

MILK PROGESTERONE PROFILES AS AN AID TO PREGNANCY DIAGNOSIS AND TO FERTILITY CONTROL AT THE THAI-DANISH DAIRY FARM

การวัดระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม เพื่อช่วยในการ ทำนายการตั้งท้อง และตรวจความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนม ณ ฟาร์มโคนม ไทย-เดนมาร์ก

Y. Intraraksa

ยรรยง อินทรรักษา

S. Sirivejaphandhu

สมุทรร สิริเวชพันธุ

P. Chaianan

ทิบูล ไชยอนันต์

S. Sakthaweekulkit

สุวิมล ศักดิ์ท้าวกุลกิจ

Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok Metropolis 10900

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กทม. 10900

บทคัดย่อ

จากการวัดระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมแม่โคพันธุ์ผสม จำนวน 202 ตัว โดยการเก็บตัวอย่างน้ำนมในวันที่ผสมเทียม (วันที่ 0) และวันที่ 5, 7, 12, 20, 28, 35 และ 45 หลังการผสมเทียมตามลำดับ ผลจากการศึกษาระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะต่างๆ ปรากฏว่า และการตรวจท้องโดยการล่วงตรวจรังไข่ทางทวารหนักในวันที่ 60 หลังจากผสมเทียมพบ ว่า แม่โคจำนวน 115 ตัว (115/202 = 56.93%) แสดงอาการเป็นสัดปกติ และสามารถตั้งท้อง ได้ตลอดจนคลอด โดยมีแม่โคจำนวน 15 ตัว (15/115 = 13%) แสดงการเป็นสัดปกติ และผสม ทัดในระยะแรกแต่ตัวอ่อนตายในระยะระหว่าง 28 ถึง 35 วัน ของการตั้งท้อง มีแม่โคจำนวน 31 ตัว (31/202 = 15.35%) มีรอบของการเป็นสัดปกติแต่ผสมไม่ติด แม่โคอีก 15 ตัว (15/202 =

7.43%) มีระดับโปรเจสเตอโรนสูงในวันที่ทำการผสมเทียมแต่ไม่สามารถตั้งท้อง นอกจากนั้นโคจำนวน 29 ตัว ( $29/202 = 14.35\%$ ) แสดงรอบการเป็นสัดไม่สม่ำเสมอและผิดปกติ การผสมไม่ติด ส่วนแม่โคจำนวน 12 ตัว ( $12/202 = 5.94\%$ ) ไม่แสดงรอบการเป็นสัดเลย

### Abstract

Two hundreds and two cross breed dairy cows were used to study the milk progesterone profiles, by a direct radioimmunoassay method, at days 0, 5, 7, 12, 20, 28, 35 and 45 after artificial insemination. It was found that 56.93% (115/202) of the cows had a normal estrus cycle and conceived, but 13% (15/115) of the conceived cows' embryos died between 28 and 35 days of gestation. Totally 43.07% (87/202) of the cows were not pregnant and these cows could be classified into four groups: 15.35% (31/202) of the cows having normal estrus cycle but they did not conceive; 7.43% (15/202) of the cows were inseminated during high progesterone concentration; 14.35% (29/202) of the cows with an irregular cycle; and 5.94% (12/202) was acyclicity.

### Introduction

The use of milk progesterone measurement for the determination of pregnancy was first suggested by Laing and Heap (1971); and subsequent work by Heap *et al.*, (1976), Foote *et al.*, (1979), Booth *et al.*, (1979), Mc Caughey and Cooper (1980), Holdsworth *et al.*, (1980), Shemesh *et al.*, (1983). The development of radioimmunoassay technique (RIA) for the assay of hormones has provided new possibilities for a more precise study of the endocrinological aspects of fertility. The RIA of milk progesterone offers a convenient method of monitoring ovarian activity in a large number of dairy cows. However, later on, the RIA of milk progesterone has been applied in studies of cyclic changes in the ovaries during the postpartum period, the detection of estrus,

determination of conception after artificial insemination, the study of ovarian abnormality, embryonic mortality (Bulman and Lamming, 1978; Foote *et al.*, 1979; Gunzler *et al.*, 1979).

The present experiment was designed to utilize milk progesterone levels at different times after artificial insemination to detect the fertility of dairy herd at the Thai-Danish dairy farm.

### Materials and Methods

*Experimental animals*: Two hundred and two of cross breed cows, age 3-8 years, were used for artificial insemination under routine service at the Thai-Danish dairy farm, Saraburi province, Thailand.

*Milk sampling*: Milk samples were collected at the end of milking period (stripped milk) from the herd on the day of artificial insemination (day 0) and on day 5, 7, 12, 20, 28, 35 and 45 after artificial insemination. Samples of whole milk (20 ml) were taken after the morning milking in clean bottles containing 10 mg of potassium dichromate. Milk samples were mixed and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  awaiting for hormonal assay.

*Milk progesterone assay*: The concentration of milk progesterone was determined by a direct radioimmunoassay procedure described by Kamonpatana *et al.*, (1983). A 20  $\mu\text{l}$  aliquot of milk was mixed with 250  $\mu\text{l}$  of assay buffer. The mixture was added 100  $\mu\text{l}$  progesterone antiserum P/040 (It was prepared in rabbit against progesterone 11 hemisuccinate-bovine serum albumin at Biochemistry Unit, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand) at a working solution of 1 : 15,000, the mixture was incubated at room temperature for 1 hour. One hundred  $\mu\text{l}$  of buffer containing 8,000 cpm  $^3\text{H}$ -progesterone (sp. act. 85 mCi/mol; Radiochemical Centre, Amersham, U.K.) were added and the mixture was incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  for 16-18 hours.

