

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**LAS GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GESTACIÓN
DETECTADAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA ES UN
MÉTODO CONFIABLE Y SEGURO EN EL DIAGNÓSTICO
TEMPRANO DE LA PREÑEZ EN VACAS HOLSTEIN**

POR:

MARCO ANTONIO RODRÍGUEZ HERRERA

TESIS:

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

SEPTIEMBRE 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**LAS GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GESTACIÓN
DETECTADAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA ES UN
MÉTODO CONFIABLE Y SEGURO EN EL DIAGNÓSTICO
TEMPRANO DE LA PREÑEZ EN VACAS HOLSTEIN**

POR:

MARCO ANTONIO RODRÍGUEZ HERRERA

ASESORA PRINCIPAL

DRA. ILDA GRACIELA FERNÁNDEZ GARCÍA

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**LAS GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GESTACIÓN DETECTADAS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA ES UN MÉTODO CONFIABLE Y
SEGURO EN EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE LA PREÑEZ EN VACAS
HOLSTEIN**

TESIS POR:

MARCO ANTONIO RODRÍGUEZ HERRERA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobado
como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

[Firma]
JURADO:

DRA. ILDA GRACIELA FERNÁNDEZ GARCÍA
PRESIDENTE

DR. JOSÉ MONCEBAEZ Y PÉREZ
VOCAL

MC. JOSÉ LUIS COVARRUBIAS CASTRO
VOCAL

ING. MARTÍN CASTILLO RAMÍREZ
VOCAL SUPLENTE

MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**LAS GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GESTACIÓN DETECTADAS
MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA ES UN MÉTODO CONFIABLE Y
SEGURO EN EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE LA PREÑEZ EN VACAS
HOLSTEIN**

TESIS POR:

MARCO ANTONIO RODRÍGUEZ HERRERA

**ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE
ASESORÍA**

ASESORA PRINCIPAL:

DRA. ILDA GRACIELA FERNÁNDEZ GARCÍA

ASESORES:

DR. JOSÉ MONCEBÁEZ Y PÉREZ

MC. JOSÉ LUIS COVARRUBIAS CASTRO

ING. MARTÍN RAMÍREZ CASTILLO

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

SEPTIEMBRE 2012

*La vida es una obra de teatro que no permite
ensayos . . . por eso, canta, ríe, baila, llora y vive
intensamente cada momento de tu vida . . . antes
que el telón baje y la obra termine sin aplausos.*

Charles Chaplin

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Sra. Oliva Herrera Suárez

Usted ha demostrado que no existen imposibles, es para mí un gran ejemplo de vida, superación y un gran ser humano. Gracias por todo el apoyo incondicional que me brindado siempre, por creer en mí, ¡esto es por usted gracias mamá!!

Sr. Eduardo Rodríguez Herrera

A veces no se encuentran las palabras para decir gracias por ser mi padre, por el apoyo que me da y por su gran esfuerzo, gracias papá.

Algunas veces los hermanos somos diferentes en muchas cosas como es nuestra forma de pensar, de actuar, de convivir, etc. pero siempre están ahí apoyando, gracias Eduardo, Gerardo, Guadalupe, Oliva, Norma, José, Alma, Miguel y Daniel.

A mis abuelos, en especial a mi abuela Ma. Belem Suarez Rivera por ser un gran ejemplo de vida, gracias abuelita por todos sus consejos, su apoyo y sus bendiciones.

No comenzamos juntos, pero ahora lo estamos terminando, y espero comenzar y terminar muchas etapas más de mi vida junto a ti, gracias por ser un gran ser humano, por tu apoyo y comprensión gracias Gabriela Camacho García.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida, por darme salud y paciencia para culminar satisfactoriamente mi carrera profesional. Por tener a todos mis seres queridos y permitir que estén a mi lado.

A toda mi familia por su apoyo incondicional.

Especialmente a la Dra. Ilda Graciela Fernández García por su confianza, apoyo y asesoría durante la realización de este proyecto.

A mis sinodales Dr. José Moncebáez y Pérez, MVZ José Luis Covarrubias Castro y el Ing. Martín Ramírez Castillo.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por cobijarme durante estos cinco años, en sus aulas quedan muchos recuerdos.

A mis profesores por sus consejos, sus conocimientos y su tiempo dedicado en cada clase.

A IDEXX y a IASA por facilitar el kit para la detección de las Glicoproteínas Asociadas a la Gestación.

A la MC Susana Rojas Maya y MC Blanca Bautista por la asesoría recibida en el laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Raúl Ulloa Arvizu, del departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Ing. Carlos Valdés Bohigas, propietario del establo El Compás, por facilitar las vacas del estudio.

Al Ing. Miguel Angel Martínez S., encargado de la Hemeroteca por su ayuda en la búsqueda de artículos, espero se le dé mayor difusión a esta área.

Mis amigos que siempre estuvieron conmigo apoyando, especialmente a mis compadres Luis Alberto Flores Flores y Clara Lucía Vera Barreto y al ahijado Alan Lisandro Flores Vera, Mauricio Sánchez Moran, Adrián Zúñiga Coyote, Iván Rodríguez Vergara, Delfino Heriberto de León Campos todos ellos del estado de Morelos, pues con ellos pase todos los cinco años de mi carrera. De Chiapas a Ferlín Sánchez Juárez, Anabel Guadalupe López Jara, quién será una gran amiga en Torreón.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLA	xii
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Fecundación y desarrollo embrionario	3
2.2 Implantación	7
2.3 Reconocimiento materno de la preñez.....	8
2.4 Glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG´S)	10
2.5 Métodos de diagnóstico de preñez.....	11
2.5.1 No retorno al estro.....	12
2.5.2 Palpación rectal.....	12
2.5.3 Ultrasonografía.....	12
2.5.4 Antígenos asociados a la preñez.....	13
2.5.5 Progesterona.....	14
2.5.6 Inmunodiagnóstico	16
2.6 Análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA).....	16
III. OBJETIVO	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Descripción del área de estudio	20
4.2 Animales y manejo del hato lechero.....	20
4.3 Alimentación de las vacas	21

4.4 Muestreo sanguíneo para detectar glicoproteínas asociadas a la gestación mediante la técnica de ELISA (PAG´S-ELISA).	22
4.5 Protocolo para la detección de las glicoproteínas asociadas a la gestación en vacas mediante la técnica de ELISA.....	22
4.5.1 Ractivos	23
4.5.2 Material necesario	23
4.6 Preparación de los reactivos.....	24
4.6.1 Solución de lavado	24
4.7 Diagnóstico de gestación a los 40 días post-inseminación artificial (post-IA)	26
4.8 Análisis estadísticos	26
4.8.1 Sensibilidad	27
4.8.2 Especificidad	27
4.8.3 Valor Predictivo Positivo	28
4.8.4 Valor Predictivo Negativo	28
4.8.5 Seguridad de la prueba	29
4.8.6 Razón de Verosimilitud Positiva	29
4.8.7 Razón de Verosimilitud Negativa.....	29
V. RESULTADOS	30
5.1 Sensibilidad	30
5.2 Especificidad	30
5.3 Valor predictivo positivo	30
5.4 Valor predictivo negativo	30
5.5 Exactitud de la prueba	31
5.6 Seguridad de la prueba	31

