

**Detección temprana de preñez en ganado de
carne con prueba ELISA usando kit IDEXX
Rapid Visual Pregnancy Test[®]**

**Christian Ignacio Guadamud Garcia
Walter Roca Suarez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERIA AGRONÓMICA

Detección temprana de preñez en ganado de carne con prueba ELISA usando kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®]

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Christian Ignacio Guadamud Garcia
Walter Roca Suarez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Detección temprana de preñez en ganado de carne con prueba ELISA usando kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test®

**Christian Ignacio Guadamud Garcia
Walter Roca Suarez**

Resumen. El kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® es una prueba de detección temprana de preñez la cual nos permite reducir el intervalo parto concepción en el hato ganadero. Esta prueba utiliza un ensayo inmuno-enzimático (ELISA) que detecta preñez de manera temprana a los 28 días pos servicio, identificando la presencia de glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG), siendo producidas a partir del día 25 de gestación hasta el día 60 pos parto. Con el objetivo de determinar la eficiencia del kit IDEXX en comparación con la palpación rectal se realizó un estudio donde se usaron 131 vacas de carne sometidas al kit al día 28 pos servicio y fueron comprobadas al día 60 pos servicio por medio de la palpación rectal. Las variables medidas fueron: porcentaje de preñez del kit IDEXX y de la palpación rectal para determinar si existe diferencia entre ambas, porcentaje de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos, falsos positivos y así obtener la especificidad y sensibilidad del kit IDEXX. El porcentaje de preñez a los 28 días con IDEXX fue 75% en comparación con la palpación rectal al día 60 que fue 60%, encontrando diferencias significativas ($P \leq 0.05$). La sensibilidad de la prueba fue de 97.4% y la especificidad 58.4%. En base a los resultados obtenidos concluimos que la prueba de preñez temprana IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® es muy recomendable para detectar vacas vacías y tomar decisiones de manejo reproductivo en ellas, para lograr un mejor desempeño reproductivo.

Palabras clave: Especificidad, gestación, glicoproteínas, palpación, sensibilidad.

Abstract. The kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy® is an early pregnancy test which allows to reduce the interval between calving and conception in the herd. This test uses an enzyme-linked immunoassay (ELISA) that detects pregnancy early on the 28th day after service, identifying the presence of pregnancy-associated glycoproteins (PAG), which are produced from day 25 of gestation until day 60 post calving. With the objective to determine the efficiency of the kit IDEXX compared to rectal palpation a study was conducted where 131 beef cows were subjected to the kit on the 28th day after service and were checked on day 60 post service by rectal palpation. The measured variables were: percentage of pregnancy of the kit IDEXX and rectal palpation to determine if there is a difference between the two tests, percentage of true positives, true negatives, false negatives, false positives, in order to obtain the specificity and sensitivity of the kit. The percentage of pregnancy on day 28 with IDEXX was 75% compared to 60% with rectal palpation on day 60, finding significant differences ($P \leq 0.05$). The sensitivity of the test was 97.4% and the specificity was 58.4%. Based on the results obtained, we concluded that the early pregnancy test IDEXX Rapid Visual Pregnancy® is highly recommended to detect empty cows and take reproductive management decisions in them, to achieve a better reproductive performance.

Key words: Specificity, gestation, glycoproteins, palpation, sensitivity.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	8
5. RECOMENDACIONES.....	9
6. LITERATURA CITADA.....	10
7. ANEXOS.....	11

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Porcentaje de preñez de vacas de ganado de carne con detección temprana de preñez mediante kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® y por palpación rectal.	6
2. Porcentaje de reabsorción embrionaria en vacas de ganado de carne.	6
3. Porcentaje de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos, falsos negativos, sensibilidad y especificidad del diagnóstico con kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® y palpación rectal.	7

Anexos	Página
1. Cálculo de sensibilidad y especificidad.....	11

1. INTRODUCCIÓN

En explotaciones ganaderas existen pilares claves para el éxito productivo. Estos factores son genética, nutrición y manejo reproductivo. Dichos factores se entrelazan en una sinergia, cuyos resultados se ven reflejados en la productividad de los animales. En los pilares, la eficiencia reproductiva es un factor clave para obtener mejores desempeños, permitiendo lograr mayores beneficios productivos y económicos. El programa reproductivo en una ganadería debe estar enfocado en obtener índices de producción elevados, cumpliendo con parámetros reproductivos óptimos. Por ejemplo, intervalos de partos cortos, para satisfacer los objetivos en una ganadería que es preñar a las vacas en el menor tiempo posible y obtener un ternero por año (Huanca 2013; Santo 2015).

