VALIDACION DE UN ELISA PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) EN LECHE DE VACA

López Díaz M. Cruz y Carlos Cadórniga Valiño
Centro de Investigaciones Agrarias (CIAM). Apdo 10 La Coruña 15080

Introducción

Una buena detección del celo en ganado vacuno es crucial para registrar índices reproductivos óptimos. Se han probado múltiples métodos detectores del celo con resultados no satisfactorios (falsos positivos y negativos). En la vaca la ovulación ocurre 25-29 horas después de la descarga preovulatoria de la hormona luteinizante (LH). La detección de esta subida por un método fiable y rápido podría servir para elegir el momento óptimo de inseminación. Sólo dos trabajos sobre la presencia de LH en leche han sido publicados (Schams y Karg 1986, Johnson y Reeves 1988) y sus resultados son contradictorios. El pico preovulatorio de LH en sangre a veces dura una hora, por lo que si la LH pasa de la sangre a la leche y queda acumulada en la mama, el desarrollo de un análisis capaz de detectar su presencia cada doce horas entre ordeño y ordeño tendría un valor indudable. Este trabajo fue diseñado para desarrollar un ELISA capaz de detectar un incremento en la concentración de LH en leche que corresponda al pico preovulatorio de dicha hormona en plasma inducido después de aplicar GnRH.

Animales y muestreo

En el experimento se usaron cuatro vacas Frisonas en lactación con ciclos estrales regulares. Se cogieron muestras de sangre y leche de todos los cuarterones de las cuatro vacas en fase luteal antes de inyectar 5 ml de GnRH i.v. (Buserelin). Previo al tratamiento de GnRH se tomó una muestra de sangre y se canuló la yugular de todos los animales para realizar un muestreo sanguíneo intensivo (cada hora durante 6 horas post-tratamiento). La sangre se recogió en tubos heparinizados que se centrifugaron durante 15 minutos a 1.500 X g; el plasma se conservó congelado a -20ºC hasta su análisis.

Después de tomar la primera muestra de leche, se extrajo la leche restante con ordeñadora automática y el muestreo de leche post-tratamiento de GnRH fue realizado cada hora durante seis horas en dos cuarterones por un ordeñador experimentado. A las 6 y 12 horas después de la administración de GnRH se muestrearon el tercer y cuarto cuarterón. Después de cada muestreo el ordeñador extraía la leche restante del cuarterón muestreado. La leche refrigerada se analizó el mismo día.

ELISA

La validación del ELISA se hizo para LH de bóvidos siguiendo el método de Spearow (1987) con algunas modificaciones. Brevemente, se tapizaron las placas NUNC con anticuerpo frente a la LH bovina a una dilución 1/25.000 (Atc bLH cedido por el Dr. J. J. Reeves, Universidad del Estado de Washington, Pullman). Para ello se añadieron 100µl en cada pocillo del Atc diluido en tampón de tapizado (TT; carbonato sódico 0,05M pH=9,6) y después de una incubación de 24 hrs a 20ºC se lavó la placa seis veces con tampón de lavado (TL; 0,02M Na_2HPO_4, 0,12M ClNa, 0,025% Tween 20, 0,005% Digluconato de Clorohexidina; pH=7,2). Inmediatamente después se añadieron 50µl de tampón análisis (TA; 0,04M MOPS, 0,10ClNa, 0,1% Gelatina, 0,05% Tween 20, 0,01M EDTA, 0,002% Rojo fenol, 0,005% Digluconato de Clorohexidina; pH=7,2) en todos los pocillos y 50µl de los estándares bLH o muestra (diluida con TA a 1:2). Los estándares de bLH se

realizaron en TA a las concentraciones siguientes: 10ng/ml, 4ng/ml, 1ng/ml, 400pg/ml y 100pg/ml.

La placa se incubó toda la noche a 20ºC en un humidificador. Al día siguiente se añadieron 50µl del conjugado (realizado según el método de Nakane P. K; 1980) diluido 1000 veces con TA y se incubó toda la noche a 4ºC en un humidificador. Después de lavar 8 veces con TL se añadieron 100µl de sustrato específico para la peroxidasa. Se usó la tetrametilbenzidina 75µl diluida en 15 ml de tampón sustrato (TS 0,05M Fosfato-citrato, 0,5M H_2O_2 pH=4,4). Se paró la reacción con 50µl de 0,5M SO_4H_2 y se leyeron las absorbancias a 450 nm.

Para validar el ELISA en leche se realizaron los patrones a las siguientes concentraciones: 20, 10, 5, 1 y 0,5 ng/ml en **TA**, leche fresca (**LF**) de vaca preñada (con concentraciones de LH muy bajas en sangre), suero de leche fresca con LH obtenido por centrifugación a 10.000 X g durante 30 minutos (**Suero**), suero extraído por centrifugación a 10.000 X g durante 30 minutos después de congelar la leche fresca con LH a -20º C (**Suero C**) y leche fresca con LH a la que se añadió 1,5 mg EDTA por ml ($\mathbf{LF}_{EDTA}$).

En el experimento realizado con las vacas, se analizó leche fresca. La leche de las muestras previas al tratamiento con GnRH se usó como diluyente para preparar los patrones individuales de cada vaca. A su vez, cada recta patrón se usó para detectar los posibles aumentos de LH en la leche del animal correspondiente.

Resultados

El límite de detección del ELISA fue de 400 pg/ml y la sensibilidad de 150 pg por pocillo. Las rectas paralelas de los patrones hechos con **TA** (y=-7,7x+6,3), **LF** (y=-7x+3,74), **Suero** (y=-6,7x+3,9) y $\mathbf{LF}_{EDTA}$ (y=-5,5x+3,49) nos indican que el análisis se puede realizar en leche fresca con o sin adición de EDTA y que el suero lácteo no tiene ningún compuesto que impida la unión de la LH y el Atc. Sin embargo, los patrones del **Suero C** describieron una recta paralela al eje de las x (y=Absorbancia y x=log concentración).