VI. DISCUSIÓN	33
VII. CONCLUSIÓN.....	35
VIII. LITERATURA CITADA.....	36

ÍNDICE DE TABLA

Página

32

- Tabla 1.** Tabla de contingencia para evaluar la sensibilidad¹, la especificidad², el valor predictivo positivo³, el valor predictivo negativo⁴ y la exactitud⁵ en la detección de las glicoproteínas asociadas a la gestación-ELISA y el diagnóstico de gestación a los 40 días post-IA.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la especificidad y la sensibilidad de las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG's) en suero sanguíneo en vacas Holstein a los días 28, 29 y 30 post-inseminación artificial, utilizando la técnica de ELISA.. La sensibilidad de la prueba fue del 97%, la especificidad fue de 82%. El valor predictivo positivo fue de 86% y el valor predictivo negativo fue de 96%. La exactitud de la prueba fue del 90%. La razón de verosimilitud positiva, indicó que una vaca preñada diagnosticada mediante las PAG's-ELISA es 5.5 veces más probable que el resultado sea como preñada que como no preñada. La razón de verosimilitud negativa arrojó un valor de 3.2% el cual indica probabilidad de que un resultado de una vaca preñada sea diagnosticada como no preñada. Se concluye que las glicoproteínas asociadas a la gestación detectadas mediante la técnica de ELISA son un método confiable en el diagnóstico temprano de la preñez en vacas Holstein.

Palabras clave. Glicoproteínas Asociadas a la Gestación, ELISA, Especificidad, Sensibilidad, Suero Sanguíneo.

I. INTRODUCCIÓN

Los avances obtenidos mediante las tecnologías aplicadas en los hatos lecheros han permitido el crecimiento de la producción lechera de bovino a nivel nacional (SAGARPA, 2005).

Las principales técnicas que se utilizan en el diagnóstico de la gestación en las vacas lecheras son la palpación rectal y la ecografía transrectal. La técnica de palpación rectal se utiliza rutinariamente; sin embargo, con este método resulta difícil hacer un diagnóstico de la gestación con más precisión antes de los 30 a 35 días después de la inseminación artificial (IA). Actualmente, el uso de la ecografía transrectal cada día adquiere más popularidad entre los profesionales de la reproducción, aunque también se ha observado que la precisión en el diagnóstico de gestación disminuye a los 33 días post-inseminación (Alonso *et al.*, 2012).

Existen otras técnicas en el diagnóstico de la gestación en las vacas, como es la detección de las proteínas a partir de células binucleadas del trofoblasto embrionario. Estas proteínas comprenden a la proteína-B específica de la gestación que fue la primera proteína identificada en la gestación temprana de las vacas. Esta proteína se detectó mediante una prueba inmunoenzimática ELISA (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*). Las concentraciones séricas de las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG's) aumentan de los 15 a los 35 días de gestación, por ello, son utilizadas como un indicador en la gestación de los 26 a 30 días de inseminadas las vacas (Silva *et al.*, 2007).

En base a lo antes mencionado sería interesante detectar las glicoproteínas asociadas a la gestación mediante la técnica de ELISA como método de diagnóstico temprano de la gestación en vacas Holstein.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Fecundación y desarrollo embrionario

El desarrollo folicular, el desarrollo embrionario temprano y la implantación son procesos complejos regulados por múltiples mecanismos celulares, hormonales y moleculares que permiten que después de la fertilización, el ovocito pueda continuar su desarrollo, superar la fase de reconocimiento materno de la preñez y aumentar las posibilidades de sobrevivencia, una vez que se forme la placeta definitiva (Peña *et al.*, 2007).

Cuando el ovocito es liberado durante la ovulación es captado por el infundíbulo del oviducto, descendiendo hasta la unión istmo-ampular en donde aproximadamente 250 000 espermatozoides son capacitados, los cuales rodean la zona pelúcida y, uno de ellos lo fecunda: Posterior a la formación de los pronúcleos femeninos y masculinos ocurre la singamia, dando origen al inicio de la implantación. Posteriormente, el ovocito, y el embrión, tienen contacto con dos tipos de células en el oviducto: las células ciliadas, las cuales se encargarán del transporte hacia el útero y las células secretoras dotadas de gránulos productores de sustancias que ayudan a la maduración de los gametos, a la capacitación de los espermatozoides y al desarrollo embrionario temprano. Existe un tercer tipo de células, las basales que sirven de sostén tanto a las ciliadas como a las secretoras (López *et al.*, 2008).

Durante los primeros estadios de la división celular, desde una célula hasta el blastocisto temprano alrededor del día 7- 8, el embrión se encuentra dentro de la zona pelúcida, donde sus requerimientos para mantenimiento se basan en el piruvato y en el oxalacetato. En estas primeras etapas antes de la fertilización, también se ha evidenciado la presencia de factores de crecimiento, como son el factor transformador alfa (TGF- α), el factor transformador beta (TGF- β) y el factor derivado de plaquetas (PDGF), lo cual sugiere que están involucrados en el proceso de desarrollo temprano del ovocito. Entre los 3 y 4 días posteriores a la fertilización (fase de 8 a 16 células), el embrión migra del oviducto hacia el cuerno uterino en donde la glucosa es utilizada como sustrato energético. El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) está involucrado en el proceso de descenso embrionario, ya que el ARNm que codifica para el IGF-I se ha encontrado en el oviducto bovino durante esta fase de migración. A los 5 ó 6 días de vida embrionaria (fase de 16 a 32 células), se lleva a cabo el proceso de compactación celular, formándose contactos que desarrollan uniones firmes entre las células. En esta etapa el embrión comienza a funcionar como un organismo llamado mórula, el cual es relativamente independiente del ambiente uterino y su supervivencia parece depender de su programación genética. Durante este estadio se expresan las anomalías cromosómicas, lo que podría desencadenar en la muerte embrionaria (Tovío *et al.*, 2008).

El desarrollo de uniones intracelulares estrechas en el estadio de mórula durante la compactación, es seguido por la acumulación de líquido formando una cavidad central que recibe el nombre de blastocele, la cual también acumula líquido proveniente del metabolismo mitocondrial (Hafez y Hafez, 2000).

La localización de la bomba sodio–potasio (Na^+/K^+) activa en la membrana basal del trofoblastodermo para transporte iónico activo, esto establece un gradiente que induce movimiento de líquido hacia adentro del blastocele, provocando expansión que hace que las células de la mórula compactada se ubiquen hacia la zona externa o interna de las vesículas llenas de líquido, con lo cual se forma una capa celular externa que recibe el nombre de trofoblasto y una masa celular interna llamada embrioblasto, originándose de esta manera el estadio de blastocisto; el cual alrededor de los 8 días de vida posee aproximadamente 120 células asociadas con la masa celular interna (embrioblasto) (25%) y el trofoblasto (75%; Tovío *et al.*, 2008).

