):57-70.

Larson, L.L., and P.H.J. Ball. 1995.Reproduction in cattle. 2nd ed. Blackwell Science Ltd. London.

Morton, H., 1984. Early pregnancy factor (EPF): a link between fertilization and immunomodulation. Australian J. Biol. Sci. 37(6): 393-408.

Roberts, R.M. 2007. Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. Cytokine & growth factor reviews. 18(5-6):403-408.

SAS University Edition. 2018. SAS Studio Release: 3.8 (Basic Edition). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Sousa N.M., A. Ayad, J.F. Becker, and Z. Gajewski. 2006. Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) as Pregnancy markers in the ruminants. J. Physiol. Pharmacol. 57(8):153-71.

Zondek, B., and S. Aschheim. 1927. Das Hormon des hypophysenvorderlappens. J. Mol. Med. 6(6):248-252.