

DIAGNÓSTICO PRECOZ DE GESTACIÓN EN GANADO OVINO MEDIANTE UN KIT DE ENZIMOINMUNOANÁLISIS (EIA) DE LA GLICOPROTEINA ASOCIADA A LA GESTACIÓN (PAG) PLASMÁTICA

EARLY PREGNANCY DIAGNOSIS IN SHEEP BY PLASMATIC PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN (PAG) ENZYMOIMMUNOASSAY (EIA) KIT

ALABART, J.L.^{1*}; LAHOZ, B.¹; FOLCH, J.¹; MARTI, J.I.¹; SÁNCHEZ, P.¹; DELAHAUT, P.²; COLEMONTS, Y.²; BECKERS, J.F.³ Y MELO DE SOUSA, N.³

¹ CITA de Aragón. Departamento de Tecnología en Producción Animal. Av. Montañana 930. 5059, Zaragoza

² CER. Rue du Point du Jour, 1. 6900, Marloie (Bélgica)

³ Physiology of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège. 4000, Liège (Bélgica)

*jlalabart@aragon.es

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es testar la exactitud de un kit de enzimoimmunoanálisis (EIA) de PAG (pregnancy-associated glycoprotein) plasmática para el diagnóstico de gestación en ovino. Se obtuvieron muestras de sangre en ovejas gestantes los días 18, 25 y 32 (n=48), y los días 19, 26 y 33 (n=29). Se determinó en el plasma la concentración de PAG mediante EIA por el método de "sandwich". La sensibilidad del análisis fue de 0,22 ng/ml. El nivel basal obtenido en 30 muestras de 10 ovejas vacías fue de 0,34 ng/ml. El límite superior del intervalo de confianza al 95% (0,8 ng/ml) se consideró como el valor por encima del cual una oveja está gestante. Se detectó el día 18 en el 18,8% (9/48) de los casos, el día 19 en el 62,1% (18/29) y en el 100% a partir del día 25 de gestación. El porcentaje de falsos positivos fue 0% en el conjunto de datos. De todo ello se concluye que el kit de EIA para PAG plasmática testado es eficaz para el diagnóstico de gestación, sobre todo cuando no se conoce la fecha de cubrición.

Palabras clave: enzimoimmunoanálisis, PAG, ovino, diagnóstico de gestación.

SUMMARY

In this work, the accuracy of a new pregnancy-associated glycoprotein (PAG) enzymeimmunoassay (EIA) kit for pregnancy diagnosis in sheep has been tested. Plasma samples were obtained from pregnant ewes on Day 18, 25 and 32 (n=48) and on Day 19, 26 and 33 (n=29) of pregnancy. PAG concentrations were determined by "sandwich" EIA. The sensitivity of the assay was 0.22 ng/ml. The basal level calculated from 30 samples of 10 non-pregnant ewes was 0.34ng/ml. The 95% confidence limit (0.8 ng/ml) was considered the threshold for pregnancy diagnosis. On Day 18, pregnancy could be detected in 9/48 (18.8%) samples, 62.1% (18/29) on Day 19 and 100% from Day 25 onwards. The percentage of false negative was 0% in this data set. In conclusion, the EIA kit for plasmatic PAG tested is efficient for early pregnancy diagnosis in sheep, above all when the conception date is not known.

Key Words: enzymeimmunoassay, PAG, sheep, pregnancy diagnosis.

Introducción

El método hormonal más conocido de diagnóstico precoz de gestación (DG) se basa en la medición de progesterona (P4) a los 17-18 días después de la fecundación. Es un método muy preciso, sobre todo cuando se considera la no-gestación. Actualmente puede medirse por enzimoimmunoanálisis (EIA) en muestras de suero sanguíneo (Boscos et al., 2003). Tiene el inconveniente de que es preciso conocer el momento de la fecundación, para no confundir la tasa de P4 de gestación con la del ciclo. La gestación puede diagnosticarse también determinando en la sangre la presencia de proteínas secretadas por la placenta (PAG; Pregnancy-Associated Glycoprotein), que se presenta bajo distintas formas (Garbayo et al., 1998). Ello abre la posibilidad de diagnosticar la gestación independientemente de la fecha de fecundación.

