

การศึกษาความเป็นไปได้ของการวิเคราะห์ฮอร์โมนเพศในอุจจาระโดยวิธี enzyme immunoassay เพื่อตรวจสอบการทำงานของรังไข่ในกวางป่าไทยเพศเมีย : การสกัดฮอร์โมน

อภิมณ เรืองภักดี และ นกน้อย ชิตชวนกิจ *

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ * Email : fscinn@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การทดสอบกระบวนการสกัดฮอร์โมนเพศในอุจจาระของกวางป่าไทย (*Cervus unicolor*) เพศเมีย 2 ตัวโดยใช้สารละลาย 80% เมทานอล พบว่าประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด วัดจากปริมาณของสาร 125 I-Progesterone ที่ได้กลับคืนมาภายหลังตัวอย่างผ่านกระบวนการสกัดมีค่าเฉลี่ย ($\pm$ sem.) เท่ากับ 46.6% (± 0.4) นอกจากนี้ยังพบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีการกระจายตัวสม่ำเสมอภายในกองอุจจาระ โดยมีค่า C.V. เท่ากับ 8.4% และ 6.1% สำหรับอุจจาระกวางตัวที่ 1 และ 2 โดยลำดับ โดยที่ระยะเวลาที่อุจจาระอยู่ภายนอกร่างกายก่อนที่จะถูกแช่แข็ง ≥ 3 ชั่วโมง มีผลทำให้ความสม่ำเสมอของการกระจายตัวของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระสูงขึ้น (C.V. $> 20\%$) นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาที่อุจจาระอยู่ภายนอกร่างกายมีผลทำให้ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 0.3, 0.5, 0.9 และ 1.9 $\mu\text{g/g}$ ของน้ำหนักอุจจาระแห้ง เมื่ออุจจาระอยู่ภายนอกร่างกาย 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ จากการทดลองชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่การสกัดฮอร์โมนเพศในตัวอย่างอุจจาระด้วยสารละลายเมทานอลสามารถนำมาใช้ในกระบวนการสกัดฮอร์โมนเพื่อการวิเคราะห์ฮอร์โมนเพศในอุจจาระ

คำสำคัญ : กวางป่าไทย, โปรเจสเตอโรน, sambar deer, *Cervus unicolor*, fecal hormone, progesterone, extraction

1. บทนำ

การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเพศในสิ่งขับถ่ายได้แก่ ปัสสาวะและอุจจาระ เป็นวิธีการที่ได้รับความสนใจนำมาใช้ในการศึกษาชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ (Monfort และคณะ, 1990 และ 1991) เพราะการเก็บตัวอย่างสิ่งขับถ่ายมีความสะดวก ประหยัดและปลอดภัยต่อตัวสัตว์และผู้ปฏิบัติงานมากกว่าการเก็บตัวอย่างชนิดอื่น เช่น เลือดสัตว์ แต่ตัวอย่างสิ่งขับถ่ายโดยเฉพาะอุจจาระสัตว์จำเป็นต้องผ่านกระบวนการสกัดฮอร์โมนจากตัวอย่างอุจจาระที่เหมาะสม จึงจะสามารถนำไปวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนด้วยเทคนิค radio-immunoassay (RIA) หรือ enzyme immunoassay (EIA) จากการศึกษาในกวางชนิดอื่น (Monfort และคณะ, 1993; Kapke และคณะ, 1999; Stoop และคณะ,

1999; และ Yamauchi และคณะ, 1999) รวมถึงสัตว์ชนิดอื่น เช่น scimitar-horned oryx (Morrow และ Monfort, 1998 และ Morrow และคณะ, 1999) และ caribou (Messier และคณะ, 1990) พบว่ารายงานส่วนใหญ่ใช้กระบวนการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลหรือสารละลายอีเทอร์ซึ่งมีกระบวนการซับซ้อน ในปีค.ศ. 2000 มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในอุจจาระของกวาง Mesopotamian fallow deer ด้วยเทคนิค EIA ซึ่งในการทดลองใช้การสกัดฮอร์โมนด้วยสารละลายเมทานอลทำให้มีขั้นตอนของกระบวนการสกัดมีความสะดวกและไม่ซับซ้อน และตัวอย่างที่สกัดได้สามารถติดตามการทำงานของรังไข่ของกวาง Mesopotamian fallow deer ได้เป็นอย่างดี (ข้อมูลยังไม่ได้ตีพิมพ์) ซึ่งวิธีการสกัดที่คล้ายคลึงกันนี้มีการนำมา