Este posicionamiento lleva a la formación del trofoblasto (capa celular externa) y a la masa celular interna (embrioblasto) que se fija a un polo abajo del trofoblasto. La diferenciación de estas dos capas celulares específicas proporciona las células iniciales que finalmente contribuyen a la formación de la placenta y el embrión. La masa celular interna desarrolla las tres capas germinales primarias del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo) durante un proceso llamado gastrulación. Estas capas germinales primarias

se diferencian en la piel, el pelo, el músculo, el sistema nervioso, el esqueleto y los órganos que forman el embrión. Por fuera el trofoblasto está cubierto densamente de microvellosidades que funcionan para hacer contacto y adherirse al epitelio uterino materno para fijar la placenta y la captación de nutrientes. (Hafez y Hafez, 2000)

Aproximadamente del 9º al 10º día de vida (fase de 160 células) el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida por combinación de acciones físicas y enzimáticas de la vesícula en expansión. Durante la liberación del blastocisto, la contracción y expansión rítmica de este amplían la zona. La expansión del blastocisto se debe a una hiperplasia celular y al aumento de la acumulación de líquido en el blastocele. Esta liberación podría estar involucrando síntesis de prostaglandinas (especialmente prostaglandina E) por parte del embrión, ya que la progesterona (P4) estaría evitando la expansión y liberación del blastocisto. Las enzimas plasmina y tripsina activan al blastocisto lo cual causa reblandecimiento de su zona matriz permitiendo la expansión y la ruptura a lo largo del plano ecuatorial para la salida de la masa celular (Tovío *et al.*, 2008.; Hafez y Hafez, 2000). Inmediatamente, se establece el primer contacto del embrión y el epitelio uterino materno, lo cual desencadena un intercambio de nutrientes y prepara el ambiente para un estado de pre-implantación embrionaria. Tras la liberación el embrión comienza a cubrir físicamente parte del endometrio para poder comenzar a regular la producción de PGF2 α uterina la cual cumple funciones de luteólisis (Tovío *et al.*, 2008).

2.2 Implantación

En todos los animales el objetivo final de la actividad reproductiva es la preservación de las especies. El desarrollo embrionario temprano y el proceso de implantación son considerados de singular importancia. En estos períodos ocurren algunos cambios bioquímicos, celulares y moleculares en el oviducto, en el útero y en el embrión, que permiten que se establezca una comunicación permanente entre el trofoblasto y el endometrio, la cual será más estrecha cuando se forme la placenta definitiva (Góngora *et al.*, 2002).

La implantación es un proceso complejo que comprende una serie de etapas interactivas, comienzan con la fijación del blastocisto al útero y terminan con la formación de la placenta definitiva (Peña *et al.*, 2007). El éxito de la implantación depende de la sincronía e intercambio molecular madre-embrión inducidos en el útero, cuyo control se atribuye principalmente a los estrógenos y a la progesterona. La implantación comprende tres etapas: 1) la pre-adhesión, el embrión se elonga considerablemente, 2) la aposición, se caracteriza por el contacto celular entre el trofoblasto y el epitelio uterino y 3) la adhesión, que comprende la etapa final del proceso el cual culmina con un aumento de la estructura celular de la placenta epiteliocorial (Góngora *et al.*, 2002).

2.3 Reconocimiento materno de la preñez

El reconocimiento materno de la preñez se define como el periodo crítico en el cual el embrión da señales de su presencia a la madre (Néstor *et al.*, 2008). Es la alteración fisiológica materna como consecuencia de la presencia del embrión, necesaria para el mantenimiento de la preñez. Los cambios en la función materna son mediados por las señales del embrión y potencialmente incluyen la detección de antígenos por el sistema inmune materno (Góngora *et al.*, 2002).

De acuerdo con lo anterior, se sugiere que durante el establecimiento de la preñez se presenta un “periodo crítico” definido entre los días 15 y 17. Se puede decir que la biología durante este periodo es multifactorial y compleja, donde el endometrio podría recibir una señal antiluteolítica poco adecuada que no cause bloqueo en la producción de PGF2 α endometrial, lo que desencadena en la lisis del cuerpo lúteo (el mantenimiento de la preñez es dependiente de la funcionalidad del cuerpo lúteo). Esta señal es generada en las células del trofoblasto embrionario las cuales secretan el factor antiluteolítico conocido como interferón tau IFN- τ (Tovío *et al.*, 2008). Esto incluye la inhibición de la liberación de PGF2 α , la modificación del ambiente uterino y los cambios que evitan el rechazo inmunológico del embrión. Las células mononucleares del trofoblasto secretan alrededor del día 16 el interferón-tau, que inhibe la síntesis de receptores para los estrógenos, receptores para la oxitocina y por lo tanto inhibe la secreción de PGF2 α , evitando la luteólisis y asegurando la permanencia del cuerpo lúteo (Bartolomé *et al.*, 2009).

Existen otros factores endocrinológicos, celulares y moleculares que determinan el mantenimiento o no de la preñez, pero aún no han sido demostrados (Tovío *et al.*, 2008).

Está demostrado que el embrión también modifica el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, el movimiento de fluidos, la respuesta del cuerpo lúteo a las prostaglandinas, la actividad secretora y metabólica del útero, la transferencia de nutrientes, la actividad inmune y el desarrollo de la glándula mamaria. Así mismo, el feto presenta antígenos de histocompatibilidad que podrían originar una respuesta inmune con los linfocitos-T por parte de la madre. Los esteroides (estrógeno y progesterona) tienen acción pro y anti-inflamatoria, respectivamente. Durante el desarrollo embrionario y fetal, la progesterona es la encargada de inhibir la respuesta inmune contra los tejidos embrionarios y fetales, tratando de no comprometer la respuesta inmune contra agentes infecciosos. En forma simplificada, la progesterona afecta la diferenciación de las células T, favoreciendo la producción de citocinas para las células Th-2 e inhibiendo las citocinas en las células Th-1 y de esta manera permite la implantación (Bartolomé *et al.*, 2009).

Básicamente el reconocimiento materno de la preñez está regulado por la capacidad del endometrio en responder a las señales generadas por el embrión, lo que desencadena el bloqueo en la producción de PGF2 α . Este bloqueo depende básicamente de la elongación del embrión el cual debe cubrir una adecuada cantidad del cuerno uterino para comenzar a generar la síntesis de IFN- tau. Tomando en cuenta lo anterior, se ha evidenciado que

el embrión bovino varía su tamaño, el cual es 15 a 250 mm. En el día 17, el desarrollo embrionario es regulado en gran parte por interacciones dirigidas por la P4 (Tovío *et al.*, 2008).