Los ingresos de producción están relacionados directamente con los índices reproductivos del hato. Dentro de dichos índices, unos de los indicadores económicos con menor relevancia es el costo de un día abierto, el cual es determinado por el intervalo parto-concepción. Dicho índice nos refleja el dinero que el productor deja de percibir debido a que la vaca se encuentra vacía (Paiva y Batista 2015).

La detección de preñez temprana puede ser una herramienta que permite hacer más rentable la producción de ganado de carne. Por ejemplo, mantener una vaca de 1250 lb durante invierno puede costar alrededor de \$1.30 por día, lo cual resultaría en un total de \$270 por vaca en la época de invierno. Si consideramos un hato de 100 vacas en las cuales siete de ellas están en el periodo abierto, resultaría en \$1890 que se dejarían de percibir e incrementaría el costo de las 93 vacas en \$19.48 (South Dakota State University 2014).

Existen muchos métodos disponibles para determinar si una vaca está preñada. La más simple es la observación de los signos del estro a la tercera semana después del servicio. Los resultados obtenidos con este método dependen de la capacidad de detección de estro. Refiriéndose a la palpación rectal, un examen prematuro puede inducir mortalidad embrionaria, por lo tanto, esta práctica es ejecutada entre los 50-55 días pos servicio y, por ende, no puede calificarse como detección temprana. Sin embargo, con la ecografía, el examen transrectal se convierte en un método preciso y sencillo de diagnóstico, con una sensibilidad que alcanza el 100% 28 días después del servicio. La ecografía transrectal requiere instrumentos específicos y caros, un operador experto y hábil. Además, también hay un conjunto de técnicas analíticas para detectar la preñez (Commun et al. 2016).

Se ha desarrollado una herramienta de campo denominada kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®], la cual utiliza una muestra de plasma en un ensayo inmunológico enzimático (ELISA) que detecta Glicoproteínas Asociadas a la Gestación (PAG) mediante

un formato de captura de antígeno para un diagnóstico de preñez a los 28 días por servicio y durante la gestación. Dichas glicoproteínas son producidas por las placentas cotiledonarias desde el día 25 de la gestación hasta el día 60 post parto (Paiva y Batista 2015; IDEXX Laboratories 2017).

IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® es una prueba relativamente rápida, pues se obtienen los resultados aproximadamente a los 21 minutos desde su ejecución; el análisis de los resultados se logra mediante la observación del cambio de color en las placas, tomando como referencia el color azul para una vaca en gestación y transparente para una vaca vacía. Debido a su alto margen de sensibilidad de 99.1% y una especificidad de 95.1%, se la considera una prueba confiable y segura para inducir a un nuevo servicio mediante cualquier método, ya sea inseminación artificial, monta natural o transferencia de embriones (IDEXX Laboratories 2017).

El kit IDEXX es de fácil utilización, la cual no requiere de personal especializado y brinda resultados confiables. Su principal objetivo es permitir al productor disminuir el intervalo parto-concepción, por ende, disminuir el número de días abierto, logrando así una mejor eficiencia reproductiva en el hato y nacimientos de grupos más uniformes de terneros en explotaciones ganaderas. Así mismo consigue reducir los gastos por animales y descartar los animales menos fértiles (Paiva y Batista 2015).

Basado en los conceptos anteriores, el presente estudio tiene como objetivos:

- Evaluar la eficiencia de la implementación del kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® en una ganadería de carne para un diagnóstico temprano de preñez.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test®.

2. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en la unidad de ganado de carne de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, situada en el Valle del Yeguaré, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, en los meses de Mayo y Junio. Ubicado a 32 km de Tegucigalpa, a una altitud de 800 msnm, precipitación de 179.8 mm y una temperatura promedio de 25 °C.

