

RELACIONES ENTRE MASTITIS SUBCLINICA, EL NIVEL DE PROGESTERONA EN LECHE DESCREMADA Y EL DIAGNOSTICO REPRODUCTIVO DE VACAS LECHERAS

Relationship between Subclinical Mastitis, Progesterone Concentration in Skim Milk
and the Reproductive Diagnostic in Dairy Cows

Lilido Nelson Ramirez Iglesia'
Eleazar Soto Belloso**
Horacio Pavesi***
Adelina Diaz de Ramirez'

* Nucleo Universitario Rafael Rangel,
Universidad de Los Andes,
Trujillo, Estado Trujillo, Venezuela.

** Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad del Zulia,
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

*** Practica Privada.

RESUMEN

En 67 vacas Hoistein, se realizó el California Mastitis Test (CMT), tomándose una muestra de leche de cada cuarto y una muestra de leche mezclada de todos los cuartos de cada vaca. Las muestras se descremaron a 3.000 rpm x 10' a 4°C y almacenaron a -20°C, hasta la determinación de la progesterona (P₄) por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando un Kit de RIA progesterona - FAO/IAEA. El status reproductivo de las vacas fue evaluado a nivel de campo y luego confrontado con los resultados del RIA, considerando como cuarto sano, aquel que fue negativo al CMT. Se calculó el coeficiente de variación intercuartos de la siguiente forma: a) tomando como media el valor de P₄ observado en la muestra de leche mezclada (CVIQP₄) y; b) el promedio de los valores de P₄ de todos los cuartos de cada vaca (CVIQP₄-A). El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 3,3 y 10,4, respectivamente. El 74,6% de las vacas presentó mastitis subclínica, lo que equivale al 43,3% de los cuartos analizados. El CVIQP₄ fue de 31,3 ± 18,5 y el CVIQP₄-A de 27,7 ± 18,4, siendo estas medidas estadísticamente iguales (P > 0,05). El CVIQP₄ no fue diferente (P > 0,05) para vacas sanas, para vacas con todos los cuartos afectados y con uno o varios cuartos enfermos. fue de 27,3 ± 13,7; 37,2 ± 19,3 y 31 ± 20, respectivamente, y en aquellas con niveles de P₄ < 5 nmol/l o 4 nmol/l fue de 27,6 ± 21,6 y 33,7 ± 16,6, medias que estadísticamente no son diferentes (P > 0,05). En animales con uno o varios cuartos afectados y niveles de P₄ > 1 nmol/l, se observó que en el 19,1% y 9,6% de los cuartos afectados, las concentraciones de P₄ fueron mayores, menores o iguales a aquellos de los

cuartos sanos. lo que representa el 28%, 44% y 16% de las vacas respectivamente; en tanto que, en el 12% de ellas se observaron variaciones en ambas direcciones. En este estudio, en el 67,2% de las vacas, los niveles de P₄ fueron > 1,6 nmol/l, de las cuales el 67,7% fue diagnosticada preñada y el 32,3% cíclicas; en el 32,8% restante, los niveles de P₄ fueron < 1,6 nmol/l y se diagnosticaron 81,8% en anestro postparto; 9,2% anestro postservicio; 4,5% celo anovulatorio y 4,5% en metaestro reciente (C 4 días). Los resultados del RIA coincidieron con los de campo. Parece que la mastitis subclínica no afectó el diagnóstico reproductivo. Las variaciones observadas (CVIQP₄) es posible que se deban a diferencias en el muestreo y los métodos y manipulaciones del laboratorio.

Palabras claves: Progesterona, leche descremada, mastitis subclínica, vacas, diagnóstico reproductivo.

ABSTRACT

California Mastitis Test (CMT) was performed to 67 Holstein cows. One milk sample from each quarter and one sample from a pool of the four quarters was obtained from each cow. The samples were centrifuged at 3.000 rpm for 10 minutes at 4° C to harvest the skim milk and stored at -20° C until the progesterone (P₄) radioimmunoassay (RIA). The progesterone RIA Kit from FAO/IAEA was used to determine skim milk progesterone concentrations. The intra and interassay variation coefficient were 3.3 and 10.4 respectively. Reproductive records from each cow were compared with P₄ mean values obtained by RIA. Negative CMT quarters were considered healthy. An interquarter coefficient of variation from each animal was calculated, as following: a) Taking as a P₄

mean value the one determined from the pool sample (IQVCP₄); and b) Taking as a P₄ mean value the all quarters average of each cow (IQVCP_{4-A}). Subclinical mastitis was detected in 74.6% of the cow or 43.3% of the total quarters studied.