2.4 Glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG´S)

Las glicoproteínas asociadas a la gestación, son proteínas trofoblásticas perteneciente a la familia de proteinasa aspártica secretadas por diferentes células de la placenta en algunas especies de mamíferos. Son una familia multigénica que se expresa en la placenta de los mamíferos euterios (Jerome *et al.*, 2011). Las PAG´S son producidas en la placenta de los rumiantes domésticos y en otras especies del orden Artiodactyla (Haugejorden *et al.*, 2006). Las PAG´S se identificaron por primera vez en la placenta de vacas, después en ovejas, en cabras y en la cerda. Las PAG´S se sintetizan específicamente por las células trofoblásticas (Constant *et al.*, 2011). Las PAG´S juegan un papel fundamental en la placentogénesis, que es la unidad de remodelación feto-materna e implantación. Las PAG´S son una gran familia de moléculas proteicas producidas por el embrión y son reconocidas por la madre. A las PAG´S también se les conoce como proteína B específica de la gestación (PSPB, por sus siglas en inglés), o PSP-60, Y SBU3, que es secretada por las células binucleadas del embrión. Las PAG´S se detectan en la sangre materna poco después de la implantación como células binucleadas y migran del trofoectodermo, y luego se fusionan con las

células epiteliales uterinas y por ello, se considera como una señal potencial del embrión (Jerome *et al.*, 2011).

Las PAG's en las vacas se detectan en la sangre materna a partir de la tercera semana de gestación, las mediciones en la sangre se utilizan como un método de diagnóstico temprano de gestación. Los niveles máximos de PAG's se alcanzan después del parto, y permanecen en la circulación sanguínea por varias semanas después del parto (Haugejorden *et al.*, 2006).

2.5 Métodos de diagnóstico de preñez

Desde el punto de vista económico y productivo resulta interesante conocer el estado reproductivo de los animales en una explotación en el menor tiempo posible después de la inseminación artificial, con el objetivo de planificar el trabajo, o en caso de que el diagnóstico de gestación sea negativo, solucionar el problema cuanto antes, ya sea, adelantando la siguiente inseminación artificial, o aplicando la técnicas adecuadas. Para ello, se cuenta con herramientas diagnósticas como son palpación rectal, la ecografía o la determinación de la progesterona y las PAG's, entre otras (España *et al.*, 2004).

2.5.1 No retorno al estro

Durante la preñez, el feto inhibe la regresión del cuerpo lúteo (CL) e impide que la madre vuelva al estro. Por tanto, se supone que una hembra que no reinicia el estro está preñada (Hafez y Hafez, 2000).

2.5.2 Palpación rectal

La palpación rectal es la técnica más utilizada por la mayoría de técnicos clínicos a partir del día 40 posterior a la monta o a la inseminación artificial. Sin embargo, la palpación rectal tiene la limitante de que se debe volver a hacer una confirmación a los 60 días de haber finalizado los programas de monta o inseminación artificial, generando información poco oportuna para identificar hembras vacías (Alonso *et al.*, 2012).

Con este procedimiento se palpa el útero a través de la pared rectal para detectar el agrandamiento uterino que ocurre durante la gestación, así como, el feto o las membranas fetales y la arteria uterina media. La palpación rectal, puede aplicarse en una etapa temprana de la preñez y permite conocer el resultado de la preñez inmediatamente (Hafez y Hafez, 2000).

2.5.3 Ultrasonografía

Las ondas de ultrasonido son inaudibles para el oído humano, los sonidos audibles están entre 20 – 20 000 hertzios (Hz, o ciclos por segundo) y los ultrasonidos diagnósticos operan a frecuencias de 1 a 10 megahertz (MHz), ninguno se propaga en el vacío y en medio gaseoso la transmisión es

pobre. Cuando las ondas chocan con un tejido, un líquido o un gas, algunas son absorbidas y otras se reflejan en forma de ecos que son captados por el equipo para ser interpretados en forma de imágenes (Hafez y Hafez, 2000; Giraldo, 2003).

El uso de la ultrasonografía en tiempo real es de gran utilidad en la reproducción bovina, ya sea para conocer con mayor profundidad algunos puntos de su biología reproductiva, como son los cambios fisiológicos ováricos y uterino, y para determinar gestaciones tempranas y dar seguimiento al desarrollo embrionario. No obstante debido al costo de los equipos, aún no se considera una tecnología prioritaria en la práctica buiátrica. De las ventajas que se le atribuyen a la ultrasonografía en el diagnóstico temprano de gestación, se menciona la observación del embrión, así como, su desarrollo y su viabilidad a partir de la visualización del latido cardíaco, aspectos que mediante la palpación rectal son prácticamente imposibles (Alonso *et al.*, 2012).

2.5.4 Antígenos asociados a la preñez

Se ha detectado la presencia de antígenos específicos de la preñez en tejidos maternos en algunas especies. La mayor parte de estos antígenos se detectan en sangre materna durante la segunda mitad de la gestación y son de utilidad limitada en las pruebas de preñez. El feto bovino produce numerosas señales durante la preñez temprana. Actualmente sólo una proteína del tejido placentario ha sido parcialmente purificada: la proteína B

específica de la gestación (PSPB) y puede detectarse mediante radioinmunoensayo (RIA) en suero de vaca preñada desde el día 24 hasta el parto (Hafez y Hafez, 2000).

2.5.5 Progesterona

Se pueden encontrar valores altos de esta hormona alrededor del día 10 después de la ovulación. Consecuentemente, en la vaca gestante la concentración de progesterona en sangre o leche se mantiene alta alrededor de los días 21 y 24 después de la ovulación y ésta será basal en un animal no gestante. Por lo tanto, una muestra tomada en ese tiempo puede ser usada como diagnóstico de gestación. El desarrollo de ensayos inmunológicos rápidos y altamente sensibles como el RIA, el ELISA y últimamente quimioluminiscencia, han permitido la explotación comercial de esta prueba.

La medición de progesterona, independientemente de la técnica usada, presenta desventajas. Debido a que la concentración de progesterona refleja la función del cuerpo lúteo y no de la presencia del embrión, ya que vacas que no estén gestantes pueden presentar prolongaciones del ciclo por cualquier razón y pueden ser diagnosticadas como positivas. Además, una proporción importante de muertes embrionarias pueden ocurrir después del día 24 y, por lo tanto, el diagnóstico aunque inicialmente correcto no brinda información útil. Aproximadamente del 80 - 85% de los diagnósticos positivos entre los días 21 y 24 son exactos, es decir, el resultado final es el

nacimiento de una cría. De un 15 - 20% de las vacas con niveles altos de progesterona no presentan una parición posterior, es decir, se convierten en falsos positivos. Por otro lado, el hallazgo de niveles bajos de progesterona entre los días 21 y 24 indica la ausencia de gestación en prácticamente el 100% de los casos. Es decir, la prueba de progesterona es considerada una prueba altamente exacta para el diagnóstico de ausencia de gestación permitiendo un nuevo servicio en forma temprana. A pesar de las desventajas de esta prueba, esta presenta la ventaja de facilidad de uso y la posibilidad de realizarla en forma más temprana en la gestación (Matamoros *et al.*, 2002).