Separation of free and bound  $^3\text{H}$ -progesterone was obtained by adding 200  $\mu\text{l}$  of a suspension containing 0.625% Norit A and 0.0625% dextran in assay buffer, mixing and incubating for 20 minutes at 4°C. The samples were centrifuged at 3,000 g at 4°C for 15 minutes and the supernatant was decanted into mini-vials. After adding 4 ml of counting solution the vials were placed in a 1216 Rack Beta II liquid scintillation spectrometer LKB-Wallace for counting at a counting efficiency of 60%.

*Standard curve:* In each set of assays, a triplicate set of three pools of milk containing 0.32, 2.80 and 17.10 ng unlabelled progesterone in 1 ml of milk was used as control. The standard curve was based on a set of standard progesterone solutions (2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 pg) run in triplicate at the same time as the unknown samples.

The amount of progesterone in milk samples were calculated by 1222 Data Box Radioimmunoassay Calculator LKB-Wallace.

*Validation of radioimmunoassay:* The specificity of antiserum PO/040 was tested for its cross-reaction with various steroids (progesterone 100%); 17-hydroxyprogesterone (0.74%); Corticosterone (0.68%); Cortisol (0.001%); 1-androsterone (0.001%); Testosterone (0.001%); Estradiol 17 B (0.001%); Estrone (0.001%); Estriol (0.001%); 9, 17 B-estradiol (0.001%). The withinassay coefficient of variation (CV), evaluated by three triplicate determination of each three pools in the same assay, for values ranging from 0.32 to 17.10 ng/ml was 8.10%. The betweenassay CV was calculated from the results obtained from three triplicate determinations in ten different assays was 12.50%.

*Clinical observation:* During the whole experimental period the animals were clinically observed and on day 60 after artificial insemination pregnancy was confirmed by rectal palpation. The detection of estrus was carried out by well trained herdsman who observed the animals during the day time.

### Results

The experimental cows could be grouped into four categories according to their progesterone profiles.

I. The first group of the cows was the animal with a normal progesterone profile which conceived after artificial insemination (Table 1, Figure 1). There were 115 cows (56.93%) showed a normal estrus cycle and conceived on the basis of high progesterone levels on the 20<sup>th</sup> day after artificial insemination. The pregnancy was confirmed by rectal palpation at 60<sup>th</sup> day of pregnancy.

Table 1. The average value of milk progesterone concentration in pregnant cows (ng/ml) at various time after artificial insemination.

Day after AI	Mean	S.D.	N
0	0.36	± 0.27	100
5	4.96	± 2.31	97*
7	7.60	± 3.23	99*
12	10.36	± 4.63	99*
20	11.00	± 3.87	99*
28	13.01	± 5.12	100
35	13.87	± 4.80	95*
45	15.86	± 5.82	98*

\*Some milk samples were damaged.