There was no difference ($P > 0.05$) between IQVCP, (31.3 ± 18.5) and IQVCP_{4-A} (27.7 ± 18.4). The IQVCP, was not different ($P > 0.05$) for cows free of subclinical mastitis (27.3 ± 13.7), the cows with mastitis in all quarters (37.2 ± 19.3) and cows with one or more mastitic quarters (31 ± 20). This IQVCP, was not statistically different ($P > 0.05$) in those cows which P₄ levels were $< 5 \text{ nmol/l}$ (27.6 ± 21.6) or $> 5 \text{ nmol/l}$ (33.3 ± 16.6). In the animals with one or more mastitic quarters and P₄ concentration $> 1 \text{ nmol/l}$, the following cases were observed: the P₄ values were higher, lower or equal in affected compared to healthy quarters in 19.1%; and 9.6% of the quarters, respectively, or 28%, 44% and 16% of the cows, respectively. Whereas, in 12% of the cows, variations in both way were observed. From this study, 67.2% of the cows were detected with P₄ levels $> 1.6 \text{ nmol/l}$. they were found to be; pregnant 67.7% and 32.3% postpartum cyclic cows; in the rest (32.8%) the P₄ were $< 1.6 \text{ nmol/l}$. These cows were: 81.8% postpartum anestrus, 9.2% postservice anestrus, 4.5% anovulatory estrus and 4.5% early metestrus (< 4 days). These data indicated an agreement between farm record and RIA results for P₄. It appears that subclinical mastitis did not affect the diagnosis made with P₄. The variation observed was probably due to differences in the sampling procedures, laboratory methods or handling.

Key words: Progesterone, skim milk, subclinical mastitis, cows, reproductive diagnostic.

INTRODUCCION

Desde que fue demostrada la presencia de progesterona en leche de vacas (P₄L) y las fluctuaciones de sus niveles fueron atribuidas a la presencia de un cuerpo lúteo funcional. la concentración de P₄L se ha usado ampliamente para monitorear el status reproductivo y mejorar la eficiencia reproductiva en el ganado vacuno. Sin embargo, en la leche descremada se han reportado los valores más bajos de progesterona^[1,5], así como también resultados contradictorios. en cuanto a sus niveles en muestras de leche provenientes de cuartos sanos y con mastitis. Algunos autores han señalado una disminución asociada a un cuadro de mastitis; (Fayemi y col. 1981; Anderson, et al. 1983 y Laitinen, 1983), citados por Laitinen^[4]. Otros autores^[3] encontraron que la concentración de P₄ fue menor en las muestras de leche provenientes de cuartos con mastitis que en la de los cuartos sanos; esa diferencia osciló del 14 al 29% cuando el nivel de la hormona en leche fue mayor de 5 nmol/l , sugiriendo que esa disminución se debió al proceso inflamatorio antes que a la presencia de bacterias; por otro lado. no se encontró diferencias significativas en los niveles de P₄ en leche proveniente de cuartos sanos o con mastitis

subclínica. indicando que la inflamación de la ubre no afectó la concentración de progesterona en leche, Fayemi y col., 1982, citado por^[4], encontró que la incubación de Staphylococcus aureus en leche con progesterona exógena resultó en una elevación en el contenido de progesterona.

Cuando la mastitis se hace clínica, se caracteriza por severas anomalías en la leche. haciendo que dichas muestras sean inmediatamente descartadas para la determinación de P₄L; pero cuando la muestra proviene de cuartos con mastitis subclínica. la leche parece normal.

Se ha estimado que el 40% de las vacas están afectadas con algún grado de mastitis subclínica en uno o mas cuartos^[10]; en tanto que, para la región Trujillo, se ha reportado una prevalencia del 58%^[7]. El California Mastitis Test, se usa rutinariamente en aquellas fincas donde se realizan controles de mastitis y en investigaciones a nivel de campo. El objetivo de este trabajo fue el de estudiar el efecto que la mastitis subclínica diagnosticada por CMT, tenía sobre la concentración de progesterona en leche descremada y si ello afectaba el diagnóstico reproductivo por la determinación directa de esta hormona en dicho fluido biológico.