Actualmente, la medición de la P4 ha sido el método más ampliamente usado para detectar la preñez en las especies domésticas. Aunque no es específica de tal estado, la progesterona puede emplearse como prueba de preñez, debido a que el cuerpo lúteo persiste durante la etapa inicial de la gestación en todos los animales domésticos (Hafez y Hafez, 2000).

En la literatura científica se encuentran numerosos trabajos en donde se valora la eficacia de la determinación de progesterona para el diagnóstico de gestación entre los días 19 y 24, realizadas tanto en muestras de suero o plasma sanguíneas y en leche. Actualmente, la determinación de progesterona se utiliza poco por su elevado costo (España *et al.*, 2004).

2.5.6 Inmunodiagnóstico

Las técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la preñez se basan en la detección o la medición de las concentraciones de sustancias que se originan en el embrión, útero o en los ovarios y que llegan a torrente sanguíneo, a la orina o a la leche materna. Las pruebas inmunológicas miden dos tipos de sustancias: las específicas de la preñez, que aparecen en la sangre materna y las no específicas de la preñez, donde la concentración en sangre, orina o en leche cambian durante la gestación (Hafez y Hafez, 2000).

2.6 Análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA)

Dentro de los métodos más confiables de inmunodiagnóstico, por su fácil manejo, alta sensibilidad y especificidad, se encuentran las pruebas inmunoenzimáticas; la más importante es la técnica de ELISA, la cual es utilizada para la detección de anticuerpos y antígenos ELISA indirecto (Cornejo *et al.*, 2010; Tizard., 2009).

Los inmunoenzayos enzimáticos dependen básicamente de 2 hechos: a) el antígeno o anticuerpo pueden ser ligados a un soporte de fase sólida y retener su actividad inmunológica y b) el antígeno o anticuerpo pueden estar ligados a una enzima y, el complejo, retener ambas actividades, la inmunológica y la enzimática. Así, una molécula de enzima puede reaccionar con muchas moléculas de sustrato durante la hidrólisis, de la enzima ligada al antígeno o anticuerpos sobre el sustrato, lo que amplifica las reacciones

inmunológicas, proporcionando un ensayo con gran sensibilidad (Suárez *et al.*, 1990).

La forma más común del ELISA se utiliza para detectar y cuantificar anticuerpos específicos. Para la realización de esta técnica, primero se llenan los pocillos de las microplacas de poliestireno con una solución de antígeno. Debido a que las proteínas se unen firmemente a las superficies de poliestireno, los pocillos quedan recubiertos (tapizados) con una capa de antígeno después de que el antígeno sin unir es eliminado por un lavado enérgico. Estas placas “antigenadas” pueden almacenarse hasta que se necesiten. El suero a analizar se añade a los pocillos, de manera que los anticuerpos específicos del suero se unirán a la capa de antígeno. Después de incubar y lavar para eliminar los anticuerpos sin unir, la presencia de anticuerpos unidos se detecta por la adición de una solución que contiene una antiglobulina ligada químicamente a una enzima. Esta antiglobulina marcada se unirá al anticuerpo, y después de la incubación y lavado, se detecta y se mide al añadir una solución que contiene el sustrato de la enzima. La enzima y el sustrato se seleccionan para asegurar que se desarrolla un producto coloreado en el pocillo. Por tanto, la intensidad de color que se desarrolla es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero analizado. La cantidad de color se puede estimar a simple vista, o preferiblemente, mediante un espectrofotómetro (Tizard., 2009).

El ensayo inmunoenzimático ELISA es una de las pruebas más ampliamente usadas, su sensibilidad y su especificidad dependen fundamentalmente de la calidad de los antígenos empleados (Colmenares *et al.*, 2007).

III. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es determinar la especificidad y la sensibilidad de las glicoproteínas asociadas a la preñez en los días 28, 29 y 30 post-inseminación presentes en la gestación temprana y detectadas mediante la técnica de ELISA comparadas con la palpación rectal realizada en los 40 días post-inseminación artificial en vacas Holstein.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el establo El Compás, ubicado en el municipio de Gómez Palacio, localizado en el estado de Durango, entre los paralelos 25° 32' y 25° 54' de latitud norte; los meridianos 103° 19' y 103° 42' de longitud oeste; altitud entre 1,100 y 1,800 metros sobre el nivel del mar. El clima de esta región es muy seco semi-cálido con lluvias en verano con un rango de temperatura de 18-22 °C y una precipitación de 100-400 mm (SAGARPA, 2010).

4.2 Animales y manejo del hato lechero

Se utilizaron vacas Holstein (n = 72), el estudio se realizó en el mes de noviembre. Se seleccionaron vacas de 28, 29 y 30 días post-inseminadas. Las vacas presentaron estro natural, se encontraban en corrales abiertos y se ordeñaban 2 veces por día. El semen utilizado en el establo fue de toros probados de alto valor genético. Las vacas lecheras del estudio se encontraban en instalaciones con alta tecnología como: sala de ordeño, ventiladores, aspersores en sala de ordeño, sombras en los corrales, podómetros, trampas para el manejo del ganado, camas de descanso, comederos adecuados y bebederos automáticos. El manejo sanitario que se llevó a cabo en el establo incluyó tapete o arco sanitario, pediluvios, cerco perimetral. Las vacas se vacunaron contra Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, Leptospirosis, Neosporosis, Rabia

Paralítica Bovina, Pasteurelisis y Ántrax. El hato lechero cuenta con certificado libre de Brucelosis y Tuberculosis bovina.

La desparasitación se basó según los parásitos presentes en ésta región (*Ostertagia sp.*, *Haemonchus sp.*, *Cooperia sp.*, *Nematodirus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, *Trichuris sp.*, *Trichostrongylus sp.*). La desinfección de salas de ordeña se realizó con piretrinas y sales cuaternarios de amonio.

Se llevó a cabo control de plagas contra mosca (*Stomoxis calcitrans*) establera y roedores (*Mus Musculus*), además control de malezas.

4.3 Alimentación de las vacas

La alimentación proporcionada a las vacas fue con una dieta integral de acuerdo a su estado productivo en el que se encontraba el lote (vacas frescas, en pico de producción y vacas en persistencia), y a los requerimientos nutricionales según su nivel de producción de leche (altas, medias y bajas).

4.4 Muestreo sanguíneo para detectar glicoproteínas asociadas a la gestación mediante la técnica de ELISA (PAG´S-ELISA).

Las muestras sanguíneas se obtuvieron en tubos vacutainer sin anticoagulante (BD Vacutainer), mediante venopunción de la vena caudal media o arteria. Inmediatamente a su obtención, las muestras se llevaron al laboratorio del Comité de Campaña de Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis de la Región Lagunera de Coahuila y Durango, A. C., donde se centrifugaron a 3 500 rpm durante 30 min. El suero sanguíneo se congeló a -20°C hasta su análisis. Posteriormente, las muestras se enviaron y se analizaron en el laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.5 Protocolo para la detección de las glicoproteínas asociadas a la gestación en vacas mediante la técnica de ELISA

Se utilizó un kit comercial (IDEXX), esta prueba es un inmunoensayo enzimático detecta la presencia temprana de glicoproteínas asociadas a la gestación que actúan como marcadores de la gestación. Se utilizó un formato de placa de microtitulación revestido con un anticuerpo anti-PAG. Tras la dilución e incubación de la muestra en el pocillo revestido, se detectaron las PAG capturadas con un anticuerpo específico frente a las PAG (solución de detección) con un conjugado de peroxidasa de rábano picante (conjugado HRPO). Mediante un lavado se eliminó el conjugado no ligado y se añadió el sustrato TMB a los pocillos. La aparición de la coloración se consideró proporcional a la cantidad de las PAG´s en la muestra.