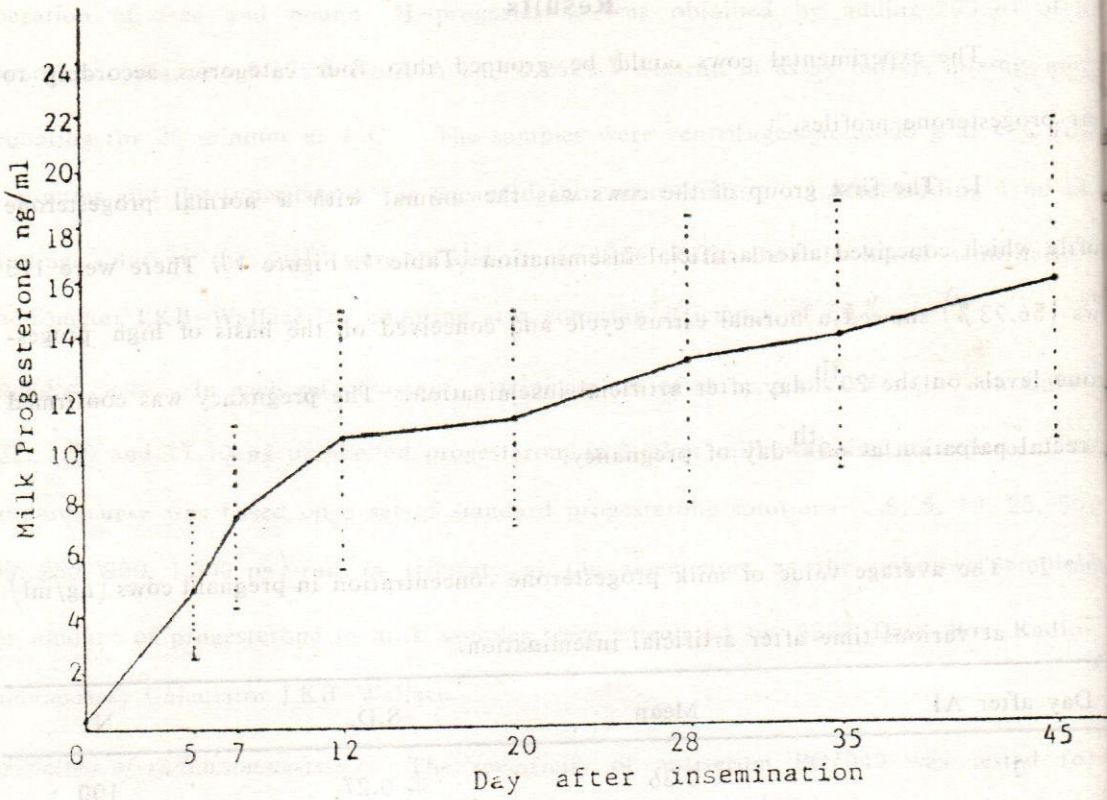


Figure 1. The illustration of mean  $\pm$  S.D. of progesterone profiles in pregnant cows various time after artificial insemination.

However, it was found that there were 15 cows out of 115 conceived cows (13%) showed no pregnancy. The milk progesterone concentration of these cows markedly decreased between the 28<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup> day of gestation. These cows were interpreted as embryonic mortality (Table 2, Figure 2).

Table 2. The average value of milk progesterone concentration (ng/ml) in cows with embryonic loss.

Day after AI	Mean	S.D.	N
0	0.49	± 0.33	15
5	4.98	± 2.48	15
7	6.28	± 2.94	15
12	10.04	± 3.65	15
20	12.02	± 5.43	15
28	13.38	± 7.52	15
35	10.27	± 6.41	15
45	5.94	± 5.29	15

ความสำเร็จ

ผู้เดินกาวยาวยอมสำเร็จ

ผู้เดินกาวเร็วยอมสำเร็จ

ผู้เดินไม่หยุดยอมสำเร็จ

และผู้เดินกาวขามอุปสรรคทางปวงยอมต้องสำเร็จ

พระนิพนธ์ของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว

รัชกาลที่ 6 พระมหาธีรราชเจ้า

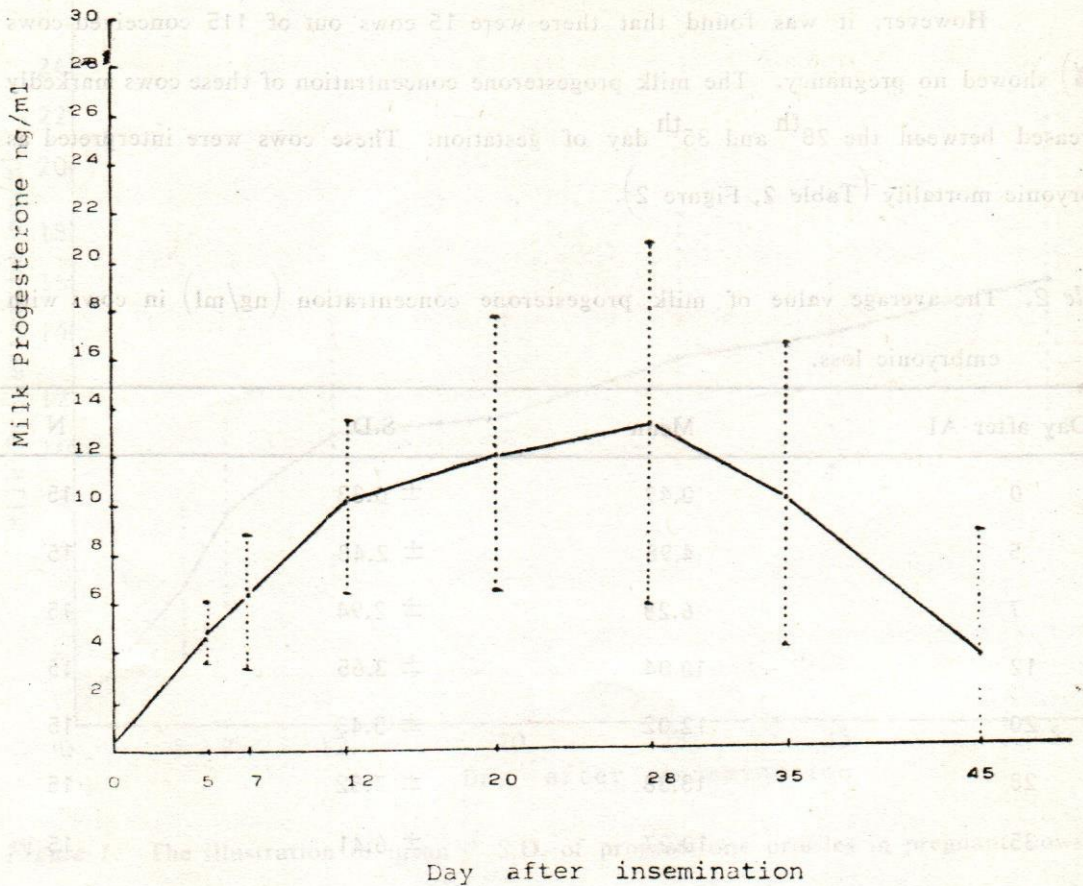


Figure 2. The illustration of mean  $\pm$  S.D. of progesterone profiles of cows which conceived but subsequently the embryo died.