ใช้อย่างประสบผลสำเร็จกับการศึกษาในกวาง white-tailed deer (Millsbaugh และ Washburn, 2003) การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาประสิทธิภาพและความเหมาะสมที่จะนำวิธีการสกัดฮอร์โมนในอุจจาระของกวางป่าไทยด้วยสารละลายเมทานอลมาใช้ในการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเพศในอุจจาระเพื่อตรวจสอบการทำงานของรังไข่ในกวางป่าไทยด้วยเทคนิค EIA ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างอุจจาระจากกวางป่าเพศเมียที่กำลังอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ 2 ตัว ซึ่งมีอายุ 4-5 ปี และ 2-3 ปี กวางทั้ง 2 ตัวถูกเลี้ยงแบบ intensive farming system ที่ฟาร์มในจังหวัดนครปฐม กวางได้รับน้ำสะอาด หญ้าและข้าวโพดเป็นอาหารหลัก รวมทั้งมีแร่ธาตุก่อนเสริม กวางทั้ง 2 ตัวอยู่รวมกับฝูงเพศเมียตัวอื่นรวม 10 ตัวและมีกวางเพศผู้ที่สมบูรณ์พันธุ์คุมฝูง 1 ตัว โดยที่ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างอยู่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์

2.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอุจจาระกวางขณะที่กวางกำลังถ่ายหรือจากกองอุจจาระสดที่กวางเพิ่งถ่ายลงบนพื้นซึ่งระบุได้ชัดเจนว่าเป็นของกวางตัวนั้น กำจัดสิ่งปนเปื้อน แล้วแยกตัวอย่างอุจจาระของกวางแต่ละตัวเก็บไว้ในถุงเก็บตัวอย่างเฉพาะของแต่ละตัว อุจจาระทั้งหมดของกวางตัวที่ 1 นำมาแช่น้ำแข็งทันที (ชุดที่ 1/1) ส่วนอุจจาระของกวางตัวที่ 2 ถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้ ชุดที่ 2/1 นำตัวอย่างแช่น้ำแข็งทันที ชุดที่ 2/2 นำตัวอย่างแช่น้ำแข็งหลังจากการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง (~30°C) นาน 1 ชั่วโมง ชุดที่ 2/3 นำตัวอย่างแช่น้ำแข็งหลังจากการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง (~30°C) นาน 3 ชั่วโมง ชุดที่ 2/4 นำตัวอย่างแช่น้ำแข็งหลังจากการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง (~30°C) นาน 6 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างอุจจาระจากกวางชุดที่ 1/1 และ 2/1-2/4 แบ่งเป็นตัวอย่างย่อยๆ ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง หลอดละ 1-2 เม็ด เพื่อใช้ในการทดสอบการกระจายตัวของฮอร์โมนในกองอุจจาระ ซึ่งน้ำหนัก

อุจจาระสดพร้อมหลอด แล้วนำอุจจาระทั้งหมดแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.3 การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด

ก่อนการสกัด นำตัวอย่างอุจจาระไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry แล้วนำตัวอย่างมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างสด นำอุจจาระที่แห้งแล้วไปบดให้ละเอียดและเก็บรักษาไว้โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C ระหว่างรอเข้าสู่กระบวนการสกัด

2.4 การสกัด

จากผลการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการสกัด โดยใช้ปริมาณตัวอย่างแห้ง 25, 50 และ 100 มิลลิกรัม พบว่าปริมาณตัวอย่างแห้งที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการสกัดด้วยวิธีนี้คือ 100 มิลลิกรัม ขั้นตอนการสกัดมีดังนี้ ซึ่งอุจจาระที่แห้งและบดแล้วใส่หลอดทดลอง หลอดละ 100 มิลลิกรัม เติมน้ำ 80% เมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอด ปิดฝาหลอดให้สนิท ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายด้านบนไว้สำหรับการวิเคราะห์โดยใส่หลอดแช่แข็งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

2.5 การวัดความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA)

การวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Coat-A-Count Progesterone (DPC, The United States) ซึ่งมีวิธีการโดยสรุปดังนี้ เติมน้ำสารละลายมาตรฐานโปรเจสเตอโรนความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-40 ng/ml (calibrators A-G) หรือสารตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลอดที่ภายในเคลือบด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (coated tube) และหลอดเปล่าที่ไม่ได้เคลือบด้วยแอนติบอดีเพื่อใช้เป็นหลอด non-specific binding (NSB), จากนั้นเติมน้ำ ¹²⁵I-Progesterone ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแต่ละหลอด รวมทั้งหลอดเปล่า 1 หลอด เพื่อใช้เป็นหลอด total count (T) ผสมสารในหลอดให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (~25°C) แล้วเทสารละลายภายในหลอดออกจนหมด

เมื่อหลอดแห้งดีนำไปวัดปริมาณรังสีแกมมาด้วยเครื่อง gamma counter นำข้อมูลที่ได้ไปเข้าโปรแกรมสำเร็จรูป GMS Version 3.05: GAMMA-C12 เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานและกราฟ logit-log ของความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่าง

2.6 การทดสอบ

2.6.1 ประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด

ตัวอย่างอุจจาระที่แห้งและบดแล้วจากกองเดียวกันของกวางตัวที่ 1 จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม นำแต่ละตัวอย่างมาเติมสารฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ที่ติดฉลากด้วยสารไอโซโทป ^{125}I (^{125}I -Progesterone) 1 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันดีและสกัดด้วยสารละลาย 80% เมทานอลตามวิธีการข้างต้น เก็บตัวอย่างส่วนใสทั้งหมด มาวัดปริมาณเปอร์เซ็นต์ของสาร ^{125}I Progesterone ที่ได้คืนมาภายหลังตัวอย่างผ่านกระบวนการสกัด

2.6.2 การกระจายของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกองอุจจาระของกวางป่าไทย

สุ่มตัวอย่างอุจจาระชุดที่ 1/1 และชุดที่ 2/1-2/4 ชุดละ 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดไปสกัดด้วยสารละลาย 80% เมทานอลและหาค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยวิธี RIA ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละชุดตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความสม่ำเสมอของการกระจายของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกองอุจจาระของกวางภายในชุดตัวอย่าง

2.6.3 อิทธิพลของระยะเวลาที่อุจจาระอยู่ภายนอกร่างกายกวางต่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระ

นำข้อมูลความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของตัวอย่างอุจจาระชุดที่ 2/1-2/4 มาวิเคราะห์หาอิทธิพลของระยะเวลาที่ตัวอย่างอุจจาระอยู่ภายนอกร่างกายก่อนที่จะถูกแช่ในน้ำแข็งที่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระ

2.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค่ามาตรฐานทางสถิติเชิงพรรณนาที่ใช้ในการรายงานและวิเคราะห์ผลการทดลอง คือ ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (sem.) และค่า

สัมประสิทธิ์ของความแปรผัน (C.V.) ที่คำนวณจากข้อมูลภายในชุดตัวอย่างและระหว่างชุดตัวอย่าง

ค่ามาตรฐานทางสถิติเชิงอนุมานที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบหลายชั้นโดยวิธีของฟิชเชอร์ (Fisher's least significant-difference, LSD)

3. ผลการทดลอง

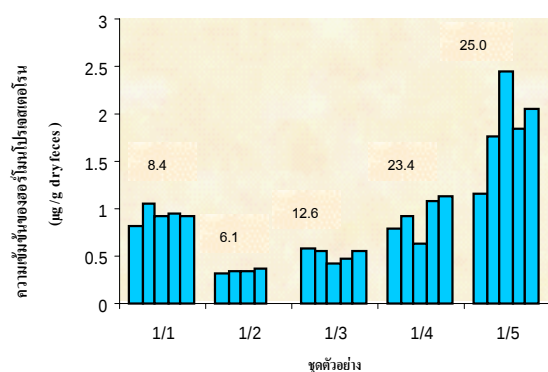
ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm \text{sem.}$) ของปริมาณความชื้นในอุจจาระของกวางตัวที่ 1 เท่ากับ $29.9 \pm 0.5\%$ และตัวที่ 2 เท่ากับ $9.9 \pm 0.1\%$ ซึ่งปริมาณความชื้นที่วัดได้มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

3.1 ประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด

ปริมาณของสาร ^{125}I -Progesterone ที่ได้กลับคืนมาหลังจากตัวอย่างอุจจาระผ่านกระบวนการสกัด มีค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm \text{sem.}$) เท่ากับ $46.6 \pm 0.4\%$ ของปริมาณสาร ^{125}I -Progesterone ที่เติมลงไปในตัวอย่างเป็น