MATERIALES Y METODOS

En una finca lechera ubicada en los Andes venezolanos. a unos 1.950 metros sobre el nivel del mar, se estudiaron 67 vacas Holstein, las cuales eran ordeñadas tres veces al día (3x). Al inicio del ordeño de la mañana, se realizó el California Mastitis Test (CMT) (INTERVET^{MR}). Inmediatamente en tubos de plástico (10 ml) adicionados con dicromato de potasio, se colocaron las muestras de leche de cada vaca. extraídas de cada cuarto. y en un tubo la mezcla de los cuatro cuartos (muestra de leche mezclada). Las mismas fueron colocadas en una cava con hielo, a una temperatura aproximada de 5°C y así trasladadas al laboratorio, donde fueron centrifugadas a 3.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C para descremarlas; luego, se trasegaron a viales y almacenaron a -20°C hasta su procesamiento para la determinación directa de progesterona por radioinmunoanálisis (RIA); utilizando el Progesterona RIA Kit provisto por la FAO/IAEA. De los registros individuales de cada vaca se tomó la información referida a fechas: último parto. último celo y último servicio y, el número de partos de cada vaca; un médico veterinario evaluó el status reproductivo de cada animal bajo estudio, se registró la fecha de la toma de muestra y en base a esta información. los datos fueron confrontados con los resultados? del RIA para progesterona. y así establecer por el nivel de P₄, el diagnóstico reproductivo.

Los resultados del CMT se evaluaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. tomándose como cuarto sano, el que resulto negativo y, afectado o con mastitis subclínica. aquel cuya lectura fue diferente.

Con las concentraciones de progesterona de cada cuarto. se calculó el coeficiente de variación intercuarto, tomando como media para cada vaca, el valor de P₄ observado en la muestra de leche mezclada (CVIQP₄); así

se determinó el CVIQP, para: a) todas las vacas; b) vacas sanas sin mastitis subclínicas en los cuatro cuartos; c) vacas con mastitis en los cuatro cuartos; d) vacas con mastitis en uno o varios cuartos; e) vacas con concentraciones de $P_4 < 5 \text{ nmol/l}$ y $> 5 \text{ nmol/l}$. Solamente se consideraron los animales cuyos valores de P_4 fueron $> 1 \text{ nmol/l}$. Tomando 1 nmol/l de diferencia, se estableció la variación (%) (aumento, disminución o igualdad) en los niveles de P_4 del número de cuartos afectados, con respecto al número de cuartos sanos, tomándose solamente el total de cuartos de aquellas vacas en las que se detectó cuartos sanos y enfermos; además se cuantificó esta variación (%) por vaca.

Se calculó también, el coeficiente de variación intercuarto de todas las vacas, tomando el promedio aritmético de las concentraciones de P_4 de los cuartos de cada vaca ($\text{CVIQP}_4\text{-A}$) y se comparó con el CVIQP, mediante una prueba de $T^{(1)}$. Igualmente, sólo se tomaron en cuenta los animales cuyas concentraciones de progesterona fueron $> 1 \text{ nmol/l}$.

Se tomó una concentración de progesterona $> 1,6 \text{ nmol/l}$ como indicador de actividad luteal^[9]; el coeficiente de variación intra e interensayo fue de 3,3 y 10,4 respectivamente, calculando de acuerdo al método de Cekan^[2].

RESULTADOS Y DISCUSION

El 74,6% de las vacas, presentó algún grado de mastitis subclínica en uno o varios cuartos, lo que equivale al 43,3% del total de cuartos analizados. El coeficiente de variación intercuarto para las concentraciones de progesterona de cada vaca (CVIQP) fue de $31,3 \pm 18,5$ con un valor mínimo de 8,1 y uno máximo de 84,3; esta variación intercuarto ha sido reportada para leche descremada^[5], indicando que cualquier cuarto puede ser utilizado para determinar progesterona en leche descremada sin reducir la precisión del ensayo para diagnosticar preñez o celo. El CVIQP, para vacas que exhibieron todos los cuartos sanos, todos los cuartos afectados o con diversos grados de mastitis subclínica en uno o varios cuartos fue de $27,3 \pm 13,7$; $37,2 \pm 19,3$ y 31 ± 20 respectivamente; estas medias no fueron estadísticamente diferentes ($P < 0,05$); se observó un mayor CVIQP, en aquellas vacas que tuvieron algún grado de mastitis subclínica en todos los cuartos. Para aquellos animales cuyos niveles de progesterona fueron $< 5 \text{ nmol/l}$ o $> 5 \text{ nmol/l}$, el CVIQP, fue de $27,6 \pm 21,6$ y $33,3 \pm 16,6$ respectivamente; medias éstas que no fueron estadísticamente diferentes ($P < 0,05$); al respecto^[9], reportan coeficientes de variación que oscilan entre 22 y 36 para concentraciones de progesterona menores y mayores de 8 mg/ml respectivamente, y, señalan elevados coeficientes de variación de acuerdo al método de muestreo y concluyen que fue el estado del ciclo estral o preñez, lo que predominantemente influyó sobre las