สัตว์แพทยสาร

ฉบับที่ 35 เล่ม 3 กันยายน 252

สัตว์แพทยสาร

ฉบับที่ 35 เล่ม 3 กันยายน 252

สัตว์แพทยสาร

ฉบับที่ 35 เล่ม 3 กันยายน 252

สัตว์แพทยสาร

ฉบับที่ 35 เล่ม 3 กันยายน 252

สัตว์แพทยสาร

ฉบับที่ 35 เล่ม 3 กันยายน 252



II. The second group of total 46 cows (22.78%) had normal progesterone profiles with regular cycling but were not conceived. There were 31 cows (15.35%) showed a low progesterone concentration at day 0 and 20<sup>th</sup> day after artificial insemination (Table 3, Figure 3). In a further 15 cows (7.43%) had a high progesterone concentration at day 0 (Table 4, Figure 4).

Table 3. The average value of milk progesterone concentration (ng/ml) in cows with normal estrus cycle but did not conceive from this insemination.

Day after AI	Mean	S.D.	N
0	0.46	± 0.37	31
5	5.85	± 3.63	31
7	8.45	± 4.20	31
12	10.60	± 6.20	31
20	0.54	± 0.47	31
28	6.74	± 4.31	31
35	8.40	± 4.49	31
45	3.19	± 2.22	31

น้ำฝน น้ำตา วาดกั๊ย  
 น้ำเอียนน้ำฝน  
 เจ้าจะหล่นลงมาแก้ท่าไหน  
 หยาดน้ำตาขารวมท่วมท้นใจ  
 วาดกั๊ยพิศซากระหน่ำเต็ม  
 แสนสาหัสซัดสนนาลนหลัง  
 บ้านเรือนพังพินาศสตรวยเหิม  
 จะเหลียวมองทางใดไม่เหมือนเดิม  
 นายงเทมบ้านของพงหมดหวังเอย

“เอกวิษณุ”  
 บรมเรงควรรคศิลป์  
 ไทอรุ้ 29 กันยายน 2527

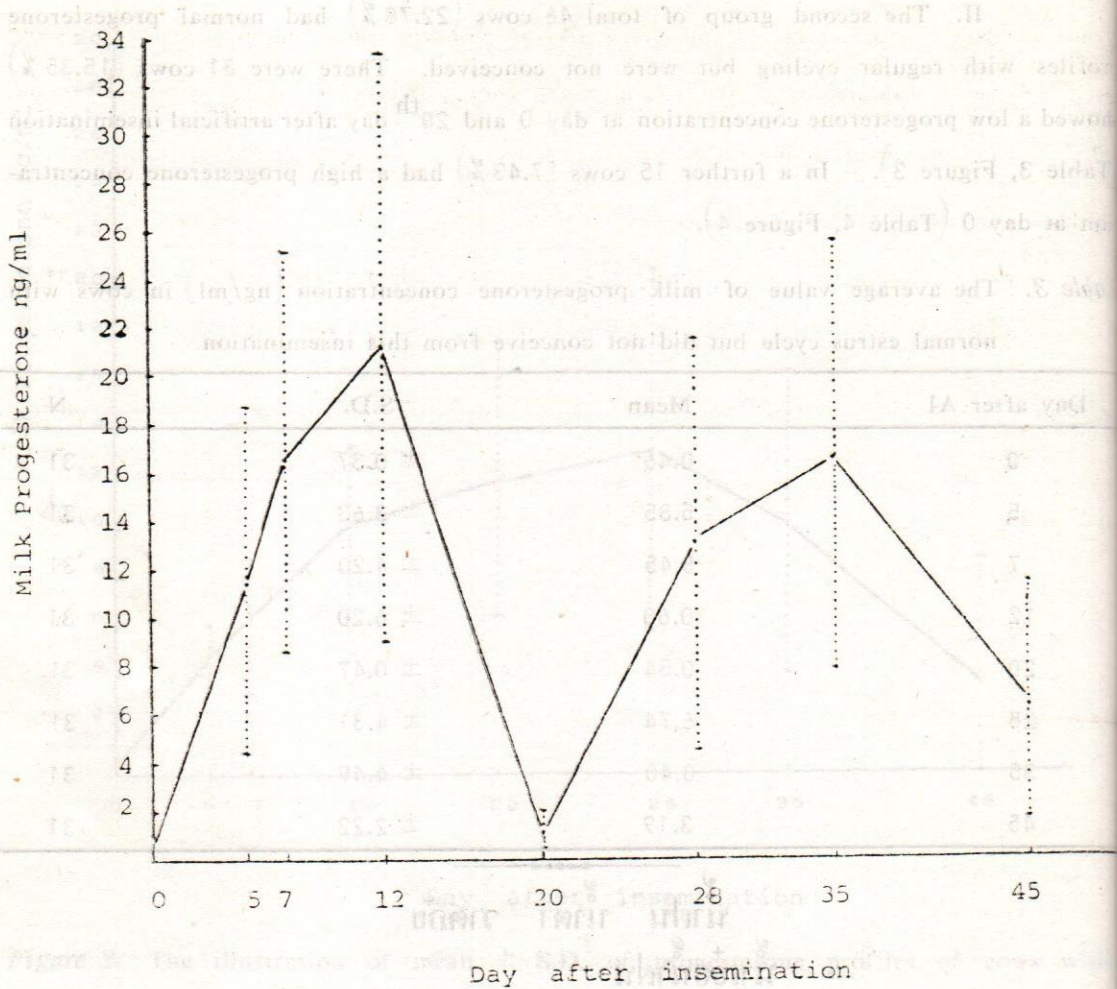


Figure 3. The illustration of mean  $\pm$  S.D. of progesterone profiles in cows with normal estrus cycle but did not conceive.