4.5.1 Reactivos

Los reactivos se mantuvieron entre 2-8 °C

Reactivo	volumen
1. Placas tapizadas con anticuerpos anti-PAG	5
2. Control positivo de PAG	1 x 3.5 ml
3. Control negativo	1 x 3.5 ml
4. Conjugado HRPO	1 x 60 ml
5. Diluyente de la muestra	1 x 20 ml
A. Solución concentrada del lavado (10x)	1 x 480 ml
B. Substrato TMB	1 x 60 ml
C. Solución de frenado	1 x 60 ml
D. Solución de detección	1 x 60 ml

4.5.2 Material necesario

Pipetas de precisión o pipetas multicanal adecuadas para dispensar de 10 a 1000 μ l

- Puntas desechables
- Probetas graduadas para la solución de lavado
- Lector de placas de 96 pocillos provisto de filtro de 450 nm y filtro de referencia (620-650 nm)
- Agua destilada o desionizada

4.6 Preparación de los reactivos

4.6.1 Solución de lavado

La solución concentrada de lavado 10x se mantuvo a temperatura ambiente (18-25 °C) y mezcló bien para garantizar la disolución de las sales que hayan podido precipitar. Antes de utilizarse la solución concentrada de lavado se diluyó 1:10 con agua destilada o desionizada.

Todos los reactivos se atemperaron a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usarlos. Los reactivos se mezclaron mediante movimientos circulatorios suaves. Se utilizó una nueva punta en las pipetas en cada muestra.

1. Se obtuvieron las placas necesarias del kit de gestación de bovinos y anotó la posición de las muestras en una hoja de trabajo.
2. Se utilizaron las tiras de microtitulación necesarias para el ensayo.
3. Se dispensó 25 µl de diluyente de la muestra en los pocillos que se utilizaran para las muestras y los controles.
4. Se dispensó 100 µl de control negativo en dos pocillos de la placa de análisis.
5. Se dispensó 100 µl de control positivo en dos pocillos de la placa de análisis.
6. Se dispensó 100 µl de muestras en los pocillos adecuados.
7. Se homogenizó el contenido mediante agitación de la placa.

8. Se taparon los pocillos y se incubaron durante 60 min (\pm 5 minutos) a 37 °C (\pm 2 °C). Las placas se sellaron para evitar la evaporación.
9. Se aspiró el contenido líquido de todos los pocillos y se vació en un recipiente de residuos apropiado.
10. Se lavó cada pocillo de 3 a 5 veces con unos 300 μ l de solución de lavado 1x. Después de cada lavado, se aspiró el contenido líquido de todos los pocillos. Tras la última aspiración, se golpeó cada placa firmemente sobre un material absorbente para eliminar cualquier resto de solución de lavado. Se evite que la placa se seque entre lavado y lavado y antes de añadir el siguiente reactivo.
11. Se dispensó 100 μ l de solución de detección en cada pocillo.
12. Se cubrieron los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos (\pm 2 minutos).
13. Se repitieron los pasos 9 y 10.
14. Se dispensó 100 μ l de conjugado HRPO en cada pocillo.
15. Se cubrió los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos (\pm 2 minutos).
16. Se repitieron los pasos 9 y 10.
17. Se dispensó 100 μ l de solución substrato TMB en cada pocillo.
18. Se incubó durante 15 minutos (\pm 1 minuto) a temperatura ambiente (18-25 °C).

19. Se dispensó 100 µl de solución de frenado en cada pocillo para detener la reacción. Se añadió la solución de frenado en el orden en que se añadió la solución de substrato en el paso 17.

20. Se midió y se anotó el valor de $A(450\text{ nm})-A(\text{REF})$ de las muestras y los controles. La longitud de onda de referencia fue de $A(620-650\text{ nm})$.

21. Se calcularon los resultados.

4.7 Diagnóstico de gestación a los 40 días post-inseminación artificial (post-IA)

El diagnóstico de gestación se llevó a cabo a los 40 días mediante palpación rectal por una persona con amplia experiencia.

4.8 Análisis estadísticos

Se utilizó el estadístico kappa del PROC FREQ de SAS (SAS, 2003) para analizar la concordancia entre los resultados obtenidos de las glicoproteínas asociadas a la preñez mediante la técnica de ELISA y el diagnóstico de palpación rectal realizado a los 40 días post-inseminación artificial. Un valor de kappa de 1 indica concordancia y el valor de 0 no concordancia (Martin *et al.*, 1987).

Mediante la prueba de McNemar's se compararon las razones de los datos pareados. Un par pareado es cuando una observación en un primer grupo también tiene una observación en un segundo grupo (Pagano y

Gauvreau, 2000). En la presente tesis, los datos pareados incluyeron los resultados de las glicoproteínas asociadas a la preñez mediante la técnica de ELISA (PAG's-ELISA) y los resultados de diagnóstico la palpación realizada a los 40 días post-inseminación.

Se construyó una tabla de contingencia 2 x 2 analizar los datos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, la exactitud de las PAG's-ELISA y el diagnóstico de gestación a los 40 días post-IA (Silva *et al.*, 2007).

4.8.1 Sensibilidad

La sensibilidad de la prueba se expresa como el porcentaje de vacas clasificadas correctamente como *vaca gestante* y se expresa como:

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

Donde

VP = Verdaderos positivos

FN = Falsos negativos

4.8.2 Especificidad

La especificidad es el porcentaje de vacas clasificadas correctamente como *vaca no gestante* y se expresa como:

$$\text{Especificidad} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

Donde

VN = Verdaderos negativos

FP = Falsos negativos

4.8.3 Valor Predictivo Positivo

El valor predictivo positivo (**VPP**), es el porcentaje de vacas diagnosticadas como gestantes mediante las PAG´s-ELISA y resultaron gestantes en el diagnóstico de palpación, y se expresa como:

$$\mathbf{VPP = VP / (VP + FP)}$$

Donde

VP = Verdaderos positivo

FP = Falsos positivos

4.8.4 Valor Predictivo Negativo

El valor predictivo negativo (**VPN**), es el porcentaje de vacas con resultado como no gestante mediante la detección de PAG´s-ELISA, y que resultaron como no gestantes en el diagnóstico de palpación, y se expresa como:

$$\mathbf{VPN = VN / (VN + FN)}$$

Donde

VN = Verdaderos negativos

FN = Falsos negativos

4.8.5 Seguridad de la prueba

Para determinar la seguridad de la prueba se realizaron dos cálculos adicionales, mismos que incluyeron la razón de falsos positivos y falsos negativos, mediante la razón de verosimilitud positiva y negativa.