3.2 การกระจายของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกองอุจจาระของกวางป่าไทย

ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของแต่ละตัวอย่างย่อยในกองอุจจาระของกวางตัวที่ 1 (ชุดที่ 1/1) และกวางตัวที่ 2 (ชุดที่ 2/1-2/4) แสดงผลดังกราฟที่ 1 โดยกราฟแต่ละแท่งแสดงความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแต่ละตัวอย่างย่อยภายในชุดตัวอย่าง และตัวเลขเหนือแท่งกราฟแสดงค่า C.V. ของชุดตัวอย่าง



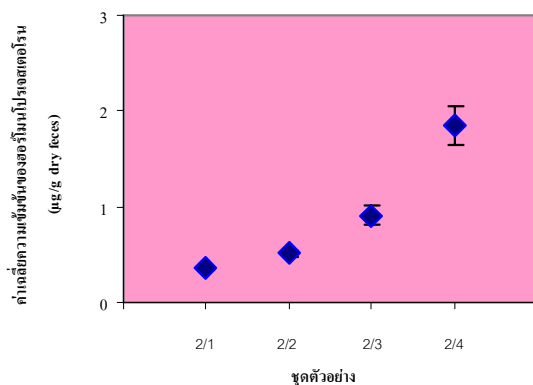
กราฟที่ 1 การกระจายของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเม็ดอุจจาระภายในกองอุจจาระ

จากกราฟความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่วัดได้จากตัวอย่างย่อยในกองอุจจาระของกวางตัวที่ 1 และกวางตัวที่ 2 ที่มีระยะเวลาก่อนการแช่แข็ง 0 ชั่วโมง (ชุดที่ 1/1 และ 2/1) มีค่า C.V. ต่ำ (<10%) ส่วนตัวอย่างที่มีระยะเวลาก่อนการแช่แข็ง ≥ 3 ชั่วโมง (ชุดที่ 2/3 และ 2/4) มีค่า C.V. สูง (>20%)

หมายเหตุ เนื่องจากขณะทำการทดลองหาลดทดสอบของตัวอย่างชุดที่ 2/1 ได้รับความเสียหายจำนวน 1 หลอด ดังนั้นจำนวนตัวอย่างของตัวอย่างชุดที่ 2/1 จึงมีจำนวนเพียง 4 ตัวอย่าง

3.3 อิทธิพลของระยะเวลาที่อุจจาระอยู่ภายนอกกร่างกายกวางต่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระ

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในอุจจาระของชุดตัวอย่างที่ 2/1-2/4 แสดงผลดังกราฟที่ 2



กราฟที่ 2 อิทธิพลของระยะเวลาที่ตัวอย่างอุจจาระอยู่ภายนอกกร่างกายสัตว์ต่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระ

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ตัวอย่างอุจจาระอยู่ภายนอกตัวสัตว์ พบว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของตัวอย่างชุดที่ 2/1 และ 2/2 ไม่แตกต่างกัน ($\alpha=0.05$) แต่ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของตัวอย่างชุดที่ 2/3 และชุดที่ 2/4 แตกต่างกัน และแตกต่างจากชุดที่ 2/1 และชุดที่ 2/2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha=0.05$)

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

กระบวนการสกัดด้วยสารละลายเมทานอลสามารถสกัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระของกวางป่าเพศเมียได้ประมาณ 50% ของฮอร์โมนที่เติมลงไป โดยที่เปอร์เซ็นต์ของปริมาณฮอร์โมนที่สกัดได้จากตัวอย่างทั้งหมดมีความใกล้เคียงกันสูงมาก ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้เปอร์เซ็นต์ของฮอร์โมนที่สกัดได้มีค่าต่ำกว่าบางรายงานที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลและสารละลายอีเทอร์ (Meissier และคณะ, 1990; Morrow และ Monfort, 1998; Kapke และคณะ, 1999; และ Yamaushi และคณะ, 1999) รวมถึงการศึกษาในกวางซีแกซึ่งใช้สารละลายเมทานอลโดย Li และคณะ (2001) แต่ก็มีมีความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี RIA แต่อย่างไรก็ตามความเหมาะสมของระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่สกัดได้ด้วยวิธีการในการทดลองนี้ต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของฮอร์โมนด้วยวิธี EIA จำเป็นต้องมีการศึกษาและทดสอบต่อไป