Table 4. The average value of milk progesterone concentration (ng/ml) in cows which were inseminated at the wrong time, when progesterone levels were high at day 0. None of them conceived.

Day after AI	mean	S.D.	N
0	3.93	± 3.59	15
5	7.02	± 4.57	15
7	8.75	± 5.22	15
12	11.80	± 6.96	15
20	3.60	± 4.79	15
28	7.76	± 7.27	15
35	9.08	± 4.10	15
45	3.94	± 2.86	15

สักวากาลเปลี่ยนไปไม่สิ้นสุด  
 ไม่เคยหยุดรอรังสักครึ่งหน  
 ทกขวัตตองตอสู้อยูเป็นคน  
 ต่างคนรบบ้างทนทุกข์บ้างสุขดี  
 เมื่อกำเนิดเกิดมามองตาโลก  
 อัยารอโชคลอยเซยเกยถึงที่  
 ควรคิดอ่านหางานทำตามทัม  
 ทกนาที่ล้วนมีค่าอย่าช่าย

พรทิพย์ ภาโสภะ

สยามรัฐ 6 ธันวาคม 2527

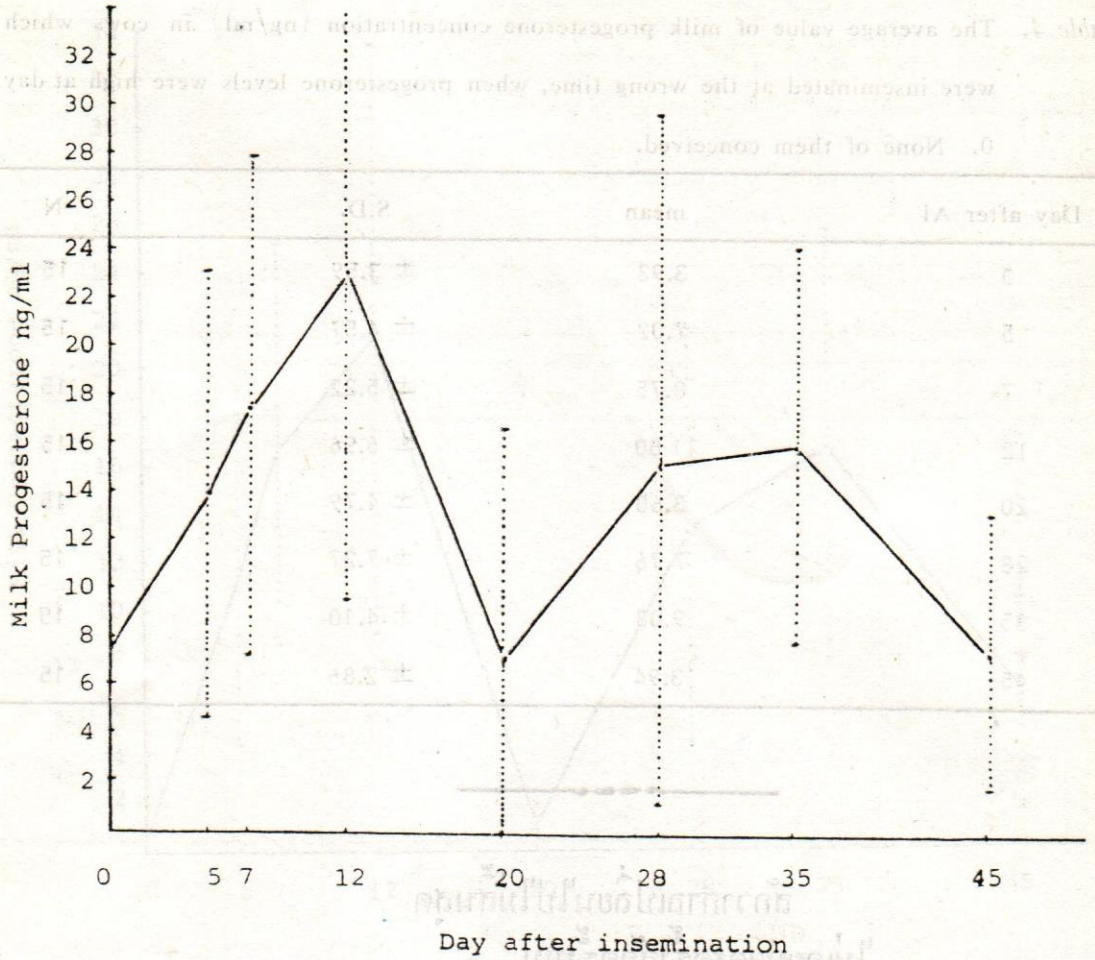


Figure 4. The illustration of mean  $\pm$  S.D. of progesterone profiles in cows which were inseminated at the wrong time when progesterone levels were high at day of insemination.

III. The third group of 29 cows (14.35%) exhibited abnormal progesterone patterns. All of these cows had an irregular estrus cycle (Table 5, Figure 5).