Se utilizaron 131 vacas de la raza Brahman y sus encastes con Angus, Senepol, Charoláis, Simental y Holstein. Estos animales fueron sometidos a un protocolo de sincronización de celo con un dispositivo intravaginal SYNTEX-DIB[®] a base de progesterona, posteriormente fueron inseminadas artificialmente. Las vacas que repetían celo a los 21 días pos servicio fueron inseminadas nuevamente. Las vacas que no repitieron celo se les extrajo una muestra de sangre, sometiendo las muestras al kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] al día 28 después del servicio para determinar preñez.

Las muestras de sangre se colectaron, en el mes de Mayo, de las venas de la región coccígea de la vaca, localizadas en la base de la cola. Se extrajo la sangre con jeringas de 10 mL y se colocaron en tubos de ensayo de 10 mL, se usó una centrifugadora marca ROTOFIX[®] modelo 2800 a 7000 rpm durante tres minutos para extraer el plasma sanguíneo, el cual contiene las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG). Después de la centrifugación el plasma fue transferido a tubos *ependorf* de 2 mL para su almacenamiento a 0 °C previo a la utilización del kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®].

Las muestras fueron asignadas un código de identificación y los reactivos se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 7 °C hasta iniciar el estudio. De manera general, en la prueba se incubaron las muestras con el anticuerpo anti-PAG (solución de detección) en los pocillos de la placa. Las glicoproteínas capturadas fueron detectadas por anticuerpos específicos de la solución de detección, mientras que el anticuerpo no ligado se eliminó mediante el lavado y se añadió un conjugado de peroxidasa de rábano a los pocillos. El conjugado no ligado se eliminó mediante el lavado y se añadió un sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) a los pocillos para el desarrollo de color, el cual es proporcional a la cantidad de PAG en la muestra.

Los reactivos y las muestras se expusieron a la intemperie para que adquirieran una temperatura ambiente entre 15 a 30 °C. Se dispensaron 100 µL del control negativo y positivo en sus pocillos correspondientes en la placa tapizada utilizando una pipeta de precisión. Luego se depositaron 100 µL de muestra de plasma sanguíneo de cada vaca en los pocillos respectivos utilizando una pipeta de precisión.

A continuación se añadieron tres gotas de la solución de detección en cada pocillo. Se cubrieron los pocillos con la tapa de la placa y se golpeó la placa diez veces suavemente con un dedo para homogenizar la mezcla. Se dejó incubar la placa durante siete minutos a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la incubación se retiró la tapa, se invirtió sobre un recipiente para desechos líquidos y se sacudió hacia abajo para eliminar el rastro de líquidos de los pocillos. En seguida se lavó la placa llenando cada pocillo con agua destilada hasta que el chorro de agua desbordase por los pocillos, después se invirtió la placa para desechar el agua. Se repitió dos veces esta operación y al final se golpeó firmemente la placa con la mano sobre papel absorbente para eliminar el residuo de agua de cada pocillo.

Luego se depositaron tres gotas del conjugado en cada pocillo. Se cubrieron los pocillos con la tapa de la placa y se golpeó la placa diez veces suavemente con un dedo para homogenizar la mezcla. Se dejó incubar la placa durante siete minutos a temperatura ambiente.

Inmediatamente se retiró la tapa, se invirtió sobre un recipiente para desechos líquidos y se sacudió hacia abajo para eliminar el rastro de líquidos de los pocillos. En seguida se lavó la placa llenando cada pocillo con agua destilada hasta que el chorro de agua desbordase por los pocillos, después se invirtió la placa para desechar el agua. Se repitió dos veces esta operación y al final se golpeó firmemente la placa con la mano sobre papel absorbente para eliminar el residuo de agua de cada pocillo.

Como paso siguiente se dispensaron tres gotas del substrato tetrametil-benzidina (TMB) en cada pocillo. Se cubrieron los pocillos con la tapa de la placa y se golpeó la placa diez veces suavemente con un dedo para homogenizar la mezcla. Se dejó incubar la placa durante siete minutos a temperatura ambiente.

Finalmente se depositaron tres gotas de la solución de frenado en cada pocillo y se golpeó la placa diez veces suavemente con un dedo para homogenizar la mezcla. Por último se colocó la placa sobre una mesa donde se realizó la lectura visual de los resultados.

Para la interpretación de la prueba se consideraron los siguientes puntos:

- Si el pocillo del control positivo no cambia a color azul, todos los resultados del análisis son inválidos.
- Si el color del pocillo no es azul, un color parecido al pocillo del control negativo, se determina que la vaca está vacía.
- Si el color del pocillo es azul, significa que las PAG están presentes y se considera que la vaca está gestante.