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการกระจายของฮอร์โมนภายในกองอุจจาระของตัวอย่างอุจจาระมีความสม่ำเสมอสูงซึ่งสอดคล้องกับผลจากรายงานของ Morrow และ Monfort (1998) ต่างจากรายงานของ Millsbaugh และ Washburn (2003) ที่ทำการวัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์จากตัวอย่างอุจจาระของกวาง white-tailed deer ซึ่งปรากฏว่าระดับฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์จากตัวอย่างแต่ละส่วนภายในกองอุจจาระเดียวกันมีค่าแตกต่างกัน ซึ่งให้เห็นว่าการใช้ตัวอย่างอุจจาระอาจมีความจำเพาะต่อชนิดของฮอร์โมนที่ศึกษาและอาจรวมถึงชนิดของสัตว์ด้วย ดังนั้นการศึกษาฮอร์โมนชนิดใดจำเป็นต้องมีการทดสอบหาความเหมาะสมของการใช้ตัวอย่างอุจจาระเสียก่อน

ผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าระยะเวลาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระทั้งต่อการกระจายและความเข้มข้นของฮอร์โมน ดังนั้นการเก็บตัวอย่างอุจจาระเพื่อนำมาวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจึงควรจะ

เก็บตัวอย่างแช่แข็งทันทีหรืออย่างช้าภายใน 1 ชั่วโมง
หลังการเก็บตัวอย่าง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่าย
อุตสาหกรรม โครงการโครงการอุตสาหกรรม สำหรับ
นักศึกษาปริญญาตรี ประจำปี 2546 และทุนนักวิจัยหน้า
ใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่
มอบทุนอุดหนุนงานวิจัย และภาควิชาสัตววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกทางห้องปฏิบัติการ และสหกรณ์กวางแห่ง
ประเทศไทย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ใน
การศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- Kapke, C.A.; Arcese, P.; Ziegler, T.E.; Scheffler, G.R. Estradiol and Progesterone metabolite concentration in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) feces. *J. Zoo and Wildl. Med.* 1999, 30(3), 361-371.
- Li, C.; Jiang, Z.; Jaing, G.; Fang, J. Seasonal change of reproductive behavior and fecal steroid concentration in Pere's David deer. *Horm. Behav.* 2001, 40, 518-525.
- Messier, F.; Desaulniers, D.M.; Goff, A.K.; Nault, R.; Patenaude, R.; Crete, M. Caribou pregnancy diagnosis from immunoreactive progestins and estrogens excreted in feces. *J. Wildl. Manage.* 1990, 54(2), 279-283.
- Millsaugh, J.J.; Washburn, B.E. Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurement. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2003, 132, 21-26.
- Monfort, S.L.; Martinet, C.; Wildt, D.E. Urinary steroid metabolite profiles in female Pere's David deer (*Elaphurus davidianus*). *J. Zoo and Wildl. Med.* 1991, 22(1): 78-85.
- Monfort, S.L.; Wemmer, C.M.; Brown, J.L.; Wildt, D.E. Use of urinary hormone assays for evaluating endocrine patterns associated with the Long-Day breeding season in Eld's deer (*Cervus eldi*). *J. Exp. Zoo. Suppl.* 1990, 4, 215-218.
- Monfort, S.L.; Schwartz, C.C.; Wasser, S.K. Monitoring reproduction in captive moose using urinary and faecal steroid metabolites. *J. Wildl. Manage.* 1993, 57(2) ,400-407.
- Morrow, C.J.; Monfort, S.L. Ovarian activity in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) determined by faecal steroid analysis. *Anim. Reprod. Sci.* 1998, 53, 191-207.
- Morrow, C.J.; Wildt, D.E.; Monfort, G.L. Reproductive seasonality in the female scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Anim. Cons.* 1999, 2, 261-268.
- Stoop, M.A.; Anderson, G.B.; Lasley, B.L.; Shideler, S.E. Use of fecal steroid metabolites to estimate the pregnancy rate of a free-ranging herd of Tule Elk. *J. Wildl. Manage.* 1999, 63(2), 561-569.
- Yamaushi, K.; Hamasaki, S.; Takeuchi, Y.; Mori, Y. Application of enzyme immunoassay to faecal steroid analysis in sika deer (*Cervus Nippon*). *J. Reprod. and Develop.* 1999, 45 (6), 429-434.