Table 5. The average value of milk progesterone concentration (ng/ml) in cows with irregular estrus cycle.

Day after AI	Mean	S.D.	N
0	2.80	± 6.66	29
5	5.29	± 6.10	29
7	5.66	± 4.22	29
12	7.84	± 6.90	29
20	7.43	± 6.56	29
28	4.92	± 4.38	29
35	6.94	± 6.59	29
45	9.26	± 8.76	29

สีกวานักปราชญ์ชาติวิจิตร  
ไม่พลั้งผิดพลาดเลยไม่เคยเห็น  
เถรยังเผลอเบี่ยงสัตว์อับดีเป็น  
จึงเข้าเฝ้าโปรดเวไนยอภัยกรรม  
สุพรรณพรอันนิเทศวิเศษสุด  
แต่ชาวพุทธคราวสุณฺณนํ้า  
คือวันธรรมสวนะฟังพระธรรม  
หัวใจจำคำพระละบาปเอย

น. คณายา

สยามรัฐ 9 มกราคม 2528

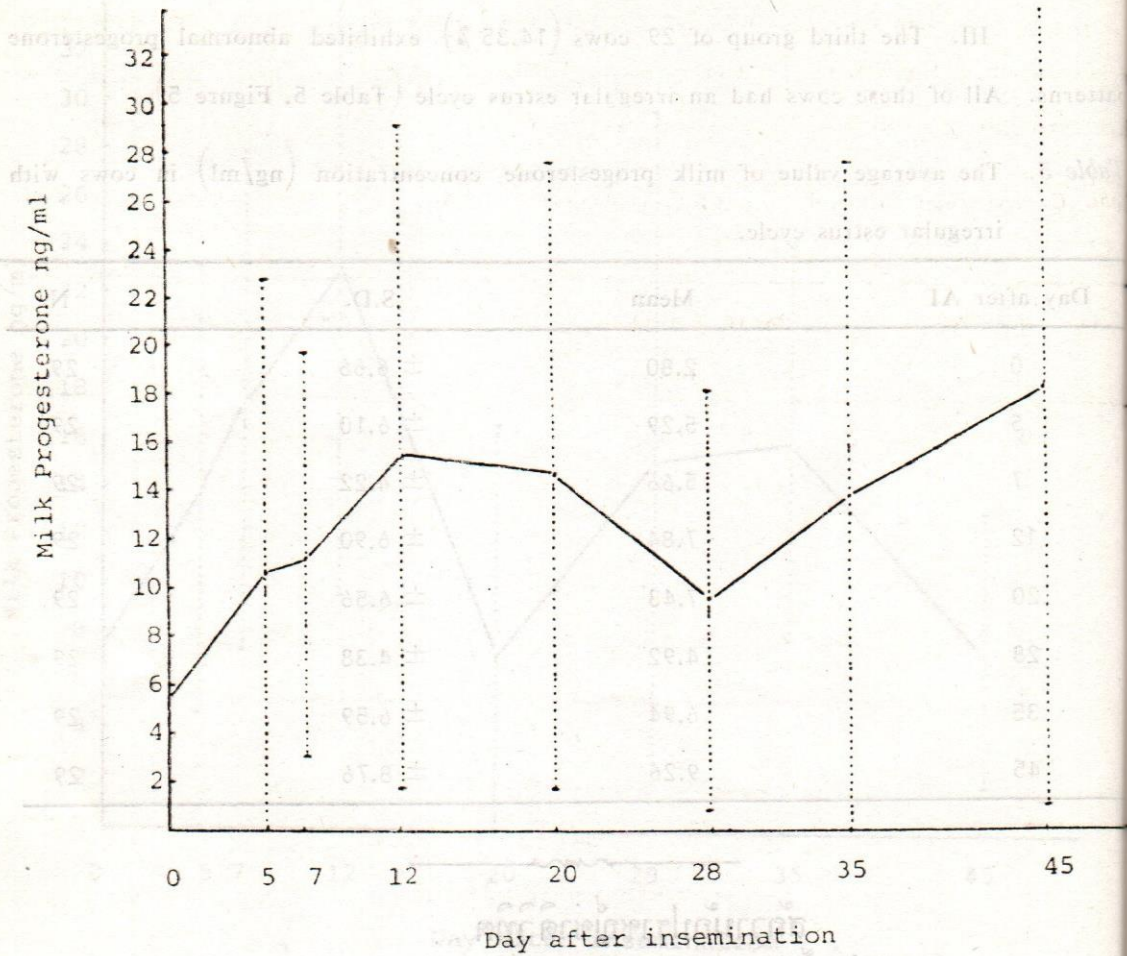


Figure 5. The illustration of mean  $\pm$  S.D. of progesterone profiles in cows with irregular estrus cycle.

IV. The fourth group of 12 cows (5.94%) were acyclicity. It was found by rectal palpation that nine cows had inactive ovaries and three cows exhibited persistently high milk progesterone. A corpus luteum persisted in these three cows (Table 6, Figure 6).

Table 6. Average value of milk progesterone (ng/ml) in cows with follicular cyst and luteal cyst.