concentraciones de progesterona en leche de vacas^[9]. De los cuartos sanos pertenecientes a 25 vacas que exhibieron uno o varios cuartos afectados de mastitis subclínica, el 47,8% fue diagnosticado afectado; de éstos en el 19,1% los niveles de P_4 fueron mayores y en el 19,1% menores con respecto a las concentraciones de P_4 de los cuartos sanos; en tanto que, en el 9,6% de los cuartos afectados, los valores de P_4 permanecieron iguales al de los sanos; esto equivale a que en el 28%, 44% y 16% de las vacas la concentración de P_4 aumentó, disminuyó o permaneció igual en los cuartos afectados, con respecto a los sanos. Por otro lado, en el 3% de ellas se observaron variaciones en ambas direcciones (aumento y/o disminución).

Han sido reportados efectos contradictorios en la mastitis subclínica en relación a los niveles de P_4 en leche. Asimismo Kassa y col., 1987, reportaron^[3] que las concentraciones de progesterona fueron menores en los cuartos afectados que en los sanos, cuando los valores de P_4 fueron mayores de 5 nmol/l y que esta disminución fue del 14,4% al 29,6% en tanto que en concentraciones menores a 5 nmol/l no disminuyó significativamente; igual reporte fue hecho, trabajando con leche completa^[6], pero estos mismos autores no encontraron diferencias en los valores de P_4 entre cuartos normales y afectados; semejantes hallazgos fueron señalados^[4]; otros autores no encontraron relaciones entre la mastitis subclínica y las concentraciones de progesterona en leche^[6,12]. Además fueron indicadas diferencias significativas (disminución) para el 12-16 día del ciclo estral, pero no durante la preñez entre cuartos afectados y sanos^[1,3]; sin embargo, la mastitis subclínica no afecta el contenido de progesterona en leche en una forma tal que pueda alterar el diagnóstico reproductivo^[3,4]. El $\text{CVIQP}_4\text{-A}$ fue $29,7 \pm 18,4$ con un valor mínimo de 2 y máximo de 82,5. La prueba de "t" para el CVIQP, y el CVIQP, arrojó como resultado, que las medias no fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$), no obstante creemos conveniente para este tipo de estudio, determinar la concentración de P_4 en una muestra de leche mezclada proveniente de todos los cuartos de cada animal.