Las muestras que representen una difícil interpretación, color azul muy tenue, deben considerarse como dudosas, por lo cual se recomienda someter al animal a una nueva prueba de gestación con una segunda muestra en una fecha posterior o usando otro método de

detección de gestación. A los animales con respuesta positiva a la prueba se les realizaron una palpación vía rectal al día 60 después del servicio para confirmar su preñez o determinar si hubo reabsorción embrionaria.

Las variables analizadas fueron:

Porcentaje de preñez: Parámetro que representa la fertilidad del hato, se expresa como el número de vacas que quedaron preñadas del total de vacas que fueron inseminadas.

Mortalidad embrionaria: Es la pérdida de la gestación durante el periodo embrionario, el cual ocupa los primeros 42 días de gestación. Es un problema difícil de diagnosticar y corregir en reproducción bovina. Se pueden considerar diversos factores que pueden ser causantes, de los cuales podemos destacar factores genéticos, de manejo, estrés, salud animal, entre otros (Diskin y Morris 2008).

Sensibilidad: Es la capacidad de la prueba para detectar las vacas preñadas (Commun et al. 2016).

Especificidad: Es la capacidad de la prueba para poder detectar las vacas vacías (Commun et al. 2016).

Verdaderos positivos: El número de vacas que fueron diagnosticadas preñadas con el kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] y confirmadas su preñez mediante la palpación rectal.

Falsos positivos: El número de vacas que fueron diagnosticadas preñadas con el kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] e identificadas como vacías mediante la palpación rectal.

Verdaderos negativos: El número de vacas que fueron diagnosticadas vacías con el kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] y confirmadas que estaban vacías mediante la palpación rectal.

Falsos negativos: El número de vacas que fueron diagnosticadas vacías con el kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] e identificadas como preñadas mediante la palpación rectal.

En el análisis estadístico se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4[®]), en el cual se usó un diseño completo al azar, en el cual se determinaba la preñez de vacas sometidas al IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] 28 días después de la inseminación y a una palpación rectal 60 días después de la inseminación, para poder confirmar preñez o determinar muerte embrionaria. Para la evaluación de preñez se utilizó una prueba de frecuencia con Chi-cuadrado con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, para poder contrastar diferencias en la eficiencia en la detección de preñez entre IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] y palpación rectal.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de preñez. Hubo diferencia entre la prueba IDEXX y palpación rectal, indicando mayor porcentaje de preñez en el uso de kit IDEXX con 74.8 y 59.5% por palpación rectal (Cuadro 1). A la vez, estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Puerto y Ordoñez (2016) en el cual obtuvieron diferencias significativas, siendo mayor el porcentaje de vacas preñadas con IDEXX con 43,8% que con palpación rectal con 32.3%.

Cuadro 1. Porcentaje de preñez de vacas de ganado de carne con detección temprana de preñez mediante kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® a 28 días pos servicio y palpación rectal a 60 días pos servicio.

Prueba	Vacas	Resultados (%)
IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test®	98/131	75 (74.8)
Palpación rectal	78/131	60 (59.5)
Probabilidad		0.0085

Porcentaje de reabsorción embrionaria. Se obtuvo 20.4% de reabsorción embrionaria que se lo atribuye al tiempo en que fueron corridas las muestras con IDEXX (Cuadro 2). Este dato es similar a los de Puerto y Ordoñez (2016) y a los de Garate y Suarez (2015), que obtuvieron mortalidades embrionarias de 26.2% y 14.5%, respectivamente.

Cuadro 2. Porcentaje de reabsorción embrionaria en vacas de ganado de carne que fueron sometidas al kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test® a 28 días pos servicio y palpación rectal a 60 días pos servicio.