No se detectaron subidas de LH en leche en ninguna de las vacas, mientras que en sangre, se detectó una subida evidente en todos los animales a la hora de aplicar la GnRH; este incremento duró 3,6± 0,5 horas y tuvo una amplitud de 26,3±14 ng/ml.

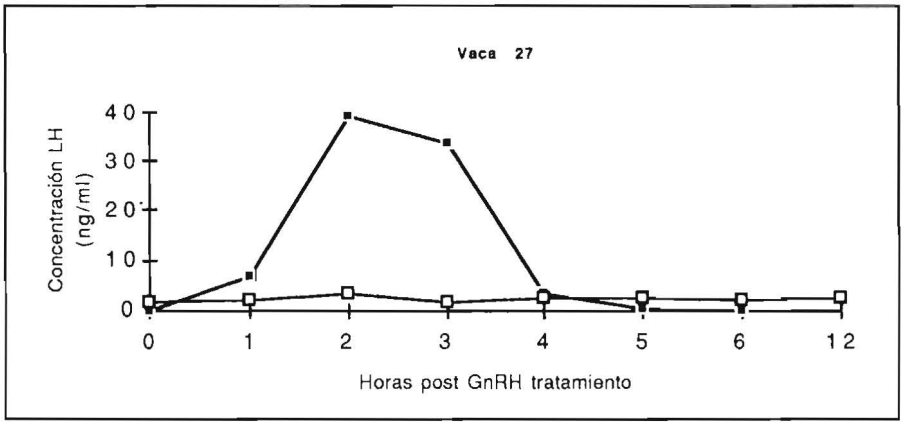
Discusión

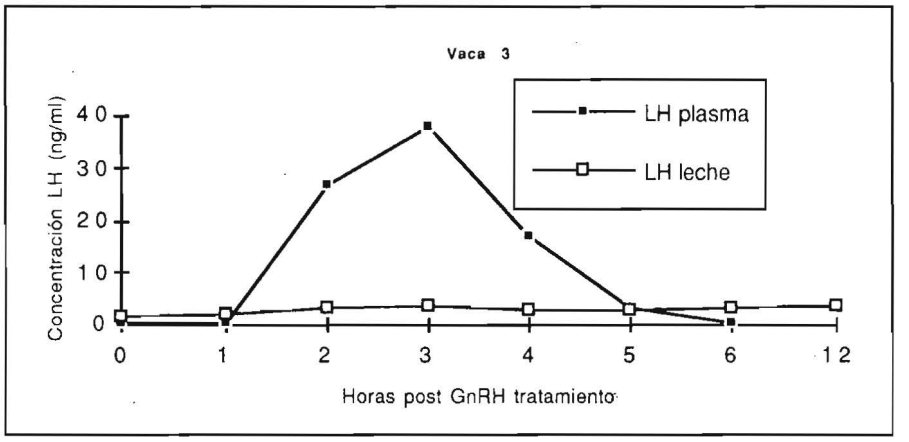
El paralelismo de las rectas de los diferentes patrones indica que con este ELISA se puede medir la LH añadida a la leche fresca sin aditivos, al suero lácteo y a la leche con EDTA. Sin embargo, la congelación no es un método adecuado para la conservación de muestras de leche en las que posteriormente se pretenda analizar LH.

El hecho de haber realizado los patrones en la leche fresca de cada animal recogida antes del tratamiento con GnRH nos asegura la detección del pico de LH si éste se hubiera producido en concentraciones semejantes a las detectadas en plasma.

Las concentraciones basales de LH en el plasma coinciden con las publicadas en otros trabajos en vacas durante la fase luteal (Christensen et al. 1971). Asi mismo, en los animales tratados con GnRH la duración y amplitud del pico de LH concuerdan con lo publicado anteriormente (Kittok et al. 1973). Por otro lado, la

amplitud de este pico (26,3 ng/ml) fue suficiente para detectar cualquier subida de LH en leche si la hormona hubiera pasado desde la sangre.





Gráfica 1 y 2. Concentraciones de LH en plasma y leche en dos vacas en fase luteal después del tratamiento con GnRH (hora 0=inyección de GnRH)

En resumen, en este trabajo se evaluó un ELISA para analizar la LH en leche fresca sin aditivos, suero lácteo y leche con EDTA, las concentraciones de LH en leche no aumentaron pero sí en plasma después de aplicar un choque de GnRH a las vacas. Por tanto, este trabajo concluye que la medición de LH en leche no es un método predictor de la ovulación en vacas lecheras.

Bibliografía

Schams D. y H. Karg. Hormones in milk. Annals New York Acad. Sci. (1986). 464:75.
Johnson H. E. y J. J. Reeves. A luteinizing-releasing hormone-induced serum luteinizing hormone surge is not detectable in the milk of cows. 1988. J. Anim. Sci. 66:442.
Spearow J. L. y Trost B. A. Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for cattle, sheep, rat, and mouse luteinizig hormone 1987. Biol. of Reprod. 37:595-605.
Nakane P. K (1980). "New developments in tissue enzyme labeled immunoassays" Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's, p 157-169.
Christensen J. N., J. N. Wiltbank and M. L. Hopwood 1971. Blood hormone levels during the bovine estrous cycle. J. Anim. Sci.33:251.
Kittok, R. J., J. H. Britt and E. M. Convey. Endocrine response after GnRH in luteal phase cows and cows with ovarian follicular cysts. 1973. J. Anim. Sci 37:985.