4.8.6 Razón de Verosimilitud Positiva

La razón de resultados falsos positivos es la *verosimilitud* que un resultado de una vaca preñada y que esta vaca realmente no esté preñada, esta razón está relacionada a la prueba de especificidad y se expresa como:

$$\text{RVP} = \text{Sensibilidad} / (1 - \text{Especificidad})$$

4.8.7 Razón de Verosimilitud Negativa

La proporción de resultados falsos negativos es el resultado de una vaca no preñada y que en realidad se encuentre preñada, esta proporción se relaciona con la prueba de sensibilidad, y se expresa como:

$$\text{RVN} = 1 - \text{Sensibilidad} / \text{Especificidad}$$

V. RESULTADOS

5.1 Sensibilidad

La sensibilidad de la prueba fue del 97% (37/38; 85-99%), es el porcentaje de vacas diagnosticadas como gestantes mediante las PAG´s-ELISA (Tabla 1).

5.2 Especificidad

La especificidad fue de 82% (28/34; 64-92%), es el porcentaje de vacas diagnosticadas como no gestantes mediante la detección de las PAG´s-ELISA (Tabla 1).

5.3 Valor predictivo positivo

El valor predictivo positivo fue de 86% (37/43; 72-94%), es el porcentaje de vacas que resultaron como preñadas mediante las PAG´s-ELISA y que resultaron preñadas a los 40 días post-inseminación artificial (Tabla 1).

5.4 Valor predictivo negativo

El valor predictivo negativo obtenido fue de 96% (28/29; 80-99%), es el porcentaje de vacas que resultaron como no gestantes mediante la detección de las PAG´s-ELISA y que no estaban preñadas a los 40 días post-inseminación artificial (Tabla 1).

5.5 Exactitud de la prueba

La exactitud de la prueba fue del 90% (80 - 95%), es decir, es el porcentaje de diagnósticos se realizaron correctamente (Tabla 1).

5.6 Seguridad de la prueba

La razón de verosimilitud positiva, indica que una vaca preñada obtenida mediante las PAG´s-ELISA es 5.5 veces (2.7-11.5) más probable que sea diagnosticada como preñada que como no preñada.

La razón de verosimilitud negativa arrojó un valor de 0.0320, esto es 3.2% la probabilidad de que una vaca preñada sea diagnosticada como no preñada mediante las PAG´s-ELISA.

Tabla 1. Tabla de contingencia para evaluar la sensibilidad¹, la especificidad², el valor predictivo positivo³, el valor predictivo negativo⁴ y la exactitud⁵ en la detección de las glicoproteínas asociadas a la gestación-ELISA y el diagnóstico de gestación a los 40 días post-IA.

Palpación a los 40 días post-IA			
	Preñadas	No preñadas	Total
PAG´s-ELISA			
	37(a)	6(c)	43
Preñadas			
No preñadas	1(b)	28(d)	29
Total	38	34	72 (N)

¹Proporción de sueros de vacas preñadas con resultado positivo mediante PAG´s-ELISA $[a/(a + b)] \times 100$.

²Proporción de sueros de vacas no preñadas con un resultado negativo mediante PAG´s-ELISA $[d/(d + c)] \times 100$.

³Proporción de resultados de preñez mediante PAG´s-ELISA que estaban realmente preñadas $[a/(a + c)] \times 100$.

⁴Proporción de resultados de no preñez mediante PAG´s-ELISA que realmente no estaban preñadas $[d/(c + b)] \times 100$.

⁵Proporción de resultados de preñez (preñadas y no preñadas) que fueron correctamente diagnosticadas mediante las PAG´s-ELISA $[(a + d)/N] \times 100$.

VI. DISCUSIÓN

La alta sensibilidad obtenida en el presente estudio concuerda con reportes previos donde un alto porcentaje de vacas son diagnosticadas como preñadas mediante la detección de las PAG's-ELISA (Silva *et al.*, 2007). Por el contrario, también se ha reportado valores bajos en la sensibilidad en vacas diagnosticadas como preñadas antes de los 29 días post-IA mediante las PAG's-RIA, donde los valores encontrados estuvieron entre el 75 y 81.2% (Szenci *et al.*, 1998). En la presente tesis se observó alto el valor predictivo negativo, es decir, el 96% de las vacas detectadas como no preñadas mediante las PAG's-ELISA, efectivamente no estaban preñadas a los 40 días post-IA diagnosticadas mediante palpación rectal. Este hallazgo es similar al reportado por Silva *et al.* (2007) quienes obtuvieron un valor de 97.1%. Existen pocos reportes que indiquen los valores de la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo negativo en la detección de las PAG's-ELISA comparadas con el diagnóstico de gestación a los 40 días post-IA mediante palpación rectal. Efectivamente, Zoli *et al.* (1992) detectaron las PAG's mediante RIA y realizaron el diagnóstico de gestación mediante palpación rectal a los 45 días. Actualmente el diagnóstico de gestación se realiza mediante ultrasonografía transrectal, técnica ampliamente utilizada en los hatos lecheros (Silva *et al.*, 2007; Romano *et al.*, 2006; Fricke *et al.*, 2003; López-Gatius *et al.*, 2007; Alonso *et al.*, 2012). Sin embargo, son frecuentes los errores en el diagnóstico de gestación antes de los 30 días post-IA a tiempo fijo, el empleo de esta

técnica reduce el beneficio de contar con un diagnóstico de gestación temprano (Silva *et al.*, 2007; Badtram *et al.*, 1991). Efectivamente, el método de palpación rectal continúa siendo una práctica común por razones de manejo del hato y de bajo costos (Zoli *et al.*, 1992; Warnick *et al.*, 1995; Reimers *et al.*, 1985; Alexander *et al.*, 1995). Por ejemplo, de las 72 vacas diagnosticadas, sólo 7 vacas dieron un resultado no compatible entre las PAG's y la palpación rectal a los 40 días post-IA. Estas vacas se volvió a verificar su estado reproductivo y los resultados indicaron que una vaca diagnosticada como preñada mediante las PAG's-ELISA abortó a los 59 días post-IA. Las 6 vacas restantes que dieron resultados positivos a las PAG's-ELISA y resultaron no preñadas al realizar la palpación rectal. Efectivamente, estas vacas no estaban preñadas cuando se volvieron a checar mediante palpación rectal a los 50 días. Como se mencionó anteriormente el alto valor predictivo negativo sugiere que pocas vacas sufrieron de pérdida embrionaria (Silva *et al.*, 2007). Por otro lado, desde el punto de vista práctico, la ausencia de las PAG's-ELISA entre los 28, 29 y 30 días post-IA, contribuye al hecho de que esas vacas no tengan que esperar entre 12, 11 y 10 días a que sean diagnosticadas a los 40 post-IA mediante la palpación rectal, como se hace comúnmente en muchos hatos lecheros de esta región. Por lo que, una vez que se tenga el diagnóstico de vacas no gestantes, podrán ser sometidas inmediatamente a los diversos programas de sincronización hormonal disponibles actualmente. Lo cual contribuye a disminuir los costos de manutención de las vacas no gestantes.