Prueba	Vacas	Resultados (%)
IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test®	98/131	75 (74.8)
Palpación rectal	78/131	60 (59.5)
Mortalidad embrionaria	20/98	20.4

Sensibilidad y Especificidad. Se obtuvo una sensibilidad del kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] de 97.4%, resultado similar al provisto por el laboratorio IDEXX, el cual indica una sensibilidad de 99,1%. Sin embargo se encontró una especificidad de 58,4% en el kit, muy por debajo de lo establecido por el laboratorio IDEXX (2017) de 95,1%. Las diferencias porcentuales se le atribuyen a la reabsorción embrionaria que presentó el hato. A su vez el contraste entre la especificidad del estudio con los resultados mostrados por el laboratorio, concuerdan con el resultado presentado por Puerto y Ordoñez (2016) en la cual indican que el porcentaje de especificidad están por debajo de los establecido por la empresa, atribuyendo dicha diferencia al porcentaje de mortalidad embrionaria presentada en el hato.

Cuadro 3. Porcentaje de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos, falsos negativos, sensibilidad y especificidad del diagnóstico con kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] a 28 días pos servicio y palpación rectal a 60 días pos servicio.

Diagnóstico final	Vacas	Resultados (%)
Verdaderos positivo	76/131	58.0
Verdadero negativo	31/131	23.7
Falso positivo	20/131	15.3
Falso negativo	2/131	1.5
Sensibilidad	76/78	97.4
Especificidad	31/53	58.4

4. CONCLUSIONES

- El porcentaje de preñez del kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] fue mayor al de la palpación rectal.
- Se obtuvo un nivel de sensibilidad similar al provisto por la empresa, sin embargo la especificidad se vio afectada por el porcentaje de mortalidad embrionaria presentada en el hato.
- La detección temprana de preñez utilizando el kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] permite detectar y cuantificar la mortalidad embrionaria en el hato.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar el kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] como una herramienta para el diagnóstico temprano de preñez en hatos de ganadería de carne.
- Analizar los costos para determinar la rentabilidad de la implementación del kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] en una explotación ganadera de carne.
- Desarrollar un sistema de color flex para poder tener una mejor interpretación de los resultados dudosos.
- Estudiar el kit IDEXX Rapid Visual Pregnancy Test[®] utilizando muestras de sangre o suero, con el objetivo de comparar la sensibilidad y especificada que la empresa provee.

6. LITERATURA CITADA

- Commun LCAF, Velek K, Barbry J-B, Pun S, Rice A, Mestek A, Egli C, Leterme S 2016. Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; 28 (3):207–213.
- Diskin M, Morris D 2008. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reprod. Dome Anim. Suppl 2*: 260-7.
- Garate W, Suarez W 2015. Diagnóstico temprano de preñez con prueba Elisa en ganado lechero mediante el kit IDEXX Bovine Pregnancy® [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 22 p.
- Huanca L. 2001. Inseminación Artificial A Tiempo Fijo En Vacas Lecheras. *Rev Inv Vet Perú*. 12 (2): 161-163.
- IDEXX Laboratories. 2017. Bovine Pregnancy. The IDEXX Bovine Pregnancy Test. 2017 Sep 7 [Consultado 2017 Sep 8]. <https://ca.idexx.com/livestock-poultry/ruminant/lpd-bovine-pregnancy-test.html>
- Paiva R, Batista B. 2015. Como Mejorar sus ingresos con el Diagnóstico de Gestación por Serología. BM Editores. Abr 18 [Consultado 2017 Jul 9]. <http://bmeditores.mx/como-mejorar-sus-ingresos-con-el-diagnostico-de-gestacion-por-serologia/>
- Puerto N, Ordoñez V 2016. Detección temprana de preñez en ganado lechero con prueba ELISA y determinación de costos usando kit IDEXX Visual Pregnancy® [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 22 p.
- Santo S. 2015. La ecuación de la ganadería: nutrición, manejo, sanidad y genética. Inicio. Agos 21 [Consultado 2017 Sep 8]. <http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/la-ecuacion-de-la-ganaderia-nutricion-manejo-sanidad-y-genetica>
- Sas®. 2013. User's guide. Statistical Analysis System Inc., Carry, NC, USA.versión.9.4.
- South Dakota State University 2014. Beef cow preg checks can mean more profit. *Beef Producer*. 2016 Sep 2 [Consultado 2017 Sep 8]. <http://www.beefproducer.com/story-beef-cow-preg-checks-mean-more-profit-10-122207>

7. ANEXOS

Anexo 1. Cálculo de sensibilidad y especificidad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdadero Positivo}}{\text{Verdadero Positivo} + \text{Falso Negativo}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdadero Negativo}}{\text{Verdadero Negativo} + \text{Falso Positivo}} \times 100$$