Day after AI	Mean $\pm$ S.D. (Follicular cyst)	N	Mean $\pm$ S.D. (Luteal cyst)	N
0	0.29 $\pm$ 0.31	9	6.02 $\pm$ 0.70	3
5	0.42 $\pm$ 0.47	9	4.93 $\pm$ 1.97	3
7	0.92 $\pm$ 0.81	9	3.78 $\pm$ 0.21	3
12	0.63 $\pm$ 0.59	9	5.02 $\pm$ 0.98	3
20	1.04 $\pm$ 1.27	9	5.04 $\pm$ 1.32	3
28	0.68 $\pm$ 0.56	9	5.56 $\pm$ 1.16	3
35	0.98 $\pm$ 0.93	9	6.17 $\pm$ 0.57	3
45	0.84 $\pm$ 0.96	9	7.35 $\pm$ 1.73	3

ได้อย่างเสียอย่าง

คนชานาชาวไร่อยากได้ฝน  
 ไปรยพิชจนจันงามตามปรารถนา  
 แต่ชาวกรุงกลัวฝนบ่นระอา  
 เกรงนาทำท่วมบ้านนานอย่างเคย  
 ขอวอนฝนเทวดาดินฟ้าบ้าง  
 ย่อมได้อย่างเสียอย่างอย่าวางเฉย  
 เห็นแก่ชาวไร่นาตกมาเลย  
 อย่าเฉยเมยเพื่อชาวกรุงยุ่งอดตาย

ชนิดิฐุ ชัยพฤกษ์ชาติ

ไพยรฐิ 29 กันยายน 2527

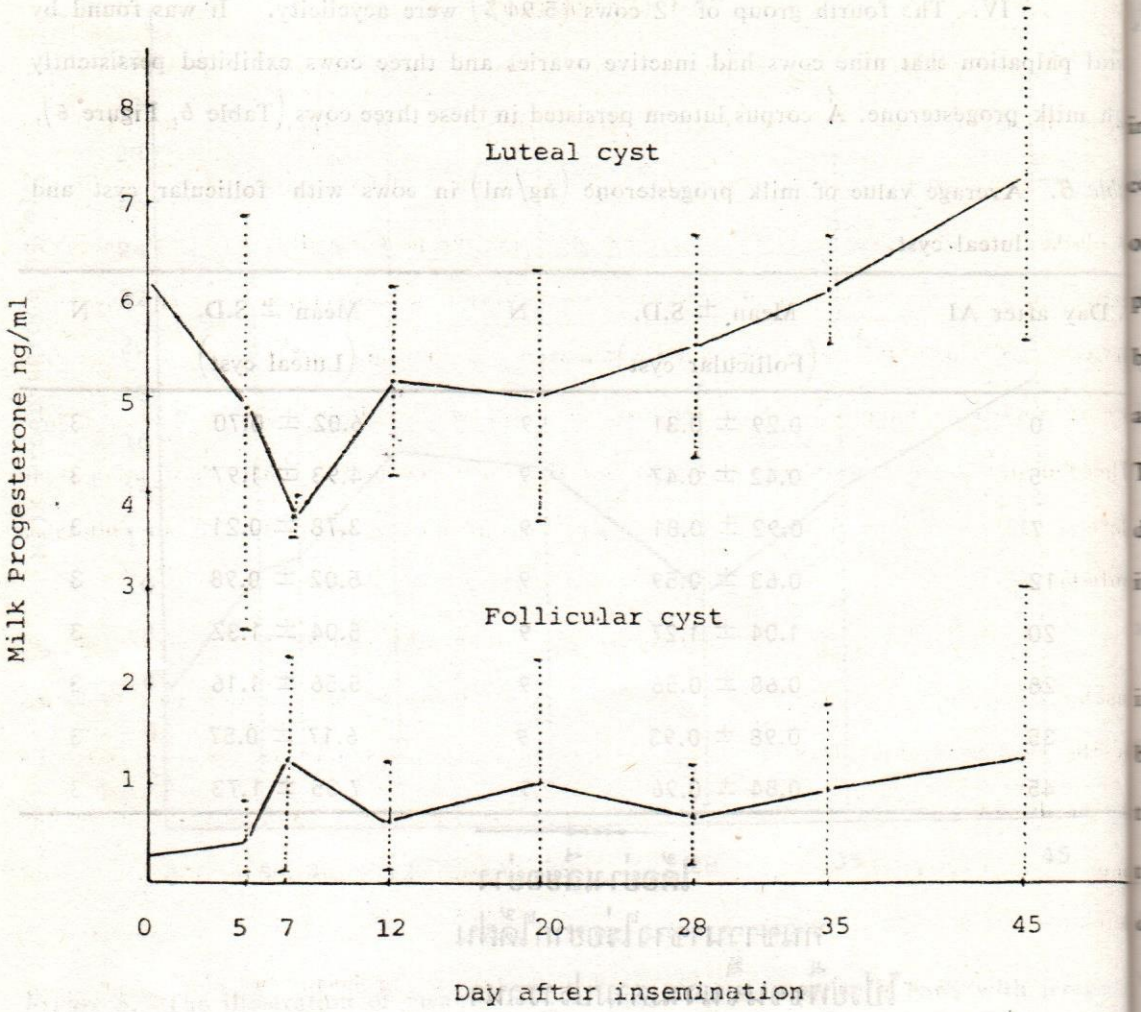


Figure 6. The illustration of mean  $\pm$  S.D. of progesterone profiles in cows with follicular cyst and luteal cyst.