El 67,2% de las vacas tenían un cuerpo luteo funcional, ya que mostraron niveles de $P_4 > 1,6 \text{ nmol/l}$. De éstas, el 67,7% fueron diagnosticadas preñadas y el 33,3% cíclicas postparto en diferentes fases del ciclo estral; el 32,8% exhibieron niveles de $P_4 < 1,6 \text{ nmol/l}$ de las cuales, el 81,8% fueron diagnosticadas en anestro postparto, el 9,2% en anestro postservicio, 4,5% con celo anovulatorio y 4,5% en metaestro reciente (< 4 días). Los resultados del RIA para P_4 coincidieron con los datos obtenidos de los registros individuales de las vacas y con los aportados por el médico veterinario a nivel de finca. Este estudio señala que la mastitis subclínica no afectó la concentración de progesterona en leche descremada, de manera tal que alterara la confiabilidad del diagnóstico reproductivo basado en la cuantificación de progesterona en muestras provenientes de uno o varios cuartos. La amplia variación intercuarto en los niveles de P_4 en leche descremada, se debe posiblemente, a diferencias en el muestreo y en la metodología del laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico Y Tecnológico de la Universidad de Los Andes. por el apoyo financiero a través del Proyecto NURR C-80-90; a la Agencia Internacional de Energía Atómica, por suplir los RIA Kit para progesterona; y al Postgrado en Producción Animal de la Universidad del Zulia, por permitir el uso del Laboratorio de Radioisótopos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bulman, D.C. The measurement of progesterone in milk Br. Vet. J., 135: 460-461. 1979.
- [2] Cekan. S.Z. Realibility of steroid radiomunoassay. Uppsala University, Sweden. ph.D. Thesis. 1976.
- [3] Kassa, T.; Ahlin, K.A.; Larsson, K.; Kindahl, H. The effect of mastitis on milk progesterone concentration in dairy cows. Dairy Science Abstracts 49(8): 606. 1987.
- [4] Lattinen, J.T. Level and distribution of progesterone in bovine milk: Effects of mastitis and milk composition. British Veterinary Journal. 142: 562. 1986.
- [5] McCaughey, J.W. and Gordon, F.J. Milk progesterone assay: A comparison of interquarter and sampling time variation. Br. Vet. J. 135: 512. 1979.
- [6] Ogura, Y.; Takano, T.; Miyagawa. J. Effect of bovine mastitis on progesterone assay in milk Dairy Science Abstracts. 52 (5): 403. 1990
- [7] Osechas, A. Prevalencia de mastitis subclínica en el Estado Trujillo. Biblioteca Aquiles Nazoa, Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes-Trujillo. Trabajo de Ascenso. 1986.
- [8] Oltner, R. and Edquist, 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. 137: 78-87. 1981
- [9] Pennington. J.A.; Spahr, S.L. and Lodge, J.R. Influences on progesterone concentrations in bovine milk. J. Dairy Sci. 64: 259-266. 1981.
- [10] Phiiptot, Nelson W. Mastitis Management. 2nd. Edition. Babson Bros. Co. Oak Brook. Illinois. USA. pp. 84. 1984.
- [11] Steel, Robert G.D. y Torrie. James H. Bioestadísticas: Principios y Procedimientos. Segunda Edición. McGraw-Hill. Bogota, Colombia. pp. 83-117. 1985.
- [12] Zycrko, N. The concentration of progesterone in milk of primiparous cows with udders in different status of health during lactation. Dairy Science Abst. 48(11): 753. 1986.
- [13] Zyczko. K. Levels of progesterone in milk from different adders quarters in primiparous cows. Dairy Science Abstracts. 48(11): 754. 1986.

EVENTOS CIENTÍFICOS INTERNACIONALES

| Fecha | Evento | Lugar |
|---------------------------------------|--|---|
| 02-06. February, 1993 | 2nd Biennial Meeting of the American Society of Tropical Veterinary Medicine | Guadaloupe. French West Indies |
| 05-07, February, 1993 | Indiana Veterinary Medical Association, 109th Annual Meeting | Indianapolis. Indiana USA. |
| 12-14. February, 1993 | Missouri Veterinary Medical Association, 101st Annual Convention | Osage Beach. Missouri. U.S.A. |
| 27, February, 1993 06, March, 1993 | The 21st Annual Southeastern Veterinary Medical Association Meeting | Kauai, Oahu Maui and Hawaii. U.S.A. |
| 28, February, 1993 02, March, 1993 | 42nd Western Poultry Disease Conference | Sacramento, California U.S.A. |
| 11-13, March, 1993 | 2nd International Symposium of Veterinary Echography | Nice, France. |
| 13-18, March, 1993 | American Animal Hospital Association, 60th Annual Meeting and Spring Management Conference | Seattle Washington USA. |
| 17-20. March, 1993 | Basic Course, Surgical Fixation of Fractures and Nonunions (Canine and Equine Sections) | Columbus, Ohio. U.S.A |
| 02-04. April, 1993 | 30th Annual Veterinary Conference and Alumni Reunion | Athens, GA USA. |
| 13-17. April, 1993 | 1993 Hawaii Veterinary Symposium on Small Animal Orthopedics. | Oahu, Hawaii U.S.A |
| 21-24, April, 1993 | The 20th Congress of the German Veterinary Medical Society | Bad Nauheim (near Frankfurt/Main) Germany. |
| 12-17, July, 1993 | XIII ALPA Meeting (Latinoamerican Association of Animal Production) | Santiago, Chile |
| 28, June, 1993 02, July, 1993 | VII Animal Production World Conference | Edmonton, Canada |
| Date to be announced, 1995 | 25th World Veterinary Congress. | Yokohama, Japan. |