Hasta ahora, la PAG debía determinarse por radioinmunoanálisis (RIA), lo que exige un Laboratorio adecuado y la manipulación de isótopos radiactivos. Últimamente, sin embargo se ha puesto a punto un método para la determinación cuantitativa de PAG por EIA. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos sobre la eficiencia de dicho método en ovejas Rasa Aragonesa.

Material y métodos

Se trataron 100 ovejas adultas y multíparas Rasa Aragonesa con esponjas vaginales de 30 mg de FGA y 480 UI de eCG (Sincropart, CEVA Salud Animal) a la retirada. A las 55 h, se inseminaron artificialmente (IA) por vía cervical con 400 millones de espermatozoides. Cinco días después de la IA se introdujeron en el rebaño 3 machos vasectomizados provistos de marcador. A los 45 días de la fecundación se realizó un DG por ecografía externa.

Para las tomas de sangre, las ovejas se dividieron en 2 lotes. En el Lote 1 (n=48 ovejas

gestantes), se tomaron muestras de sangre los días 18, 25 y 32, mientras que en el Lote 2 (n=29 ovejas gestantes) los días 19, 26 y 33 después de la IA. Se utilizaron tubos heparinizados al vacío y se obtuvo el plasma sanguíneo por centrifugación (3.500 g durante 25 min.), que se almacenó a -20°C hasta el análisis.

La determinación de PAG se realizó mediante un kit de EIA, desarrollado por el Centre d'Economie Rurale (CER- 6900 Marloie, Bélgica), basado en el método "sandwich", que consiste en la utilización de dos anticuerpos que reconocen a la PAG: uno de ellos fijado sobre la placa de 96 pocillos y el otro unido a la biotina, que será detectada por el complejo avidina-HRP. En este sistema, la densidad óptica es proporcional a la concentración de PAG.

Los partos se realizaron en jaulas individuales. La fecha de fecundación se consideró la misma que la de la inseminación cuando la oveja parió dentro de las fechas estimadas de parto (149±7 días).

Resultados

La sensibilidad del análisis de PAG (dosis mínima detectable), fue de 0,22 ng/ml El nivel basal, obtenido de 30 muestras de 10 ovejas no gestantes, fue de 0,34 ng/ml. (Rango: 0-0,76). El límite superior del intervalo de confianza al 95% fue 0,8, por lo que puede considerarse como el valor por encima del cual una oveja puede considerarse gestante. El porcentaje de falsos positivos utilizando dicho nivel de discriminación fue 0% en este conjunto de datos.

Los resultados están expuestos en la Tabla 1, en la que se puede apreciar el porcentaje de ovejas gestantes que alcanzan niveles de PAG superiores a 0,8 ng/ml en diferentes días después de la inseminación, así como las medias y errores estándar, mínimos y máximos en dichos días.

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de PAG (ng/ml) en ovejas gestantes a los 18-19, 25-26 y 32-33 días después de la IA.

Grupo IA	Días post IA	N	Rango	Media ± SEM	>0,8 (%)
1	18	48	0,00 - 2,18	0,53 ± 0,05	18,8
2	19	29	0,18 - 2,08	0,97 ± 0,09	62,1
1	25	48	1,27 - 4,08	2,79 ± 0,07	100
2	26	29	2,56 - 4,38	3,79 ± 0,08	100
1	32	48	2,65 - 4,37	3,06 ± 0,06	100
2	33	29	2,92 - 4,29	3,86 ± 0,06	100

Los días 18 y 19 de gestación solamente el 18,8 y 62,1% de las ovejas gestantes mostraron niveles de PAG superiores a 0,8 ng/ml. En ovejas sardas se ha demostrado que se puede determinar el diagnóstico de gestación medido por RIA a partir del día 18 en el 60,5% de los casos. Cuando en el RIA se usa una mezcla de diferentes antisueros caprinos y ovinos, la exactitud del diagnóstico a 18 días es del 95,3% (RIA-srPool; Barbato et al., 2009). Sin embargo, en nuestro trabajo, sólo a partir del día 25 todas las ovejas mostraron niveles de PAG superiores a 1,27 ng/ml.

Discusión

El DG temprano posibilita someter a las ovejas preñadas a un manejo adecuado y planificar la reproducción de las vacías, evitando que entren en un periodo largo no productivo. Tiene interés de tipo comercial para no enviar a matadero las ovejas preñadas y en la compra/venta de animales. Evita aplicar tratamientos hormonales o medicamentos abortivos a hembras gestantes. El DG a través de la determinación de la PAG es un método que se ha demostrado efectivo tanto en razas de carne (Suffolk, Texel; Vandeele et al., 2005) como de leche (Assaf, Lacaune), existiendo diferencias entre gestaciones simples y dobles (Ranilla et al., 1997; El Amiri et al., 2007).

En ovejas F1 Romanov x Rasa Aragonesa, la medición de la PAG a los 24 días de gestación es un 12% más preciso que la de P4 en detectar las ovejas que no paren y de la misma fiabilidad para detectar las gestantes (Folch et al., 1994). Es por tanto un buen método para detectar muerte embrionaria tardía.

En un hipotético futuro en que los métodos actuales de sincronización de celos dejen de utilizarse, serán necesarios métodos de DG que no obliguen a conocer la fecha de cubrición. Ello puede hacerse midiendo los estrógenos fecales (Alabart et al., 2001) pero es un método de diagnóstico poco precoz. La ecografía externa es un método muy eficaz, pero requiere adquirir el aparato y además, es necesario cierto grado de aprendizaje. Por otro lado, se ha señalado que el grado de exactitud en algunas razas es demasiado bajo para ser utilizado como método de DG en el campo (Karen et al., 2006). En la Rasa Aragonesa entre los días 30 y 60 de gestación la fiabilidad es muy alta (95%; n=799), aunque la fiabilidad es menor en las vacías (81%; n=275) (Blasco y Folch, 1989). Además, la determinación de la PAG por EIA podría ser un buen método de DG, especialmente útil si se mide en muestras de sangre que se tomen en el rebaño para otros fines (p.e., sanitarios).

Referencias bibliográficas

- ALABART, J.L., FERNÁNDEZ-ARIAS, A., SÁNCHEZ, P. y FOLCH, J. (2001). Determinación de estrógenos totales en heces de ovejas gestantes mediante un kit comercial de radioinmunoanálisis. *ITEA 22*, 808-810.
- BARBATO, O.; SOUSA, N.; DEBENEDETTI, A.; CANALI, C.; TODINI, L. y BECKERS, J.F. (2009). Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology 72*, 993-1000.
- BLASCO, I. y FOLCH, J. (1989). Diagnóstico precoz de gestación y determinación del número de fetos por ecografía en ganado ovino. *ITEA 82*, 22-31.
- BOSCOS, C.M.; SAMARTZI, F.C.; LYMBERPOULOS, A.G.; STEFANAKIS, A. y BELIBASAKI S. (2003). Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Reprod Domest Anim 38*, 170-174.
- EL AMIRI, B.; KAREN, A.; SULON, J.; MELO DE SOUSA, N.; ALVAREZ-OXILEY, A.V.; COGNIÉ, Y.; SZENCI, O. y BECKERS, J.F. (2007). Measurement of ovine pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during early pregnancy in lacaune sheep. *Reprod Domest Anim 42*, 257-262.
- FOLCH, J.; ALABART, J.A.; GARBAYO, A. y BECKERS, J.F. (1994). Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and progesterone for pregnancy diagnosis in ewes with increased levels of late embryonic mortality. 45th Annual Meeting of the EAAP. Edinburgh, UK. 260.
- GARBAYO, J.M.; REMY, B.; ALABART, J.L.; FOLCH, J.; WATTIEZ, R.; FALMAGNE, P. y BECKERS, J.F. (1998). Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biol Reprod 58*, 109-115.
- KAREN, A.; BECKERS, J.F.; SULON, J.; MELO DE SOUSA, N.; SZBADOS, K.; RECZIGEL, J. y SZENZI, O. (2003). Early pregnancy diagnosis in sheep by progesterone and pregnancy-associated glycoprotein tests. *Theriogenology 59*, 1941-1948.
- RANILLA, M.J.; SULON, J.; MANTECON, A.R.; BECKERS J.F. y CARRO, M.F. (1997). Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Rumin Res 24*, 125-131.
- VANDAELE, L.; VERBERCKMOES, S.; EL AMIRI, B.; SULON, J.; DUCHATEAU L.; VAN SOOM A.; BECKERS, J.F. y DE KRUIF, A. (2005). Use of homologous radioimmunoassay (RIA) to evaluate the effect of maternal and foetal parameters on pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentrations in sheep. *Theriogenology 63*, 1914-1924.