VII. CONCLUSIÓN

Las glicoproteínas asociadas a la gestación detectadas mediante la técnica de ELISA son un método confiable y seguro para llevar a cabo el diagnóstico temprano de la preñez en vacas Holstein.

VIII. LITERATURA CITADA

- Alexander, B. M., Johnson, M. S., Guardia, R. O., Van de Graaf, W. L., Senger, P. L., Sasser, R. G., 1995. Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology*. 43, 551-556.
- Alonso-Alanusa, L., Galina, H. C., Romero, Z. J., Estrada, K. S., Galindo, B. J., 2012. Utilidad de la palpación rectal y ecografía transrectal en el diagnóstico de gestación del ganado cebú en el trópico húmedo de Costa Rica. *Revista Científica*, XXII, 09-16.
- Badtram, G. A., Gaines, J. D., Thomas, C. B., Bosu, W. T. K. 1991. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. *Theriogenology* 35:1153–1167.
- Bartolomé, J. A., 2009. Endocrinología y fisiología de la gestación y el parto en el bovino. *Taurus*, Bs. As., 11 (42): 20-28.
- Colmenares, C., Méndez, L., Díaz, B. Z., de Noya, B. A., 2007. Antígeno excreción-secreción de *Fasciola* hepática: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, April-June, 259-266.
- Constant, F., Camous, S., Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., de Sousa, N., Richard, C., Beckers, J.F., Guillomot M. 2011. Altered secretion of pregnancy-associated glycoproteins during gestation in bovine somatic clones. *Theriogenology* 76, 1006-1021.
- Cornejo, H., Oblitas, F., Cruzado, S., Quispe, W., 2010. Evaluación de una prueba de ELISA con antígeno metabólico de *fasciola* hepática para el diagnóstico de fasciolosis humana en Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, Vol. 27, 569-574.
- España, E. F., Pérez. M. C., Rodríguez. A. I., Dorado. M. J., Hidalgo, P. M., 2004. Estudio comparativo de la eficacia del diagnóstico precoz de gestación en vacuno mediante ecografía luteal y progesterona plasmática. *Revista Científica*, XIV (1).
- Fricke, P. M., Caraviello, D. Z., Weigel, K. A., Welle, M. L., 2003. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals after first timed insemination. *J. Dairy Sci.* 86:3941–3950.

- Giraldo, C. 2003. Principios básicos de ultrasonografía veterinaria. Revista MVZ Córdoba, 8 (002) 303-309.
- Góngora, A., Grajales, H., Hernández, A. 2002. Aspectos morfofisiológicos y endocrinos durante la implantación embrionaria en rumiantes. Rev Med Vet Zoot; 49: 3-12.
- Haugejorden, G., Waage, S., Dahl, E., Karlberg, K., Beckers, J.F., Ropstad, E. 2006. Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. Theriogenology 66, 1976-1984.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B., 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. McGraw-Hill Interamericana. Séptima ed, p. 405-414.
- Jerome, A., Singh, S.K., Agarwal, S.K., Mohini Saini., Ashwin Raut., 2011. Characterization and In Silico Analysis of Pregnancy-Associated Glycoprotein-1 Gene of Buffalo (*Bubalus bubalis*). Genetics Research International, Vol 2011, Article ID 436138.
- López, A.P., Gómez, L.F., Ruiz-Cortés Z.T., Olivera, M., Giraldo, C.A., 2008. Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. Analecta Veterinaria; 28 (1): 42-47.
- López-Gatius, F., Garbayo, J. M., Santolaria, P., Yániz, J., Ayad, A., de Sousa, N. M., Beckers, J. F., 2007. Milk production correlates negatively with plasma levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) during the early fetal period in high producing dairy cows with live fetuses. Domest Anim Endocrinol. 32, 29-42.
- Martin, S. W., Meek, A. H., Willeberg, P., 1987. Measurement of disease frequency and production. in Veterinary Epidemiology: Principles and Methods. 1st ed. Iowa State Univ. Press, Ames. Pág. 62–76.
- Matamoros, R., Gómez, C., Andaur, M., 2002. Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. Archivos de Medicina Veterinaria, 34 (2) 167-182.

- Pagano, M., Gauvreau, K., 2000. Contingency tables. Principles of Biostatistics.. Duxbury, Pacific Grove, CA. 2nd ed. Pág. 349-352.
- Peña, J.M., Góngora, O. A., Estrada L. J., 2007. Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implantaciones en la producción de embriones bovinos. Revista MVZ Córdoba, 12 (001) 942-954.
- Reimers, T. J., Smith, R. D., Newman S. K., 1985. Management Factors Affecting Reproductive Performance of Dairy Cows in the Northeastern United States. J. Dairy Sci. 68:963-72.
- Romano, J. E., Thompson, J. A., Forrest, W. D., Westhusin, M. E., Tomaszewski, M. A., Kraemer, D. C., 2006. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. Theriogenology 66:1034–1041.
- SAGARPA. 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005.
- SAGARPA.2010. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- SAS Institute. 2003. SAS 9.1, Version 3. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Silva, E., Sterry, R.A., Kolb, D., Mathialagan, N., McGrath, M.F., Ballam, J.M., Fricke, P. M., 2007. Accuracy of a Pregnancy-Associated Glycoprotein ELISA to Determine Pregnancy Status of Lactating Dairy Cows Twenty-Seven Days After Timed Artificial Insemination. J. Dairy Sci, 90:46-12.
- Suárez, S. Ma. A., González, G. Ma., 1990. Inmunoensayo Enzimático (ELISA) para la detección de enterotoxinas B y C de *S. aureus* en leches. Salud Pública de México, enero-febrero, 32 (001) 64-73.
- Szenci, O., Beckers, J. F., Humblot, P., Sulon, J., Sasser, G., Taverne, M. A. M., Varga, J., Baltusen, R., Scheckk, G., 1998b. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. Theriogenology 50:77–88.

- Tizard, R.I., 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. EISEVIER. Octava edición, p. 509-527.
- Tovío, L. N., Duica, A. A., Grajales L, H., 2008. Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de trasplante de embriones bovinos. Revista MVZ Córdoba, 13 (1) 1240-1251.
- Warnick, L. D., Mohammed, H. O., White, M. E., Erb, N., 1995. The relationship of interval from breeding to uterine palpation for pregnancy diagnosis with calving outcomes in Holstein cows. Theriogenology. 44, 811-825.
- Zoli, A. P., Guilbault, L.A., Delahaut, P., W. Ortiz, W. B., Beckers, J.F., 1992. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its application for pregnancy diagnosis. Biol. Reprod. 46:83-92.