### Discussion

According to the milk progesterone concentration at different time after artificial insemination in cows. The result of this study showed that there were 56.93% of the cows being pregnant as confirmed by rectal examination at day 60. And 13% out of 56.93% of hormonal diagnosed positive cows were not positive as clinically confirmed by rectal palpation at day 60. The milk progesterone concentration in these cows decreased somewhere between 28<sup>th</sup> and 45<sup>th</sup> day, which were declared as embryonic mortality. These data are in good agreement with those reported by Booth *et al.*, (1979), Foote *et al.*, (1979). These nonpregnant cows were classed as infertile due to causes other than anatomical defects, diseases or nutrition, but the sub-fertility presumably was due to an endocrine imbalance.

A group of 15 cows (7.43%) having a high progesterone level on the day of insemination did not conceive. These cases were interpreted as false detection of estrus by the herdsman and incorrect timing of insemination. Incorrect detection of estrus by the herdsman was probably due to the fact that observation was done only during the day time. Thus, some of cows having a short or silent estrus during the night were not detected.

There were 31 cows (15.35%) had a normal progesterone profile, showing normal cyclicality in the ovaries, but they did not conceive. The problems may arise from technical mistakes in artificial insemination procedure or low quality of semen.

The infertile cows in this herd should be considered by the veterinarians including 29 cows (14.35%) showed irregular progesterone profile and 12 cows (5.94%) were acyclicity. The inactive ovaries and various types of ovarian cysts were found in non cycling cows by rectal palpation.

In conclusion, milk progesterone level could be used to indicate the function of corpus luteum in the ovaries. However, milk progesterone profiles give good insight

into the possible causes of infertility problems in dairy herds and provide better ground for subsequent prophylactic and therapeutic measures.

### Acknowledgements

This work was supported by International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, and Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. We also acknowledge the helpful advice, antiserum, and laboratory facilities provided by Professor M. Kamonpatana, Biochemistry Unit, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

### References

- Booth, I.M., Davies, J., and Holdsworth, R.J. 1979. Use of the milk progesterone test for pregnancy determination. *The British Veterinary Journal* 135, 478-488.
- Bulman D. Clair and Lamming, G.E. 1978. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproductive and Fertility* 54, 447-458.
- Foote, R.H., Oltenacu, E.A.B., Kummerfeld, H.L., Smith, R.D., Riek, P.M. and Braun R.K. 1979. Milk progesterone as diagnostic aid. *The British Veterinary Journal* 135, 550-558.
- Gunzler, O., Rattenberger, E., Gurlach, A., Hann, R., Hocke, P., Clans, R. and Karg, H. 1979. Milk progesterone determination as applied to the confirmation of Oestrus, the detection of cycling and as an aid to veterinary and biotechnical measures in cows. *The British Veterinary Journal* 135, 541-549.
- Heap, R.B., Holdsworth, R.J., Godsby, J.E., Laing, J.A., and Walters, D.E. 1976. Pregnancy diagnosis in the cows from milk progesterone concentration. *The British Veterinary Journal* 132, 445-464.

- Holdsworth, R.J., Booth, J.M., Sharman, G.A.M., and Rattray, E.A.S. 1980. Measurement of progesterone levels in whole and foremilk from dairy cows. The British Veterinary Journal 136, 546-554.
- Kamonpatana, M., Pansin, C., and Parnpai, R. 1983. A direct radioimmunoassay of milk progesterone in dairy cows for pregnancy diagnosis. In published.
- Laing, J.A. and Heap, R.B. 1971. The concentration of progesterone in milk of cows during the reproductive cycle. The British Veterinary Journal 127, 19-22.
- McCaughey, W.J., and Cooper, R.J., 1980. An assessment by progesterone assay of the accuracy of oestrus detection in dairy cows. The Veterinary Record 170, 508-510.
- Shemesh, M., Ayalon, N., Lavi, S., Mileguir, F., Shore, L.S., and Toby, D. 1983. A new approach to the use of progesterone levels for pregnancy determination. The British Veterinary Journal 139, 41-48.

เป็น

“เป็นลูก” ของพ่อแม่ดูแลท่าน

“เป็นอาจารย์” สอนคนถึงความหมาย

“เป็นคนดี” กลัวความซวกกลัวใจกาย

“เป็นชาวยุชชาย” หาญสู้หมีไพร่

“เป็นพระสงฆ์” ทรงธรรมองค์สัมพุทธ

“เป็นมนุษย์” เกิดรักในศักดิ์ศรี

“เป็นผู้หญิง” อ่อนละมุนกลดสตรี

“เป็นคนดี” เขาแซะซอกองโลก

ภักดี บุษยโสภณ

ไทยรัฐ พ.ศ. 2527

บริษัท เอฟ.อี.ซิลลิก (กรุงเทพฯ) จำกัด

1 ถนนสีลม กรุงเทพฯ 10500 โทร. 2335870

แผนกเกษตร



ชนิดที่เรียนให้ทราบไว้

บริษัทฯ ได้รับแต่งตั้งให้เป็นผู้แทนจำหน่าย

ผลิตภัณฑ์สำหรับสัตว์จาก



SmithKline Beckman  
CORPORATION



NORDEN LABORATORIES, INC.

นับตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป