

DIAGNÓSTICO PRECOZ DE GESTACIÓN EN OVEJAS A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO ANALIZADAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS)¹

ALABART, J.L.¹; LAHOZ, B.¹; MUÑOZ, F.¹; MOZO, R.¹; LEGUA, A.¹; SÁNCHEZ, P.¹ FOLCH, J.¹ y ANDUEZA, D.²

¹ CITA de Aragón, Av. de Montañana 930, 50059 Zaragoza

² INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France
jlalabart@aragon.es

RESUMEN

Se ha realizado un estudio para determinar si es posible diferenciar las ovejas gestantes de las vacías en un momento cercano a la inseminación analizando el plasma sanguíneo con la tecnología NIRS (Near-infrared reflectance spectroscopy) y comparar el grado de precisión del diagnóstico con la determinación de Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) y de Progesterona (P4). Se tomaron muestras de sangre en 188 ovejas Rasa Aragonesa y Ansotana 18 y 25 días después de ser inseminadas. En el plasma recuperado, se analizó la concentración de PAG y de P4 mediante ELISA con kits comerciales y se determinó el espectro en un espectrofotómetro NIRS. La fertilidad de la IA fue del 47,9%. El día 18 el NIRS mostró una mayor sensibilidad para detectar las ovejas gestantes que la PAG (sensibilidad: 98,9 vs 32,2 %; $P < 0,001$) y similar a la P4. La especificidad fue 100% en NIRS y PAG, mientras que la de la P4 fue menor (84,7; $P < 0,001$). El día 25 no se encontraron diferencias en ningún parámetro entre NIRS y PAG. Se concluye que el NIRS es un método seguro de diagnóstico de gestación en ovejas a partir del día 18 de la fecundación y sin utilizar compuestos químicos.

Palabras clave: NIRS, PAG, diagnóstico precoz de gestación, oveja.

1 La metodología utilizada puede consultarse en detalle en Andueza *et al.*, 2014

INTRODUCCIÓN

En una explotación ovina es importante poder diferenciar las ovejas gestantes de las vacías en un estadio precoz de gestación. Ello permite racionalizar la alimentación, planificar las cubriciones, detectar animales improductivos, etc. Las ovejas gestantes pueden detectarse midiendo la concentración de Progesterona (P4), pero este método exige conocer la fecha exacta de la fecundación y realizar una toma de sangre entre los 17-19 días posteriores. La ecografía externa es un método eficaz para detectar la preñez en los días 30-50 de gestación, siendo necesario recurrir a la ecografía transrectal en estadios anteriores. La determinación en plasma de la PAG (Pregnancy-Associated Glycoprotein), constituye un diagnóstico de gestación fiable que no precisa tomar la sangre en un intervalo tan concreto desde la fecundación. Si se analiza la PAG por radioinmunoanálisis (RIA), la preñez se detecta a partir del día 18 (Barbato et al., 2009) y analizándola por ELISA, en Rasa Aragonesa se consigue una fiabilidad del 100% a partir del día 25 de gestación (Alabart et al., 2010). Por otro lado, el NIRS (Near-infrared reflectance spectroscopy) es un método físico de análisis basado en la absorción por parte de las muestras de la energía electromagnética en el rango del infrarrojo cercano (700-2500 nm). Dicha absorción es específica de cada muestra, por lo que es una tecnología comúnmente utilizada en la determinación de la calidad de diversos productos. Una vez puesto a punto, es un método muy rápido y económico. En el presente trabajo hemos querido estudiar si el NIRS permite diferenciar las ovejas gestantes de las vacías, y comparar su nivel de precisión con el de la determinación de PAG y de P4.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó un lote de 142 ovejas Rasa Aragonesa alimentadas ad libitum en praderas de regadío (Lote 1) y un lote de 46 ovejas Ansotanas mantenidas en praderas de zona semiárida. En marzo (Lote 1) y en noviembre (Lote 2) las ovejas fueron tratadas con esponjas de FGA y 480 UI de eCG (CEVA Salud Animal S.A., Barcelona) e inseminadas a las 54 ± 1 h de la retirada de las esponjas con 400×10^6 espermatozoides de semen refrigerado. A los 15 días de la IA, se introdujeron machos enteros para cubrir los retornos. A los 18 y 25 días de la IA se tomó una muestra de sangre, cuyo plasma se recuperó y se congeló. A los 45 días, se realizó una ecografía externa. A partir del día 140 se colocaron las ovejas en jaulas individuales para controlar los partos. Se consideraron gestantes de la IA las ovejas positivas a la ecografía que parieron 149 ± 7 días después de la IA. Se analizaron por PAG, NIRS y P4 todas las muestras del día 18 (n= 188) y las muestras del día 25 de las ovejas gestantes (n=

90) y que quedaron vacías (n=29) en la IA y en el retorno. Las muestras de ovejas gestantes en el retorno (n=69) no fueron analizadas. La PAG se analizó con un kit ELISA “sandwich” (Ref. Code EG7, CER 6900 Marloie, Belgica), siguiendo las instrucciones del fabricante (Alabart et al., 2010). El nivel basal se determinó en 0,34 ng/mL y el umbral para diagnóstico de gestación con 95% de confianza fue 0,8 ng/mL. La P4 se analizó con un kit para plasma ovino (Ridgeway Science, St. Briavels, Gloucestershire, RU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El umbral para diagnóstico de gestación fue 0,5 ng/mL. El proceso de obtención de espectros se describió en detalle por Andueza et al. (2014). De forma breve, se colocaron 0,5 mL de la muestra de plasma en un filtro de microfibra de vidrio (Whatman International, Ltd., Maidstone, UK) y se dejó secar a 30 °C durante 24 h. A continuación, se colocó la muestra en un espectrofotómetro NIRS Foss NIRSystems, (Silver Spring, MD, USA) que determina la reflectancia (R) a intervalos de longitud de onda de 2 nm entre 400 a 2498. La R se transformó en absorbancia (A) usando la fórmula $A = \log(1/R)$. Los espectros NIRS fueron transformados (standard normal variate and de-trending; Barnes et al., 1989) y se calculó la primera derivada. A partir de los espectros transformados de muestras de plasma de ovejas gestantes y no gestantes se realizó un análisis discriminante utilizando el método de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Este método consiste en realizar una regresión PLS en la que la variable dependiente es un conjunto de variables discretas que describen las distintas clases de observaciones (en este caso, hembras gestantes y no gestantes) y las variables independientes son los valores de A transformados de los espectros. El modelo obtenido sirve para clasificar los espectros de muestras de plasma de ovejas sobre las que se quiere determinar su estado de gestación. El modelo obtenido se validó mediante el método de validación cruzada, en el que una cuarta parte de las muestras elegidas al azar se eliminaron temporalmente de la base de datos inicial para ser utilizadas como muestras desconocidas (conjunto de muestras de validación del modelo). El modelo PLS-DA obtenido con las otras 3/4 partes se utilizó para clasificar las muestras del conjunto de validación. Este procedimiento se repitió 4 veces hasta que la totalidad de las muestras fueron incluidas en el conjunto de validación. Los resultados se expresaron como la proporción de muestras correctamente clasificadas en relación a los valores reales. En el análisis de resultados se consideraron los siguientes parámetros: Sensibilidad (relación entre el número de ovejas diagnosticadas correctamente como gestantes y el total de ovejas gestantes; Se), Especificidad (relación entre el número de ovejas correctamente diagnosticadas como no-gestantes y el total de ovejas no-gestantes; Sp), Valor predictivo del resultado positivo (relación entre el número de ovejas diagnosticadas correctamente como gestantes y el total de ovejas diagnosticadas como

gestantes; VPP), Valor predictivo del resultado negativo (relación entre el número de ovejas diagnosticadas correctamente como no-gestantes y el total de ovejas diagnosticadas como no-gestantes; VPN), Precisión total (relación entre todas las ovejas correctamente diagnosticadas y el número total de ovejas; PT). Las diferencias entre grupos Se, Sp, VPP, VPN, y PT se compararon por el test Freeman-Tukey, ajustado mediante el método bootstrap por etapas para comparaciones múltiples usando el procedimiento MULTTEST de SAS (2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las ovejas positivas en la ecografía a los 45 días de la inseminación parieron. Las diferencias en fertilidad entre los lotes 1 y 2 fueron muy bajas y no significativas, por lo que los resultados se agruparon para su análisis (Tabla 1). El estudio se ha realizado en dos razas diferentes, manejadas de dos sistemas distintos de alimentación e inseminadas en diferente época. En estas condiciones tan diferentes, el NIRS ha permitido diferenciar las ovejas gestantes y vacías con gran exactitud en los dos periodos estudiados. En los espectros aparecen unos picos que pueden corresponder a la absorción de proteínas, y otros relacionados con carbohidratos (Osborne y col., 1988; Small y col 1993; Heise y col 1998). Por tanto, es posible que el NIRS detecte en sangre la presencia de componentes imprescindibles para el desarrollo embrionario. Por el contrario, los espectros observados no parece que estén relacionados con la P4. En nuestro estudio, 15 ovejas no-gestantes, correctamente clasificadas por NIRS, tenían una concentración alta de P4 el día 18 (83/98).

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y precisión total de los métodos NIRS y de PAG los días 18 y 25, y de la P4 el día 18 después de la IA. (): N° de aciertos/n° total de ovejas en cada categoría.

Método	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	Precisión Total
Day 18					
NIRS	98.9 (89/90) ^a	100 (98/98) ^a	100 (89/89) ^a	99.0 (98/99) ^a	99.5 (187/188) ^a
PAG	32.2 (29/90) ^b	100 (98/98) ^a	100 (29/29) ^c	61.6 (98/159) ^b	67.6 (127/188) ^e
P4	100 (90/90) ^a	84.7 (83/98) ^b	85.7 (90/105) ^b	100 (83/83) ^a	92.0 (173/188) ^d
Day 25					
NIRS	100 (90/90) ^a	100 (29/29) ^a	100 (90/90) ^a	100 (29/29) ^a	100 (119/119) ^a
PAG	100 (90/90) ^a	100 (29/29) ^a	100 (90/90) ^a	100 (29/29) ^a	100 (119/119) ^a

En cada columna: ^{b,c}: P<0,05; ^{a,b; a,d; a,e; e,d}: P<0,001.

En el día 18 se encontraron diferencias significativas en la Precisión Total entre los métodos NIRS y PAG (99,5 y 67,6%). El mismo día, la sensibilidad del NIRS fue más alta que la de la PAG (98,9 vs. 32,2%; $P < 0,001$), mientras que no hubo diferencias en especificidad. La sensibilidad de la PAG el día 18 fue baja, quizás porque el test ELISA utilizado no es capaz de detectar concentraciones de PAG tan bajas. De hecho, cuando se mide la PAG por RIA, se obtiene una alta precisión el día 18 de gestación (Barbato et al., 2009). Comparando NIRS y P4, la Precisión total fue más alta en el método NIRS (99,5 vs. 92,0; $P < 0,001$). La sensibilidad de NIRS y P4 fueron parecidas, mientras que el método NIRS tuvo una mayor especificidad (100 vs. 84,7%; $P < 0,001$). El día 25 no se encontraron diferencias en ningún parámetro entre PAG y NIRS (100%).

CONCLUSIONES

Este trabajo presenta un método nuevo de diagnóstico de gestación a partir del día 18 en plasma de ovejas, sin necesidad de realizar la toma en un día concreto. A diferencia de la determinación de PAG y P4, no se precisan compuestos químicos. Es más precoz que la ecografía, si bien es necesario enviar la muestra a un laboratorio que disponga de un equipo NIRS. El coste dependerá del grado de automatización del análisis. Deben realizarse más investigaciones para determinar la precisión del diagnóstico antes del día 18 y para identificar las sustancias responsables de las diferencias entre los espectros de gestantes y no-gestantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABART, JL.; LAHOZ, B.; FOLCH, J.; MARTÍ, JI.; SÁNCHEZ, P.; DELAHAUT, P.; ET AL. (2010). Early pregnancy diagnosis in sheep by plasmatic pregnancy-associated glycoprotein (PAG) enzymeimmunoassay (EIA) kit. En: Junta de Castilla y León (Ed.). XXXV Congreso de la SEOC. Valladolid: 199-202.
- ANDUEZA, D.; ALABART, JL.; LAHOZ, B.; MUÑOZ, F.; FOLCH, J. (2014). Early pregnancy diagnosis in sheep using near-infrared spectroscopy on blood plasma. *Theriogenology* 81: 509-513.
- BARBATO, O.; SOUSA, NM.; DEBENEDETTI, A.; CANALI, C.; TODINI, L.; BECKERS, JF. (2009). Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. *Theriogenology* 72(7):993-1000.
- BARNES, RJ.; DHANOA, MS.; LISTER, SJ. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl Spectrosc.* 43: 772-7
- GONZALEZ-BULNES, A.; PALLARES, P.; VAZQUEZ, MI. (2010) Ultrasonographic Imaging in Small Ruminant Reproduction. *Reprod Domest Anim* 45 (Suppl. 2): 9-20.

- HEISE, HM.; BITTNER, A. (1998) Multivariate calibration for near-infrared spectroscopic assays of blood substrates in human plasma based on variable selection using PLS-regression vector choices. *Fresenius J Anal Chem* 362:141-7
- OSBORNE, BG.; FEARN, T. (1988) *Near infrared spectroscopy in food analysis*. (1st ed.). Essex: Longman Scientific & Technical.
- SAS Institute Inc. (2011). *SAS OnlineDoc® 9.3*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SMALL, GW.; ARNOLD, A.; MARQUARDT, LA. (1993) Strategies for coupling digital filtering with partial least-squares regression: Application to the determination of glucose in plasma by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Anal Chem* 65: 3279-89.

EARLY PREGNANCY DIAGNOSIS IN SHEEP BY NEAR INFRARED REFLECTANCE SPECTROSCOPY (NIRS) ON BLOOD PLASMA

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the ability of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to discriminate between pregnant and non-pregnant ewes in early stages of pregnancy after artificial insemination (AI). Blood samples were collected at 18 and 25 days after AI from 188 Rasa Aragonesa and Ansotana ewes. Recovered plasma was analyzed for pregnancy-associated glycoprotein (PAG) and progesterone (P4) using ELISA commercial kits. The spectra of plasma samples were recorded in a NIRS spectrophotometer. Pregnancy rate was 47.9%. At day 18, the accuracy to detect pregnant ewes (sensitivity) was higher in NIRS than in PAG test (98.9 *vs* 32.2%; $P < 0.001$) and similar to P4 test (100%). Specificity was 100% for both, NIRS and PAG tests, while that of P4 was lower (84.7%; $P < 0.001$). At day 25, no differences were found between NIRS and PAG tests. It can be concluded that NIRS is an accurate method for pregnancy diagnosis from day 18 after breeding without using chemical reagents.

Keywords: NIRS, PAG, early pregnancy diagnosis, ewe.